

Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

156. Mitteilung*. Synthese und Biosynthese substituierter Tryptanthrine

E. FIEDLER, H.-P. FIEDLER, A. GERHARD, W. KELLER-SCHIERLEIN,
W. A. KÖNIG** und H. ZÄHNER***

Institut für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie I, und Institut für Organische Chemie der Universität, Tübingen,
und Laboratorium für Organische Chemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, Schweiz

Metabolic Products of Microorganisms

156. Synthesis and Biosynthesis of Substituted Tryptanthrins

Abstract. *Candida lipolytica* synthesizes the antibiotic tryptanthrin from 1 mole tryptophan and 1 mole anthranilic acid. When feeding tryptophan and substituted anthranilic acids, or substituted tryptophans and anthranilic acid, we could isolate and identify the expected derivatives of tryptanthrin. The enzymes of the biosynthesis of tryptanthrin, with the exception of bromtryptophan, had no specificity for these substrates. In addition to these experiments substituted tryptanthrines were chemically synthesized. We checked them for antibiotic action; the halogen compounds turned out to be especially effective.

Key words: Antibiotic derivatisation — Yeast antibiotic — Tryptanthrin — Tryptophan metabolism — *Candida lipolytica*.

Zusammenfassung. *Candida lipolytica* synthetisiert das Antibioticum Tryptanthrin aus 1 Mol Tryptophan und 1 Mol Anthranilsäure. Bei Verfütterung von Tryptophan und substituierter Anthranilsäure, bzw. substituiertem Tryptophan und Anthranilsäure, konnten die zu erwartenden Tryptanthrinderivate isoliert und identifiziert werden. Die Enzyme der Tryptanthrinbiosynthese wiesen in bezug auf diese Substrate, mit Ausnahme von Bromtryptophan, keine Spezifität auf. Parallel zu diesen Versuchen wurden durch chemische Synthese substituierte Tryptanthrine hergestellt. Die

Derivate wurden auf ihre antibiotische Wirksamkeit geprüft; als besonders wirksam erwiesen sich die halogenierten Verbindungen.

Durch Derivatisierung eines Antibioticums können die Wirkungsintensität, das Wirkungsspektrum oder die pharmakologischen Eigenschaften verändert werden. Führt man die Derivatisierung über eine Verfütterung von substituierten Vorstufen an den Produzentenstamm durch, so bietet sich gleichzeitig die Möglichkeit, die Biogenese und die Substratspezifität der Biosyntheseenzyme zu untersuchen. Beim Antibioticum Pyrrolnitrin, das aus *Pseudomonas pyrocinia* isoliert wurde (Arima et al., 1964) und sich aus dem Tryptophanstoffwechsel herleitet, konnte durch Verfütterung von 6-Fluor- oder 7-Methyltryptophan das entsprechend substituierte Pyrrolnitrin nachgewiesen werden (Gorman et al., 1968). Das gleiche Resultat erzielten Hamill et al. (1970) durch Verfütterung von in Stellung 4, 5, 6 und 7 des Indolrings substituierten Tryptophans. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Enzyme der Pyrrolnitrinbiosynthese in bezug auf das verfütterte Tryptophan relativ unspezifisch sind. Die über Biosynthese und über chemische Synthese hergestellten Pyrrolnitrinderivate weisen eine unterschiedliche antibakterielle und antifungische Wirkung auf. Umio et al. (1970) konnte nachweisen, daß die Einführung eines weiteren Chloratoms oder die Substitution des Chlor durch Brom zu einer Steigerung der antibiotischen Eigenschaften führt.

Im Gegensatz zum Pyrrolnitrin zeigen die Enzyme der Mutterkornalkaloidbiosynthese eine hohe Substratspezifität. Verfüttert man anstelle von Tryptophan die 5-Methyl-, 7-Methyl- oder 1-N-Methyl-substituierten Verbindungen, so werden sie zwar in das Mycel aufgenommen, aber nicht zur Alkaloidsynthese verwendet (Robbers u. Floss, 1970).

* 155. Mitteilung: K. Uchida, H. Zähler, Modes of action of rinamycin and derinamycin. Arch. Microbiol. **107**, 161–166 (1976).

** Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität, Martin Luther King-Platz, D-2000 Hamburg 13, Bundesrepublik Deutschland.

*** Adresse für Sonderdruck-Anforderungen: Institut für Biologie II der Universität, Lehrstuhl Mikrobiologie I, Auf der Morgenstelle 28, D-7400 Tübingen, Bundesrepublik Deutschland.

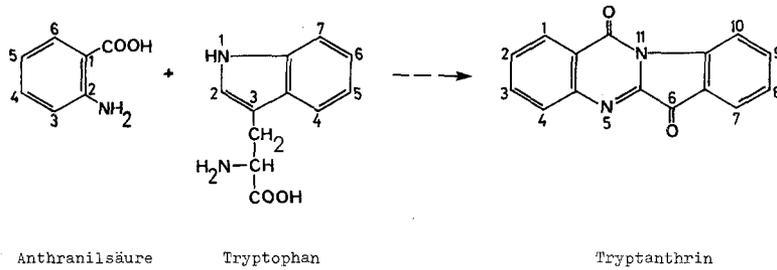


Abb. 1

Mutmaßliche Tryptanthrinbiosynthese. Numerierung des Inodolo-(2,1-b)-chinazolin-Gerüsts nach Mosby (1961)

Das Antibioticum Tryptanthrin [6,12-Dihydro-6,12-dioxo-indolo(2,1-b)-chinazolin], das von Schindler u. Zähler (1971) aus dem Kulturfiltrat von *Candida lipolytica* nach Verfütterung von 2×10^{-2} Mol Tryptophan/l isoliert, und dessen Struktur von Brufani et al. (1971) aufgeklärt wurde, leitet sich wie Pyrrolnitrin und die Mutterkornalkaloide aus dem Tryptophanstoffwechsel her. Es lag die Vermutung nahe, daß das Antibioticum durch Kondensation von 1 Mol Tryptophan mit 1 Mol Anthranilsäure synthetisiert wird (Abb. 1). Durch die Verfütterung von Tryptophan- und Anthranilsäurederivaten konnte gleichzeitig die Biogenese und die Spezifität der Biosynthesenzyme untersucht werden. Weiterhin bot sich die Möglichkeit, die auf diese Weise entstandenen Derivate in ihrer Wirkungsintensität zu prüfen.

Parallel zu diesen Versuchen wurden durch chemische Synthese weitere substituierte Tryptanthrinverbindungen hergestellt, um diese ebenfalls auf erhöhte Wirksamkeit zu testen.

MATERIAL UND METHODEN

Organismen

Candida lipolytica CBS 2073; *Bacillus subtilis* ATCC 6051; *Escherichia coli* K 12 Stamm W 1485, Köln.

Chemikalien

Mit Ausnahme der im folgenden aufgeführten Reagentien wurden analysenreine Chemikalien der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. L-Tryptophan (Serva Feinbiochemica, Heidelberg); 2-Amino-3-chlorbenzoesäure, 2-Amino-3-methylbenzoesäure, 2-Amino-4-methylbenzoesäure, 2-Amino-5-methylbenzoesäure (EGA-Chemie, Steinheim); 2-Amino-4-nitrobenzoesäure, 2-Amino-5-nitrobenzoesäure, 3-Aminophthalsäure-hydrochlorid, 5-Bromtryptophan, 3-Hydroxyanthranilsäure-hydrochlorid, DL-5-Methoxytryptophan (Fluka Feinchemikalien, Neu-Ulm); DL-5-Fluortryptophan, DL-4-Methyltryptophan, DL-5-Methyltryptophan, DL-6-Methyltryptophan (Sigma London, Kingston-upon-Thames, England); Bacto-Malt Extract, Bacto-Nutrient Broth, Bacto-Yeast Extract (Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.).

Nährmedien

Komplettmedium (verändert nach Matthaei et al., 1967). 8 g Nutrient Broth, 5 g NaCl, 1000 ml Aqua deion. Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt.

Minimalmedium I (verändert nach Fritsche, 1968). 2,2 g KH_2PO_4 , 6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g

NaCl, 0,02 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2 g Asparagin $\cdot 1\text{H}_2\text{O}$, Glucose 10 g, Spurenlösung 10 ml, Thiaminlösung 10 ml, Aqua deion. 1000 ml.

Minimalmedium II (verändert nach Fritsche, 1968). 2,2 g KH_2PO_4 , 6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g NaCl, 0,02 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g Asparagin $\cdot 1\text{H}_2\text{O}$, Glucose 10 g, Spurenlösung 10 ml, Thiaminlösung 10 ml, Aqua deion. 1000 ml.

Spurenelemente-Lösung: 50 mg H_3BO_3 , 4 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mg KJ, 20 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 40 mg $\text{MnSO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, 40 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mg Ammoniumheptamolybdat, 10 mg Biotin, Aqua deion. 1000 ml.

Thiaminlösung: 10 mg Thiaminhydrochlorid, 1000 ml Aqua deion. Glucose wurde separat autoklaviert; Zusätze, wie Tryptophan und Anthranilsäure wurden mit der Nährlösung autoklaviert, Pyruvat durch Filtration sterilisiert. Anthranilsäure wurde vor dem Sterilisieren mit Natronlauge neutralisiert.

Kulturbedingungen

a) *Verfütterung von Anthranilsäurederivaten.* Die Submerskulturen wurden in 500 ml-Erlenmeyerkolben (mit seitlichem Einstich, 100 ml Minimalmedium I) auf einer rotierenden Schüttelmaschine (120 U/min) bei 27°C inkubiert. Die Nährlösung enthielt zusätzlich $1 \cdot 10^{-2}$ Mol Pyruvat/l, $2 \cdot 10^{-2}$ Mol Tryptophan/l und $2 \cdot 10^{-2}$ Mol des entsprechenden Anthranilsäurederivats/l. Die Kolben wurden mit 1% einer 48 h gewachsenen Vorkultur beimpft und 6 Tage inkubiert.

b) *Verfütterung von Tryptophanderivaten.* Die Submerskulturen wurden in 100 ml-Erlenmeyerkolben (mit seitlichem Einstich, 20 ml Minimalmedium I) auf einer rotierenden Schüttelmaschine (120 U/min) bei 27°C inkubiert. Nach 48 h wurden die Kulturen abzentrifugiert, in Minimalmedium II resuspendiert und weitere 6 Tage inkubiert. Minimalmedium II enthielt Zusätze von $1 \cdot 10^{-2}$ Mol Pyruvat/l, $2 \cdot 10^{-2}$ Mol Anthranilsäure/l und $2 \cdot 10^{-2}$ Mol des entsprechenden Tryptophanderivats.

c) *Verdünnungsreihentest.* Die Organismen wurden in 100 ml-Erlenmeyerkolben (mit seitlichem Einstich, 20 ml Komplettmedium) auf einer rotierenden Schüttelmaschine (120 U/min) bei 37°C inkubiert. In Reagensgläser, die 1 ml Komplettmedium und 1 ml Bakteriensuspension (10^5 Keime/ml) enthielten, wurden 0,1 ml der Antibioticumlösung pipettiert. Anschließend wurden die Reagensgläser bei 37°C auf der rotierenden Schüttelmaschine (120 U/min) inkubiert. Die minimale Hemmkonzentration wurde visuell bestimmt.

Isolierung und Reinigung der substituierten Verbindungen

Die einzelnen Reinigungsschritte bei den Versuchen mit Verfütterung von Anthranilsäurederivaten waren:

a) Extraktion des Kulturfiltrats (1 l) bei pH 7 mit 3×10 Vol-% Essigsäureäthylester.

b) Chromatographie an Aluminiumoxid aktiv neutral (Aktivitätsstufe I) mit Essigsäureäthylester.

c) Craig-Verteilung über 320–450 Stufen im System Tetrachlorkohlenstoff–Chloroform–Methanol–Wasser (3+2+4+1). Der Verteilungskoeffizient beträgt 0,25.

d) Chromatographie an Kieselgel 60 (70–325 mesh ASTM) mit Chloroform.

e) Präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel H (Schichtdicke 2 mm) im System Chloroform–Tetrachlorkohlenstoff (3+1).

Die einzelnen Reinigungsschritte bei den Versuchen mit Verfütterung von Tryptophanderivaten waren:

a) Extraktion des Kulturfiltrats (20 ml) bei pH 7 mit 3 × je 5 ml Essigsäureäthylester.

b) Präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G (Schichtdicke 0,25 mm) im System Chloroform–Tetrachlorkohlenstoff (3+1).

c) Präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel G (Schichtdicke 0,25 mm) im System Chloroform–n-Butanol (95+5).

Quantitative Bestimmung

Die gebildeten Mengen an Tryptanthrin und den substituierten Verbindungen wurden mit der von Schindler u. Zähler (1971) beschriebenen photometrischen Methoden gemessen. Anhand einer Eichkurve (Abb. 2), deren Werte mit chemisch synthetisierten Tryptanthrin ermittelt wurden, konnte die Konzentration bestimmt werden. Die Extinktionsmessungen wurden in einem Zeiss PMQ 2-Photometer in Cuvetten mit der Schichtdicke $d = 1$ cm vorgenommen.

Synthese der substituierten Tryptanthrine

Die Synthesen substituiertes Tryptanthrine wurden z.T. nach der Methode von Bird (1963) (Methode A) in vier Stufen durchgeführt, z.T. nach dem viel einfacheren und im allgemeinen bessere Ausbeuten liefernden Verfahren von Friedländer u. Roschdestwensky (1915) (Methode B).

Massenspektroskopie

Die Hochauflösungsmassenspektren wurden an einem AEI MS 902 S-DS 30, die Niedrigauflösungsmassenspektren an einem LKB 9000 mittels Direkteinlaß aufgenommen. Die Ionisierungsenergie betrug 70 eV.

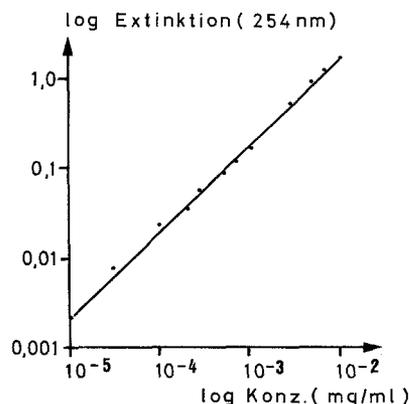


Abb. 2 Abhängigkeit der Extinktion von der Tryptanthrin-Konzentration

ERGEBNISSE

Biosynthese substituiertes Tryptanthrine

a) *Einbau von Anthranilsäurederivaten.* Gemäß der von uns aufgestellten Hypothese erwartet man den Substituenten der Anthranilsäure im Anthranilsäureteil des Tryptanthrinmoleküls. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der Verfütterungsversuche aufgeführt. Bei Zugabe von 3-Hydroxyanthranilsäure und Tryptophan konnten nur geringe Mengen an unsubstituiertem Tryptanthrin nachgewiesen werden, die hydroxylierte Verbindung wurde nicht synthetisiert. Bei Verfütterung von 6-Carboxyanthranilsäure (3-Aminophthal-säure) und Tryptophan wurde kein Antibioticum gebildet, die Hefe zeigte außerdem ein sehr schlechtes Wachstum. Durch säulen- und dünnschichtchromatographische Verfahren konnten nur 4-Methyl- und 2-Chlortryptanthrin von Tryptanthrin abgetrennt werden; bei 3-Methyl- und 2-Methyltryptanthrin war dies nicht möglich. Die Verbindungen wurden mit Hilfe der Massenspektroskopie identifiziert. Die

Tabelle 1. Verfütterungsversuche mit Anthranilsäurederivaten und Tryptophan

Zugesetzte Produkte	Entstandene Derivate	Massenpeak	Ausbeute		% Try-Einbau
			mg/l	mMol/l	
Antranilsäure + Tryptophan	Tryptanthrin	248	53,0	0,214	1,10
3-Methylanthranilsäure + Tryptophan	4-Methyltryptanthrin + Tryptanthrin	262	15,1	0,058	0,63
		248	15,7	0,063	
4-Methylanthranilsäure + Tryptophan	3-Methyltryptanthrin + Tryptanthrin	262	27,2	0,107	0,56
		248			
5-Methylanthranilsäure + Tryptophan	2-Methyltryptanthrin + Tryptanthrin	262	28,0	0,110	0,58
		248			
3-Hydroxyanthranilsäure + Tryptophan	Tryptanthrin	248	6,0	0,030	0,25
5-Chloranthranilsäure + Tryptophan	2-Chlortryptanthrin + Tryptanthrin	282	18,4	0,065	0,63
		248	12,3	0,050	
6-Carboxyanthranilsäure + Tryptophan	—	—	—	—	—

Tabelle 2. Verfütterungsversuche mit Tryptophanderivaten und Anthranilsäure

Zugesetzte Produkte	Entstandene Derivate	Massen- peak	Ausbeute		% Try- Einbau
			mg/l	mMol/l	
Tryptophan + Anthranilsäure	Tryptanthrin	248	23,0	0,093	0,47
DL-4-Methyltryptophan + Anthranilsäure	7-Methyltryptanthrin + 1,7-Dimethyltryptanthrin	262 276	12,5	0,047	0,23
DL-5-Methyltryptophan + Anthranilsäure	8-Methyltryptanthrin + 2,8-Dimethyltryptanthrin	262 276	13,0	0,048	0,24
DL-6-Methyltryptophan + Anthranilsäure	9-Methyltryptanthrin + 3,9-Dimethyltryptanthrin	262 276	19,0	0,071	0,35
5-Bromtryptophan + Anthranilsäure	8-Bromtryptanthrin	327	1,2	0,004	0,02
DL-5-Fluortryptophan + Anthranilsäure	8-Fluortryptanthrin + 2,8-Difluortryptanthrin	266 284	7,6	0,028	0,14
L-5-Hydroxytryptophan + Anthranilsäure	Tryptanthrin	248	0,5	0,003	0,02
DL-5-Methoxytryptophan + Anthranilsäure	8-Methoxytryptanthrin + 2,8-Dimethoxytryptanthrin	278 308	20,0	0,068	0,34

Massenspektren sind in den Tabellen 3 und 4 wiedergegeben.

b) *Einbau von Tryptophanderivaten.* Gemäß der von uns aufgestellten Hypothese erwartet man neben dem monosubstituierten Tryptanthrin, das den Substituenten im Tryptophananteil des Tryptanthrinmoleküls trägt, auch die disubstituierte Verbindung, die den Substituenten sowohl im Tryptophan-, als auch im Anthranilsäureteil des Tryptanthrinmoleküls trägt, da durch Abbau von substituiertem Tryptophan substituierte Anthranilsäure entsteht. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Verfütterungsversuche dargestellt. Bei Zugabe von 5-Bromtryptophan und Anthranilsäure konnte nur 8-Bromtryptanthrin isoliert werden, das ebenfalls zu erwartende 2,8-Dibromtryptanthrin wurde nicht gebildet. Bei Verfütterung von 5-Hydroxytryptophan und Anthranilsäure wurden nur geringe Mengen Tryptanthrin gebildet. Bei allen Versuchen, in denen sowohl das mono-, wie auch das disubstituierte Tryptanthrin gebildet wurde, konnte keine Trennung der Derivate durch säulen- und dünnschichtchromatographische Methoden erzielt werden. Die Verbindungen wurden mit Hilfe der Massenspektroskopie identifiziert. Die Massenspektren sind in den Tabellen 3 und 4 wiedergegeben.

c) *Massenspektroskopische Auswertung.* Tryptanthrin bietet infolge seiner Struktur als kondensiertes Ringsystem nur eine geringe Zahl an Fragmentierungsmöglichkeiten. Dies geht deutlich aus der hohen Intensität des Molekülions hervor, das mehr als 25% des Totalionenstroms ausmacht. Am leichtesten verläuft noch die Eliminierung von Kohlenmonoxid, wobei die Fragmentierungssequenz m/e 248 (M^+)

Tabelle 3. Interpretation der wichtigsten Ionen im Massenspektrum von Tryptanthrin

Massenzahl m/e		Summen- formel	Interpretation
ber.	gem.		
248,0585	248,0583	$C_{15}N_8N_2O_2$	M
220,0636	220,0633	$C_{14}H_8N_2O$	M-CO
192,0687	192,0690	$C_{13}H_8N_2$	M-2 CO
191,0608	191,0615	$C_{13}H_7N_2$	M-(2 CO + H)
178,0656	178,0654	$C_{13}H_8N$	M-(2 CO + N)
165,0578	165,0573	$C_{12}H_7N$	M-(2 CO + HCN)
164,0499	164,0493	$C_{12}H_6N$	M-(2 CO + HCN + H)
144,0323	144,0321	$C_8H_4N_2O$	M-(CO + C_6H_4)
138,0469	138,0470	$C_{11}H_6$	
102,0343	102,0344	C_7H_4N	
90,0343	90,0345	C_6H_4N	
76,0312	76,0312	C_6H_4	

→ m/e 220 → m/e 192 beobachtet wird. Diese Übergänge werden durch exakte Massenmessungen (Tabelle 3)¹ und durch Übergangssignale bestätigt. Wie die Hochauflösungsmessungen weiter zeigen, wird als Neutralfragment auch HCN abgespalten. Eine Zuordnung der Fragmentionen im unteren Massenbereich zu einzelnen Teilstrukturen des Moleküls ist nicht möglich, so daß die Position eines Substituenten aus dem Massenspektrum nicht abgeleitet werden kann. Die C_6 -Fragmente (Tabelle 3) treten bei den mono-substituierten Derivaten sowohl mit der erwarteten Massenverschiebung als auch mit gegenüber dem Grundkörper unveränderter Massenzahl auf. Daraus erkennt

¹ Die Hochauflösungsmessungen verdanken wir Herrn Dr. A. Prox, Fa. Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach/Riß.

Tabelle 4. Massenspektren substituierter Tryptanthrine

2-Methyl-Tr.		3-Methyl-Tr.		4-Methyl-Tr.		7-Methyl-Tr.		8-Methyl-Tr.		9-Methyl-Tr.	
<i>m/e</i>	rel. Int.										
262	100	262	100	262	100	262	100	262	100	262	100
234	27,0	234	41,6	234	6,35	234	40,0	234	30,6	234	37,5
233	5,8	233	9,8	233	4,8	233	7,5	233	10,0	233	5,2
206	6,9	206	5,2	206	17,0	206	9,6	206	8,9	206	7,5
205	12,0	205	12,4	205	18,0	205	21,8	205	16,0	205	15,5
179	1,4	179	4,9	179	2,1	179	3,2	179	2,0	179	2,0
178	1,5	178	4,0	178	2,1	178	2,9	178	2,5	178	2,2
165	0,7	165	6,0	165	0,5	165	3,3	165	2,0	165	1,8
164	0,6	164	3,2	164	0,6	164	2,5	164	1,7	164	1,4
158	2,2	158	—	158	—	158	2,9	158	3,5	158	2,2
151	1,2	151	—	151	1,9	151	2,8	151	2,0	151	—
131	8,1	131	—	131	7,2	131	13,3	131	8,3	131	7,7
116	2,1	116	—	116	1,7	116	7,5	116	4,3	116	3,2
103	2,0	103	—	103	9,5	103	10,2	103	7,6	103	3,8
102	3,8	102	—	102	4,0	102	14,4	102	7,6	102	6,6
90	4,5	90	—	90	4,1	90	18,7	90	6,0	90	7,9
89	6,8	89	—	89	6,4	89	26,6	89	11,7	89	10,4
77	4,1	77	—	77	7,2	77	19,8	77	9,0	77	8,4
76	4,2	76	—	76	6,0	76	16,0	76	8,6	76	7,8

Tabelle 5. Herstellung und Charakterisierung substituierter Tryptanthrine

Substanz	Ausgangsmaterial	Ausbeute ^a (%)	Methode	Schmp. (°C)	Analyse (%)	Bruttoformel
8-Bromtryptanthrin	I 5-Bromisatin	8,7	A	287	Ber. C 55,07 H 2,16 N 8,56 Br 24,43 Gef. C 54,90 H 2,24 N 8,53 Br 24,38	C ₁₅ H ₇ BrN ₂ O ₂
8-Chlortryptanthrin	II 5-Chlorisatin	4,3	A	297	Ber. C 63,73 H 2,50 N 9,92 Cl 12,54 Gef. C 63,40 H 2,60 N 10,10 Cl 12,53	C ₁₅ H ₇ ClN ₂ O ₂
8-Methyltryptanthrin	III 5-Methylisatin	5,9	A	278	Ber. C 73,27 H 3,84 N 10,68 Gef. C 73,20 H 3,91 N 10,66	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂
10-Methyltryptanthrin	IV 7-Methylisatin	8,1	B	210	Ber. C 73,27 H 3,84 N 10,68 Gef. C 73,28 H 3,91 N 10,66	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂
7-Methyltryptanthrin	V 4-Methylisatin	33,0	B	200	Gef. C 73,15 H 3,91 N 10,64	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂
2-Methyltryptanthrin	VI 5-Methylantranilsäure	48	B	260	Gef. C 73,19 H 3,92 N 10,68	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ O ₂
3-Nitrotryptanthrin	VII 2-Amino-4-nitrobenzoesäure	—	B	> 300	Ber. C 61,44 H 2,41 N 14,33 Gef. C 61,42 H 2,50 N 14,36	C ₁₅ H ₇ N ₃ O ₄

^a Bezogen auf das eingesetzte Isatinderivat.

man, daß die beiden äußeren Benzolringe gleichermaßen zur Bildung von C₆-Fragmenten beitragen. Ansonsten fragmentieren die substituierten Tryptanthrine völlig analog dem nichtsubstituierten Molekül.

Chemische Synthese substituierter Tryptanthrine

Die wichtigsten experimentellen Daten und die Charakterisierung der Produkte sind in den Tabellen 5 und 6 sowie in Abbildung 3 zusammengefaßt. Die CH₃-Signale der Methyl-derivate in Abbildung 3 erscheinen als Singulette bei folgenden δ -Werten: III 2,49 ppm, IV 2,79 ppm, V 2,77 ppm, VI 2,58 ppm. Die Analysenpräparate, hochschmelzende gelbe Kristalle, wurden

durch Sublimation im Hochvakuum (ca. 160°C) gereinigt. Die Ausgangsmaterialien (substituierte Isatine bzw. Antranilsäuren) wurden nach bekannten Vorschriften hergestellt (s. Tabelle 7). Die NMR-Spektren bestätigen die Stellung der Substituenten.

Die Formeln der synthetisierten Tryptanthrine und der Ausgangssubstanzen sind in Abbildung 4 zusammengestellt.

Biologischer Test der Derivate

Im Verdünnungsreihentest wurde untersucht, ob eines der substituierten Tryptanthrine eine stärkere antibakterielle Wirkung zeigt als Tryptanthrin selbst. Als

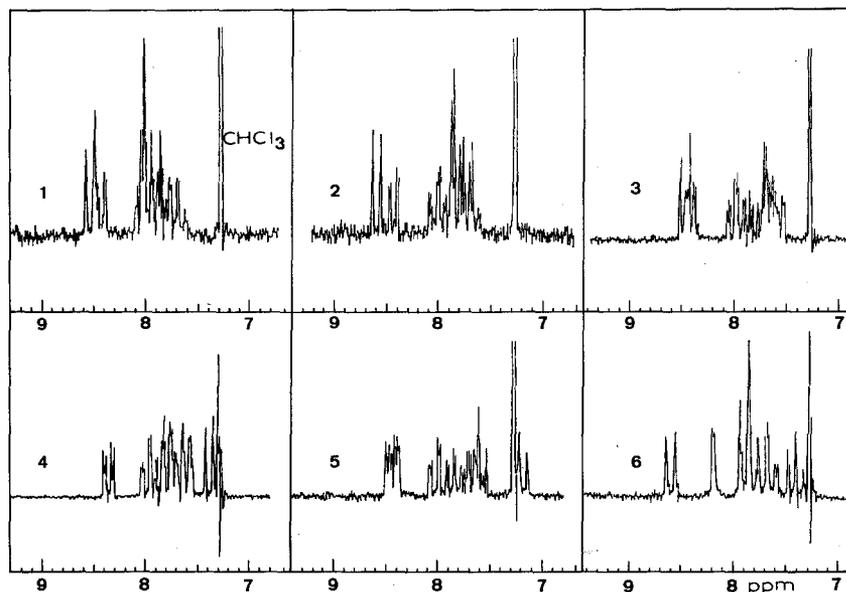


Abb. 3
 H-NMR-Spektren substituierter Tryptanthrine in CDCl_3 ; 100 MHz
 1 8-Bromtryptanthrin (I);
 2 8-Chlortryptanthrin (II);
 3 8-Methyltryptanthrin (III);
 4 10-Methyltryptanthrin (IV);
 5 7-Methyltryptanthrin (V);
 6 2-Methyltryptanthrin (VI)

Tabelle 6. UV- und IR-Spektren substituierter Tryptanthrine

Substanz		UV in Äthylalkohol: λ_{max} in nm (log ϵ)			IR in Nujol: ν_{max} in cm^{-1} (Auswahl charakteristischer Banden)
8-Bromtryptanthrin	I	258 (4,27)	336 (3,87)	405 (3,76)	1730, 1675, 1590, 1330, 1300, 845, 775
8-Chlortryptanthrin	II	256 (4,71)	333 (3,88)	405 (3,76)	1725, 1670, 1590, 1330, 1300, 843, 770
8-Methyltryptanthrin	III	258 (4,62) 405 (3,68)	315 (3,92)	337 (Sch.)	1720, 1690, 1580, 1325, 1300, 775, 760
10-Methyltryptanthrin	IV	255 (4,18)	322 (3,95)	400 (3,78)	1725, 1690, 1595, 1300, 780, 760
7-Methyltryptanthrin	V	254 (4,61)	320 (3,97)	398 (3,84)	1720, 1690, 1595, 1340, 1290, 785, 780
2-Methyltryptanthrin	VI	257 (4,32)	400 (3,65)		1725, 1680, 1590, 1355, 1315, 850, 805 785, 760
3-Nitrotryptanthrin	VII	221 (4,20)	258 (4,23) ^a		1720, 1695, 1600, 1580, 1350, 1325, 1315 805, 790, 760, 745

^a Wegen der äußerst geringen Löslichkeit konnten nur die intensivsten Maxima gemessen werden.

Die Vergleichswerte für das unsubstituierte Tryptanthrin (VIII) können den Arbeiten von Brufani et al. (1971) bzw. Schindler u. Zähler (1971) entnommen werden.

Lösungsmittel wurde Dimethylsulfoxid verwendet, das sich im Vergleich mit anderen Lösungsmitteln als am wenigsten toxisch erwiesen hatte. Je 0,1 ml der Antibioticumlösung wurden zu 2 ml beimpfter Nährlösung pipettiert; als Testorganismen dienten *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*. In Tabelle 8 sind die minimalen Hemmkonzentrationen der Tryptanthrin-derivate aufgeführt, die durch Verfütterungsversuche und durch chemische Synthese hergestellt wurden. Mit der gewählten Versuchsanordnung konnten nur Antibioticumkonzentrationen bis zu 10 $\mu\text{g/ml}$ getestet werden, da durch ihre geringe Wasserlöslichkeit die Substanzen bei höheren Konzentrationen ausfallen. *Escherichia coli* wurde unter diesen Bedingungen durch keines der Derivate im Wachstum gehemmt. In einem

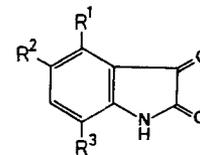
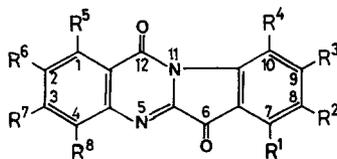
Wirkungsspektrum erwiesen sich Gram-positive Eubakterien gegen Tryptanthrin und substituierte Verbindungen wesentlich empfindlicher als Gram-negative Eubakterien, Pseudomonaden, Streptomyceten und Hefen. Halogenierte Derivate waren mit wenigen Ausnahmen stärker antibiotisch wirksam als die übrigen Verbindungen.

DISKUSSION

Aus den Verfütterungsversuchen lassen sich zwei Aussagen herleiten:

a) Tryptanthrin wird aus je 1 Mol Tryptophan und Anthranilsäure synthetisiert. Bei der Verfütterung von Tryptophan und substituierter Anthranilsäure waren

Abb. 4. Formeln der synthetisierten Tryptantrine und der Ausgangsmaterialien



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸		R ¹	R ²	R ³
I	H	Br	H	H	H	H	H	H	XIX	H	Br	H
II	H	Cl	H	H	H	H	H	H	XX	H	Cl	H
III	H	CH ₃	H	H	H	H	H	H	XXI	H	CH ₃	H
IV	H	H	H	CH ₃	H	H	H	H	XXII	H	H	CH ₃
V	CH ₃	H	H	H	H	H	H	H	XXIII	CH ₃	H	H
VI	H	H	H	H	H	CH ₃	H	H				
VII	H	H	H	H	H	H	NO ₂	H				
VIII	H	H	H	H	H	H	CH ₃	H				
IX	H	H	H	H	H	H	H	CH ₃				
X	CH ₃	H	H	H	CH ₃	H	H	H				
XI	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃	H	H				
XII	H	H	CH ₃	H	H	H	H	H				
XIII	H	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃	H				
XIV	H	OCH ₃	H	H	H	H	H	H				
XV	H	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	H	H				
XVI	H	F	H	H	H	H	H	H				
XVII	H	F	H	H	H	F	H	H	XXIV	CH ₃	H	
XVIII	H	H	H	H	H	Cl	H	H	XXV	H	NO ₂	

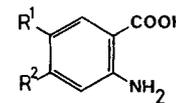


Tabelle 7. Ausgangsmaterialien für die Synthese substituierter Tryptantrine

Substanz		Hergestellt nach	Schmp. (°C)	NMR-Spektrum (in ppm; J in Hz)	Lösungsmittel
5-Bromisatin	XIX	Liebermann u. Kraus (1907)	257	7,04 [d, J = 8; H-C (7)] 7,68 [d, J = 1,6; H-C (4)] 7,78 [dd, J = 8 u. 1,6; H-C (6)]	Aceton-d ₆
5-Chlorisatin	XX	Liebermann u. Kraus (1907)	248	6,93 [d, J = 8; H-C (7)] 7,55 [d, J = 1,6; H-C (4)] 7,62 [dd, J = 8 u. 1,6; H-C (6)]	DMSO-d ₆
5-Methylisatin	XXI	Marvel u. Hiers (1941)	184	2,5 (s, 3 H; Ar-CH ₃) 6,9–7,7 (m, 3 H; Ar-H)	CDCl ₃
7-Methylisatin	XXII	Marvel u. Hiers (1941)	258		
4-Methylisatin	XXIII	Marvel u. Hiers (1941) Mayer u. Schulze (1925)	191	2,7 (s, 3 H; Ar-CH ₃) 6,7–7,7 (m, 3 H; Ar-H)	CDCl ₃
5-Methylantranilsäure	XXIV	analog Mayer u. Schulze (1925)	177		
2-Amino-4-nitrobenzoesäure	XXV	käuflich			

zweierlei Substanzen zu erwarten, substituiertes Tryptanthrin und unsubstituiertes Tryptanthrin, das sich aus Tryptophan und Anthranilsäure, die durch Tryptophanabbau gebildet wird, zusammengesetzt. Beide Substanzen wurden isoliert und identifiziert. Bei der Verfütterung von substituiertem Tryptophan und Anthranilsäure konnte man sowohl das monosubstituierte Tryptanthrin wie auch die disubstituierte Verbindung erwarten. Das disubstituierte Tryptanthrin

wird aus substituiertem Tryptophan und der durch Abbau daraus hervorgehenden substituierten Anthranilsäure synthetisiert. Beide Substanzen wurden isoliert und identifiziert.

Die Substituenten finden sich, soweit dies mit der Methode überprüfbar ist, immer an der aus dem Biogeneschema (Abb.1) zu erwartenden Stelle, was als Indiz für die Richtigkeit dieses Schemas gelten kann.

Tabelle 8. Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) der substituierten Tryptanthrine für *Bacillus subtilis*

	MHK ($\mu\text{g/ml}$)
a) Biosynthetische Derivate:	
Tryptanthrin	3
2-Methyltryptanthrin (VI) + Tryptanthrin	1
3-Methyltryptanthrin (VIII) + Tryptanthrin	3
4-Methyltryptanthrin (IX)	1
7-Methyltryptanthrin (V)	
+ 1,7-Dimethyltryptanthrin (X)	1
8-Methyltryptanthrin (III)	
+ 2,8-Dimethyltryptanthrin (XI)	1
9-Methyltryptanthrin (XII)	
+ 3,9-Dimethyltryptanthrin (XIII)	0,3
8-Methoxytryptanthrin (XIV)	
+ 2,8-Dimethoxytryptanthrin (XV)	1
8-Fluortryptanthrin (XVI)	
+ 2,8-Difluortryptanthrin (XVII)	0,3
8-Bromtryptanthrin (I)	0,3
2-Chlortryptanthrin (XVIII)	0,1
b) Chemisch synthetisierte Derivate:	
Tryptanthrin	3
2-Methyltryptanthrin (VI)	1
7-Methyltryptanthrin (V)	10
8-Methyltryptanthrin (III)	10
10-Methyltryptanthrin (IV)	1
3-Nitrotryptanthrin (VII)	10
8-Bromtryptanthrin (I)	0,3–1
8-Chlortryptanthrin (II)	1

b) Bei der Verfütterung von 3-, 4-, 5-Methylanthranilsäure, 5-Chloranthranilsäure, 4-, 5-, 6-Methyltryptophan, 5-Methoxytryptophan und 5-Fluortryptophan konnten keinerlei Enzymspezifitäten festgestellt werden; die zu erwartenden Tryptanthrinderivate konnten alle identifiziert werden. Bei der Verfütterung von 5-Bromtryptophan und Anthranilsäure wurde jedoch nur 8-Bromtryptanthrin gebildet und nicht, wie zu erwarten war, auch 2,8-Dibromtryptanthrin. Bedenkt man, daß Brom mit 1,14 Å einen wesentlich größeren Atomradius besitzt als Kohlenstoff mit 0,77 Å, Fluor 0,64 Å und Chlor 1,00 Å, so wäre eine Enzymspezifität, die auf der sterischen Behinderung durch den Substituenten beruht, nicht auszuschließen. Bei Verfütterung von hydroxylierten Anthranilsäure- und Tryptophanverbindungen konnte nur eine schwache Tryptanthrinbildung beobachtet werden, die zu erwartenden Hydroxylderivate wurden nicht gebildet. Es bedürfte noch einer Klärung, welche Enzymspezifität hier zur Geltung kommt.

Sowohl die durch Biosynthese wie auch die durch chemische Synthese hergestellten Derivate zeigten eine unterschiedliche antibakterielle Wirkung. Besser wirksam als Tryptanthrin waren vor allem die halogenierten Derivate. Es gelang jedoch nicht, eine Ver-

bindung mit besserer Wasserlöslichkeit herzustellen. Eine solche Substanz wäre insofern interessant, da Antibiotica, die sehr gut gegen Gram-negative Bakterien wirken, meist hydrophiler sind als solche, die speziell gegen Gram-positive Keime wirken (Biagi et al., 1970).

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Förderung der Arbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 76.

LITERATUR

- Arima, K., Imanaka, H., Kousaka, M., Fukuta, A., Tamura, G.: Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agr. Biol. Chem.* **28**, 575–576 (1964)
- Biagi, G. L., Barbaro, A. M., Guerra, M. C.: The relationship between lipophilic nature and antibiotic activity spectrum. *Farm.-Ed. Sci.* **25**, 749–754 (1970)
- Bird, C. W.: The structure of methylisatoid. *Tetrahedron* **19**, 901–904 (1963)
- Brufani, M., Fedeli, W., Mazza, F., Gerhard, A., Keller-Schierlein, W.: The structure of tryptanthrin. *Experientia (Basel)* **27**, 1249–1250 (1971)
- Friedländer, P., Roschdestwensky, N.: Über ein Oxydationsprodukt des Indigoblaus. *Ber. dtsh. Chem. Ges.* **48**, 1841–1847 (1915)
- Fritsche, W.: Der Einfluß der Kohlenstoff-Quelle auf Wachstumsrate, Proteingehalt und Enzymmuster von *Candida guilliermondii*. *Z. allg. Mikrobiol.* **8**, 91–99 (1968)
- Gorman, M., Hamill, R. L., Elander, R. P., Mabe, J. A.: Preparation of substituted phenyl pyrrols through the metabolism of tryptophan analogues. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **31**, 294–298 (1968)
- Hamill, R. L., Elander, R. P., Mabe, J. A., Gorman, M.: Metabolism of tryptophan by *Pseudomonas aureofaciens*. III. Production of substituted pyrrolnitrins from tryptophan analogues. *Appl. Microbiol.* **19**, 721–725 (1970)
- Liebermann, C., Krause, R.: Über die indigoähnliche Gruppe von blauen Farbstoffen aus Isatin. *Ber. dtsh. Chem. Ges.* **40**, 2492–2515 (1907)
- Marvel, C. S., Hiers, G. S.: Isatin: Organic synthesis. New York: Wiley 1941
- Matthaei, H., Heller, G., Voigt, H. P., Neth, R., Schöch, G., Kübler, H.: Analysis of the genetic code by amino acid adapting. In: *Genetic elements* (D. Shugar, ed.), pp. 233–250. New York-London: Academic Press 1967
- Mayer, F., Schulze, R.: Über das 4- und 6-Methylisatin. *Ber. dtsh. Chem. Ges.* **58**, 1465–1469 (1925)
- Mosby, W. L.: Heterocyclic compounds; system with bridgehead nitrogen, Part I, p. 732. New York: Interscience 1961
- Robbers, J. E., Floss, H. G.: Physiological studies on Ergot: Influence of 5-methyltryptophan on alkaloid biosynthesis and the incorporation of tryptophan analogues into protein. *J. pharm. Sci.* **59**, 702–703 (1970)
- Schindler, F., Zähner, H.: Tryptanthrin, ein von Tryptophan abzuleitendes Antibiotikum aus *Candida lipolytica*. *Arch. Mikrobiol.* **79**, 187–203 (1971)
- Umio, S., Kariyone, K., Tanaka, K., Kishimoto, T., Nakamura, H., Nishida, M.: Structure-activity of pyrrolnitrin analogues: Total synthesis of pyrrolnitrin XI. In: *Progress in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, Vol. I, pp. 250–253. Tokyo: University of Tokyo Press 1970

Eingegangen am 6. November 1975