

- [4] C. H. SHUNK, C. H. STAMMER, E. A. KACZKA, E. WALTON, C. F. SPENCER, A. N. WILSON, J. W. RICHTER, F. W. HOLLY & K. FOLKERS, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 1770 (1956).
 [5] J. W. HINMAN, E. L. CARON & H. HOEKSEMA, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 5321 (1957).
 [6] H. HOEKSEMA, E. L. CARON & J. W. HINMAN, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 2019 (1956).
 [7] J. M. GULLAND & G. R. BARKER, *J. chem. Soc.* **1943**, 625.
 [8] E. WALTON, J. O. RODIN, C. H. STAMMER, F. W. HOLLY & K. FOLKERS, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 5168 (1958).
 [9] A. J. BIRCH, P. W. HOLLOWAY & R. W. RICHARDS, *Biochim. biophys. Acta* **57**, 143 (1962).
 [10] F. WEYGAND & O. TRAUTH, *Chem. Ber.* **85**, 57 (1952).
 [11] J. KISS, *Chemistry & Ind.* **1964**, 32.
 [12] Vgl. J. KISS & H. SPIEGELBERG, *Helv.* **47**, 398 (1964).
 [13] C. S. HUDSON, *J. Amer. chem. Soc.* **31**, 66 (1909).
 [14] S. WINSTEIN & R. BOSCHAN, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 2311, 4669 (1950).
 [15] E. L. HIRST & J. K. N. JONES, *J. chem. Soc.* **1946**, 506.
 [16] B. P. VATERLAUS & H. SPIEGELBERG, *Helv.* **47**, (1964), in Vorbereitung.
 [17] K. JOSEPHSON, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **63**, 3089 (1930).
 [18] J. KISS, *Chemistry & Ind.* **1964**, 73.
 [19] J. CONCHIE, G. A. LEVY & C. A. MARSH, *Advances Carbohydrate Chemistry* **12**, 173 (1957); R. JEANLOZ, H. G. FLETCHER JR. & C. S. HUDSON, *J. Amer. chem. Soc.* **70**, 4055 (1948).

49. Novobiocin III [1]¹⁾

Die Glykosidsynthese des Novobiocins

von B. P. Vaterlaus, K. Doebel, J. Kiss, A. I. Rachlin und H. Spiegelberg

(18. XII. 63)

Die Synthese der 3-O-Carbamoyl-noviose [1] und ein Studium des Verhaltens von Acyl-noviosylhalogeniden [2] bei Glykosidsynthesen sind die Voraussetzungen zur eigentlichen Novobiocinsynthese [3]. Es ist dazu noch die Wahl einer zu Glykosidsynthesen befähigten Aglykonkomponente zu treffen. Diese Verbindung muss nach der Verknüpfung zum α -Glykosid [4] die für den weiteren Aufbau zum Novobiocin notwendigen Strukturmerkmale besitzen.

Geeignet dazu ist das 4-Benzyl-oxy-7-hydroxy-8-methyl-cumarin (2), das durch Verätherung von 4,7-Dihydroxy-8-methyl-cumarin [5] in Benzylalkohol mit Schwefelsäure gewonnen wird. Seine Glykosidierung mit dem 2,3-O-Carbonyl- β -noviosylchlorid (1) [2] in absolutem Chinolin in Gegenwart von Silberoxid führt zum 4-Benzyl-oxy-7-(2,3-O-carbonyl- α -noviosyloxy)-8-methyl-cumarin (3), Smp. 148-149°. Das IR.-Absorptionsspektrum zeigt Banden bei 1788 und 1702 cm^{-1} , die der cyclischen Carbonatfunktion und der δ -Lactongruppe zuzuordnen sind. Die Glykosidierung der phenolischen Sauerstofffunktion bewirkt eine Verschiebung der δ -Lactonbande um 20 cm^{-1} nach grösseren Wellenzahlen. Die Rotationsdispersionskurve weist keinen messbaren COTTON-Effekt auf, sie ist von einfachem, negativem Typus. Die α -Konfiguration des Glycosids 3 geht nach der Regel der Isorotation von HUDSON [6] aus dem Vergleich der molekularen Drehwerte von 3 und der beiden anomeren Methyl-

¹⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 397.

2,3-O-carbonyl-noviosiden [7]²⁾ hervor. Dieses Resultat macht es wahrscheinlich, dass die Glykosidierung von **2** mit dem 2,3-O-Carbonyl- β -noviosylchlorid (**1**) unter den angewandten Bedingungen mit einer Umkehrung des asymmetrischen Lactolkohlenstoffatoms verbunden ist. Es darf daher als weitere Stütze für die β -(1,2-*cis*)-Konfiguration [2] des flüssigen 2,3-O-Carbonyl-noviosylchlorids (**1**) angesehen werden.

Zur Einführung einer potentiellen Aminfunktion in die 3-Stellung der Cumarinmolekel muss die Benzylgruppe durch Hydrogenolyse [8] entfernt werden. Dies geschieht durch katalytische Hydrierung von **3** mit Hilfe einer 5-proz. Palladiumkohle als Katalysator. Das 7-(2,3-O-Carbonyl- α -noviosyloxy)-4-hydroxy-8-methyl-cumarin (**4**) zeigt in bezug auf sein Ausgangsmaterial eine um 12 cm^{-1} nach kleineren Wellenzahlen verschobene Carbonylschwingung bei 1690 cm^{-1} für die δ -Lactongruppe, sowie eine dem Glykosid **3** ähnlich verlaufende einfache, negative Rotationsdispersionskurve. Die Substanz **4** besitzt die Eigenschaft, in schwach alkalischer Lösung ein reaktives Carbanion in der 3-Stellung zu bilden und lässt sich mit diazotiertem Anilin zum 7-(2,3-O-Carbonyl- α -noviosyloxy)-4-hydroxy-8-methyl-3-phenylazo-cumarin (**5**) kuppeln. Dieser Farbstoff ist durch das langwellige UV.-Absorptionsmaximum bei $425\text{ m}\mu$ charakterisiert und weist im IR.-Absorptionsspektrum Carbonylschwingungen bei 1802 und 1730 cm^{-1} auf.

Nach katalytischer Hydrierung des Phenylazokörpers **5** in Essigester in Gegenwart eines Palladiumkatalysators erfolgt die Isolierung des luftempfindlichen 3-Amino-7-(2,3-O-carbonyl- α -noviosyloxy)-4-hydroxy-8-methyl-cumarins (**6**). Nach dem Umlösen aus Isopropylalkohol zersetzt sich die Substanz bei 180° . Das Amin besitzt UV.-Absorptionsmaxima bei 232 , 283 und $298\text{ m}\mu$.

Bevor Kenntnisse der Biosynthese des Novobiocins [9] vorlagen, wurde der Verbindung **6** eine grosse Bedeutung zugemessen. Im biogenetischen Denken wurde für das durch Ammonolyse der Cyclocarbonat-Gruppe entstandene Isomerengemisch der Carbamate dieselbe Rolle vermutet, wie sie für die 6-Amino-penicillansäure [10] bewiesen ist und für die 7-Amino-cephalosporansäure [11] für möglich gehalten wird. Diese Amine können durch Acylierungen in verschiedene Antibiotica übergeführt werden. Nach unseren Versuchen ist das Amin **6** durch keine bekannte Abbaureaktion aus dem Naturstoff zugänglich. Es wurde daher eine leistungsfähige Synthese dieser Substanz angestrebt, die es ermöglicht, **6** mit besseren Ausbeuten in bezug auf die Zuckerkomponente zu erhalten. Dies ist dann der Fall, wenn als Aglykonkomponente für die Glykosidsynthese eine Verbindung gewählt wird, in der die Aminfunktion in irgend einer Form bereits vorhanden ist. Von den zahlreichen bearbeiteten Synthesvarianten nimmt das 4-Benzyl-3-(benzylcarbonyl-amino)-7-hydroxy-8-methyl-cumarin (**8**) als in Chinolin gut lösliche Substanz eine bevorzugte Stellung ein. Man erhält es durch Umsetzung des 3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methyl-cumarins [5] [12] mit Chlorameisensäure-benzylester nach SCHOTTEN-BAUMANN in wässriger Natron-

²⁾ Das Methyl-2,3-O-carbonyl- β -noviosid war bekannt [7]. Das α -Anomere lässt sich durch chromatographische Auftrennung des Anomerengemisches an Silicagel rein erhalten. Die Spitzenfraktion des Petroläther (Siedebereich $40\text{--}45^\circ$)-Benzol-(50:50)-Eluates wird nach dem Entfernen des Lösungsmittelgemisches destilliert. Sie hat den Sdp. $75\text{--}78^\circ/0,01\text{ Torr}$. Das Methyl-2,3-O-carbonyl- α -noviosid zeigt eine spezifische Drehung $[\alpha]_D^{25} = -41^\circ$ ($c = 1\%$ in Methanol).

lauge und anschliessende Verätherung der Enolfunktion mit Phenylldiazomethan³⁾ in Dioxan. Seine Glykosidierung mit dem 2,3-O-Carbonyl- β -noviosylchlorid (**1**), in analoger Weise ausgeführt, ergibt nach chromatographischer Reinigung an Silicagel das amorphe 4-Benzoyloxy-3-(benzyloxycarbonyl-amino)-7-(2,3-O-carbonyl- α -noviosyloxy)-8-methyl-cumarin (**9**), das weiter durch katalytische Hydrierung in das Amin **6** umgewandelt wird.

Es gelang in der Folge, **6** mit 4-Acetoxy-3-isopenten-(2')-yl-benzoylchlorid [5b] in Pyridin in mässiger Ausbeute zum 3-[4-Acetoxy-3-isopenten-(2')-yl-benzamido]-7-(2,3-O-carbonyl- α -noviosyloxy)-4-hydroxy-cumarin (**10**) zu acylieren. Verschiedene Methoden, die in der Peptidchemie zur Amidsynthese herangezogen werden, ergaben keine wesentlich besseren Ausbeuten. Dies kann die Folge des schwach basischen Charakters der Aminfunktion [12b]³⁾ von **6** sein. Die ammonolytische Ringöffnung des Cyclocarbonats **6** sowie die Ammonolyse der Phenolacetat-Gruppe lässt sich durch Lösen der Substanz in flüssigem Ammoniak leicht ausführen. Man erhält ein amorphes Gemisch von Novobiocin (**11**) und Isonovobiocin (**12**) [13]. Die Trennung der beiden Isomeren erfolgt auf Grund ihrer Löslichkeitsunterschiede durch mehrmaliges Umlösen aus 60-proz. Aceton-Wasser [14]. Isonovobiocin bleibt in Lösung und Novobiocin wird durch weiteres Umlösen aus Methanol-Wasser-Eisessig (10 : 4 : 1) [15] analytisch rein gewonnen. Die Identität der synthetischen Verbindung mit dem Naturprodukt [7] [12c] resultiert aus den IR.-Absorptionsspektren, dem gleichsinnigen Verlauf der beiden Rotationsdispersionskurven und der Übereinstimmung der mikrobiologischen Aktivität⁴⁾ gegenüber dem Testorganismus, *Staphylococcus aureus* P 6538.

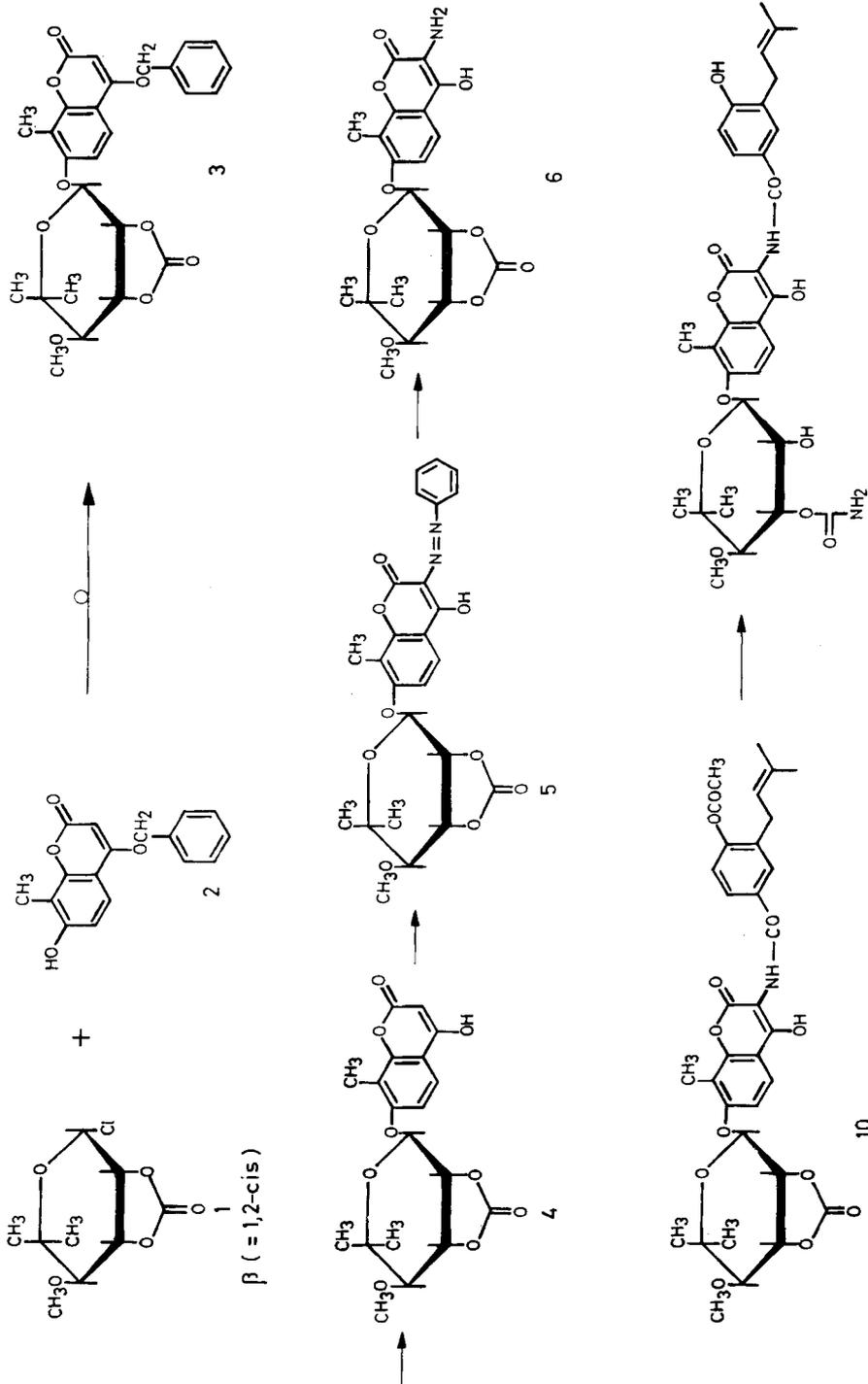
Es ist überraschend, dass die Öffnung des Cyclocarbonat-Ringes mit Ammoniak den Charakter einer stereoselektiven Reaktion annimmt. Es wird daher die Frage der prozentualen Verteilung der Isomeren aufgeworfen und auf der Stufe des Dihydronovobiocins (**13**) [7] [12c] [16], das dieselbe Aktivität [7] wie Novobiocin aufweist, mit Hilfe der mikrobiologischen Analyse genau untersucht.

Dihydronovobiocin [16] lässt sich nach einer in bezug auf die Noviose ergebigeren Variante synthetisieren. Zu diesem Zweck setzt man die Mono-O-acetyl-dihydronovobiocinsäure [5b] mit Phenylldiazomethan in Aceton zum 3-(4-Acetoxy-3-isopentyl-benzamido)-4-benzyloxy-7-(2,3-O-carbonyl- α -noviosyloxy)-8-methyl-cumarin (**15**) um, dessen Benzylgruppe in bekannter Art [8] durch Hydrogenolyse unter Bildung von **16** entfernt wird. Die Öffnung der Cyclocarbonat-Gruppe in der Verbindung **16** mit flüssigem Ammoniak erlaubt die Isolierung des amorphen Gemisches von Dihydronovobiocin und Dihydro-isonovobiocin, dessen Isomerenverteilung durch die mikrobiologische Analyse direkt bestimmt wird. Man findet 80% Dihydronovobiocin neben 20% des inaktiven Dihydro-isonovobiocins. Es ist interessant, dass die alkalische Isomerisierung des Novobiocins [13] bei einem pH-Wert von 10 zu einem Gleichgewicht von 67% Novobiocin und ca. 33% Isonovobiocin führt. Es ist daher in unserem Fall wahrscheinlich, dass die ammonolytische Ringöffnung kinetisch kontrolliert ist. Dihydronovobiocin erleidet unter den Bedingungen der Ammonolyse in flüssigem

³⁾ Die Verbindung **6** zeigt einen pK_{aMCS} -Wert von $7,6 \pm 1$, wenn sie mit 0,25 N Tetraäthylammoniumhydroxid-Lösung in Methylcellosolve-Wasser (80:20) titriert wird. Mit 0,25 N Salzsäure wird bei gleichen Bedingungen kein Sprung in der Titrationskurve beobachtet (pK_{aMCS} 2,4).

⁴⁾ Wir danken Frl. Dr. E. BÖHNI für ihre Mithilfe bei den mikrobiologischen Analysen.

Die Glykosidsynthese



Novobiosin 80% 11
 Isonovobiosin 20% 12
 (2-O-carbamoyl-)

Ammoniak keinen Aktivitätsverlust. Es tritt somit in diesem Medium keine Äquilibriumierung der Substanz mit der Iso-Verbindung ein. Sterische Einflüsse in den Übergangszuständen der Ringöffnungsreaktion können massgebend für den stereoselektiven Verlauf der Reaktion, der die Bildung des 3-Isomeren begünstigt, verantwortlich sein. In der stabileren Sesselkonformation der Noviose [17] kommt die durch die Ammonolyse entstehende Carbamatgruppe im Novobiocin in die äquatoriale Lage zu liegen, während dieselbe Funktion im Isonovobiocin die axiale Lage einnimmt.

Experimenteller Teil⁵⁾

4-Benzyl-7-hydroxy-8-methyl-cumarin (2): 10 g 4,7-Dihydroxy-8-methyl-cumarin [5] werden in 100 ml Benzylalkohol und 1 ml konz. Schwefelsäure 3 Std. auf dem Dampfbad erwärmt. Das sich bei der Reaktion bildende Wasser wird mit 2mal 100 ml Benzol azeotrop abdestilliert. Anschliessend wird für weitere 2 Std. auf dem Dampfbad erwärmt. Das Reaktionsgemisch wird auf 200 ml Wasser, dem 35 ml 3N Natronlauge zugesetzt sind, gegossen. Nach dem Ausziehen mit Äther wird die wässrige Phase mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert (kongorot). Die ausgefallene Substanz wird filtriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Man löst zur weiteren Reinigung aus 425 ml Eisessig um: es werden 5,18 g (38,5%) vom Smp. 268–271° erhalten. IR.: $\nu(\text{OH}) = 3330 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{CO}) = 1681 \text{ cm}^{-1}$.

$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_4$ (282,28) Ber. C 72,33 H 5,00% Gef. C 71,98 H 5,10%

4-Benzyl-7-(2,3-O-carbonyl- α -noviosyloxy)-8-methyl-cumarin (3): 9,0 g 4-Benzyl-7-hydroxy-8-methyl-cumarin (2) werden in 200 ml frisch destilliertem Chinolin durch Erwärmen gelöst. Zur Lösung gibt man 15,0 g frisch geglühtes Calciumsulfat und 15 g Silberoxid und fügt zu der gerührten Suspension in einer Portion das frisch zubereitete⁶⁾ 2,3-O-Carbonyl- β -noviosylchlorid (1) in 50 ml destilliertem Chinolin bei 25° hinzu. Es wird 4 Std. geführt. Zur besseren Filtration der Silbersalze verdünnt man mit Essigester, filtriert durch Cellit und wäscht das rotbraune, klare Filtrat nacheinander mit verdünnter Phosphorsäure, Wasser, verdünnter Salzsäure, verdünnter Sodalösung und Wasser. Die Lösung wird über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum zur Trockne verdampft. Der Rückstand besteht aus einem rotbraunen Öl (17,8 g), das zur Reinigung in 25 ml Benzol gelöst an 300 g Silicagel (MERCK) adsorbiert wird. Mit 3 l Benzol und 3 l Benzol-Äther (99:1) wird 1 g Öl eluiert, das verworfen wird. Benzol-Äther (95:5) ergibt 7,4 g Öl, das aus wenig Äther kristallisiert. Durch Umlösen aus Äther erhält man 3,8 g vom Smp. 148–149°. $[\alpha]_D^{24} = -60^\circ$ ($c = 1\%$, CHCl_3); UV.: $\lambda_{\text{max}} = 284$ und $306 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 12400$ und 14200); IR.: $\nu(\text{CO}) = 1788$ und 1702 cm^{-1} .

$\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{O}_9$ (482,46) Ber. C 64,72 H 5,43% Gef. C 64,33 H 5,39%

7-(2,3-O-Carbonyl- α -noviosyloxy)-4-hydroxy-8-methyl-cumarin (4): 1,72 g 4-Benzyl-7-(2,3-O-carbonyl-noviosyloxy-(8-methyl-cumarin (3) werden in 75 ml Essigester gelöst und in Gegenwart von 250 g 5-proz. Palladiumkohle hydriert. Es werden 82 ml Wasserstoff aufgenommen (Theorie 80 ml). Anschliessend filtriert man vom Katalysator ab und dampft im Vakuum das Filtrat zur Trockne ein. Es resultieren 1,29 g eines farblosen Harzes, das schwierig zu kristallisieren ist.

⁵⁾ Die Smp. sind nicht korrigiert; sie wurden in einer offenen Kapillare bestimmt. – Bei Lösungsmittelgemischen ist das Volumenverhältnis angegeben. – Die IR.-Absorptionsspektren nicht kristallisierter Substanzen (Öle) wurden in unverdünnten, flüssigen Mustern, solche kristallisierter Präparate in Nujol als Film auf einem BECKMAN-Doppelstrahlspektrophotometer, Modell IR-5, aufgenommen. – Die UV.-Spektren wurden in alkoholischer Lösung auf einem CARY-Spektrophotometer Modell DK registriert. – Die Rotationsdispersions(RD.)-Kurven, die mit einem photoelektrischen, selbstablesenden Polarimeter kontinuierlich aufgenommen wurden, verdanken wir Dr. F. BURKHARDT. Die Schichtdicke der Messlösung betrug 10 cm. Es wurde soweit verdünnt, dass die Transmission der Messlösung immer mindestens 10% betrug; Temperatur 25°. – Die Mikroanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung: Dr. A. DIRSCHERL) ausgeführt.

⁶⁾ Aus 10 g Methyl-2,3-O-carbonyl-noviosid (Anomerengemisch) mit Salzsäuregas in Nitromethan-Acetylchlorid (9:1) hergestellt [2].

Kristallisation tritt aus Benzol ein, wobei nach weiterem Umlösen aus 50-proz. Äthanol-Wasser 700 mg der analytisch reinen Substanz erhalten werden. Sie sintert bei 133° und schmilzt bei 200–202°. $[\alpha]_D^{22} = -62^\circ$ ($c = 1,0\%$, CHCl_3); UV.: $\lambda_{\text{max}} = 285$ und $306 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 13000$ und 15100) Schulter bei $319 \text{ m}\mu$; IR.: $\nu(\text{CO}) = 1810$ und 1690 cm^{-1} .

$\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_9, 1 \text{ H}_2\text{O}$ (410,39) Ber. C 55,61 H 5,40% Gef. C 55,58 H 4,93%

7-(2,3-O-Carbonyl- α -noviosyloxy)-4-hydroxy-8-methyl-3-phenylazo-cumarin(5): 0,72 g Anilin wird in 28,8 ml 1N Salzsäure gelöst und bei 0–5° durch Zutropfen von 0,58 g Natriumnitrit, gelöst in wenig Wasser, diazotiert. Die Phenyl Diazoniumchloridlösung wird durch Zugabe von 2,88 g Natriumacetat in wenig Wasser gepuffert; hierauf tropft man eine alkoholische Lösung von 3,03 g 7-(2,3-O-Carbonyl- α -noviosyloxy)-4-hydroxy-8-methyl-cumarin zu. Man beobachtet die Bildung einer gelben Fällung, die filtriert und im Exsikkator über Phosphorpentoxid getrocknet wird. Sie lässt sich aus Essigester-Petroleumäther (Siedebereich 80–105°) kristallisieren und wird zur weiteren Reinigung aus Äthanol umgelöst. Man erhält 2,7 g gelbe Nadeln vom Smp. 154–155°. $[\alpha]_D^{22} = -121,5^\circ$ ($c = 1\%$, CHCl_3); UV.: $\lambda_{\text{max}} = 421 \text{ m}\mu$; IR.: $\nu(\text{CO}) = 1802$ und 1730 cm^{-1} .

$\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_9\text{N}_2$ (496,46) Ber. C 60,48 H 4,87 N 5,64% Gef. C 60,41 H 5,01 N 5,60%

3-Amino-7-(2,3-O-carbonyl- α -noviosyloxy(-4-hydroxy-8-methyl-cumarin (6). – a) 14,5 g der Substanz 9 werden in 250 ml Äthanol unter Zusatz von 2,0 g 5-proz. Palladiumkohle hydriert, wobei 500 ml Wasserstoff (Theorie 505 ml) aufgenommen werden. Man filtriert vom Katalysator ab und engt im Vakuum ein. Das ausgefallene, luftempfindliche Amin wird abfiltriert und aus Isopropanol umgelöst. Ausbeute 4,0 g; Zers.-P. 180°; UV.: $\lambda_{\text{max}} = 232, 283$ und $298 \text{ m}\mu$ ($\epsilon = 14600, 13000$ und 14400).

$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{O}_9\text{N}$ (407,37) Ber. C 56,02 H 5,20 N 3,44% Gef. C 55,75 H 5,15 N 3,50%

b) 2,64 g der Substanz 5 werden in 250 ml Essigester gelöst und in Gegenwart von 500 mg 5-proz. Palladiumkohle hydriert. Die Wasserstoffaufnahme beträgt 300 ml⁷⁾ (Theorie 239 ml). Der Katalysator wird abfiltriert und das Filtrat zuerst mit 0,1N Schwefelsäure und dann sorgfältig mit Wasser neutral gewaschen. Die über Natriumsulfat getrocknete Lösung wird filtriert und im Vakuum zur Trockne verdampft. Das Harz wird aus Isopropanol umgelöst: Ausbeute 1,1 g Amin; Zers.-P. 182°.

3-(Benzyloxycarbonyl-amino)-4,7-dihydroxy-8-methyl-cumarin (7): 2,07 g 3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methyl-cumarin [5] [12] werden in 30 ml 1N Natronlauge gelöst. Unter Rühren und Kühlen werden 2,04 g Chlorameisensäure-benzylester bei 0–5° zugetropft. Anschliessend wird noch 2 Std. gerührt, dann mit 3N Salzsäure angesäuert und die ausgefallene Substanz filtriert. Sie kristallisiert aus Acetonitril-Wasser. Durch Umkristallisieren aus demselben Lösungsmittelgemisch erhält man 3,0 g vom Smp. 236–237°. IR.: $\nu(\text{CO}) = 1755$ und 1685 cm^{-1} .

$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{O}_6\text{N}$ (341,31) Ber. C 63,34 H 4,43 N 4,10% Gef. C 63,30 H 4,52 N 4,15%

4-Benzyloxy-3-(benzyloxycarbonyl-amino)-7-hydroxy-8-methyl-cumarin (8): 5,0 g der Substanz 7 werden in der Wärme in 350 ml abs. Dioxan gelöst, bei 50° mit 47 ml 0,5M Phenyl Diazomethanlösung in tiefsiedendem Petroläther (Siedebereich 40–45°) versetzt und über Nacht stehengelassen. Es wird dann im Vakuum abgedampft und der Rückstand mit Essigester-Äther verrieben. Die kristalline Substanz wird filtriert und aus Acetonitril umgelöst. Man erhält 3,2 g vom Smp. 228–229°. Zur Analyse wird noch aus Nitromethan umgelöst: Smp. 232–234°. IR.: $\nu(\text{CO}) = 1722$ und 1675 cm^{-1} .

$\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{N}$ (431,43) Ber. C 69,59 H 4,91% Gef. C 69,52 H 4,82%

4-Benzyloxy-3-(benzyloxycarbonyl-amino)-7-(2,3-O-carbonyl- α -noviosyloxy)-8-methyl-cumarin(9): 17,0 g der Substanz 8 (39,4 mMol) werden in 300 ml frisch destilliertem Chinolin gelöst. Man fügt 15,0 g Silberoxid und 18 g frisch geglyhtes Calciumsulfat zur Lösung. Unter gutem Rühren der Suspension gibt man in einer Portion 43,1 mMol frisch hergestelltes⁸⁾ 2,3-O-Carbonyl- β -noviosylchlorid (1) in 50 ml destilliertem Chinolin hinzu. Man beobachtet eine leicht exotherme Reaktion (25 → 32°). Das Reaktionsgemisch wird 4 Std. gerührt und anschliessend mit Essigester verdünnt. Nach der Filtration der Silbersalze durch Speedex wird das klare, rotbraune Filtrat nacheinander mit verdünnter Phosphorsäure, Salzsäure, Natriumcarbonatlösung und Wasser gewaschen. Die organische Phase wird mit Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum zur Trockne ein-

7) Der Grund für die in mehreren Ansätzen festgestellte Überhydrierung ist nicht bekannt.

geengt. Der Rückstand besteht aus einem dunkelbraunen Öl (25,3 g). Es wird zur Reinigung in wenig Benzol gelöst an 400 g Silicagel (MERCK) adsorbiert. Man erhält mit 6 l Benzol-Äther (95:5) 8,5 g gelbes Öl (Fraktion A), mit 6 l Benzol-Äther (4:1) 13,4 g einer grüngelben, dickflüssigen Masse (Fraktion B). Die beiden Fraktionen A und B werden getrennt nochmals chromatographiert: *Fraktion B* wird in wenig Benzol-Äther (95:5) an 140 g Silicagel (MERCK) adsorbiert. Mit 2 l Benzol-Äther (95:5) werden 5,1 g, mit Benzol-Äther (9:1) 6,4 g eluiert. Beide Fraktionen zeigen im IR.-Absorptionsspektrum bei 1780 cm^{-1} die erwartete Bande des Cyclo-carbonat-carbonyls. *Fraktion A* wird in wenig Benzol-Äther (99:1) an 100 g Silicagel (MERCK) adsorbiert. Das mit 4 l desselben Lösungsmittelgemisches erhaltene Eluat wird verworfen. Mit 2 l Benzol-Äther (9:1) werden noch 3,0 g Substanz eluiert, die im IR.-Absorptionsspektrum Carbonat anzeigt. Alle diese Fraktionen konnten nicht zur Kristallisation gebracht werden. Sie wurden für die nächste Stufe direkt verwendet.

3-[4-Acetoxy-3-isopenten-(2')-yl-benzamido]-7-(2,3-O-carbonyl- α -noviosyloxy)-4-hydroxy-8-methyl-cumarin (**10**): Zu einer Lösung von 2,04 g 3-Amino-7-(2,3-O-carbonyl- α -noviosyloxy)-4-hydroxy-8-methyl-cumarin (**6**) in 10 ml absolutem Pyridin werden 1,42 g 4-Acetoxy-3-isopenten-(2')-yl-benzoylchlorid [5b], in 5 ml absolutem Pyridin gelöst, gegeben und 12 Std. bei Raumtemperatur gehalten. Die Reaktionsmischung wird mit 300 ml Essigester verdünnt und mit 3N Schwefelsäure und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wird das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Es verbleiben 2,05 g Harz, das zur Reinigung in wenig Benzol an 20 g Silicagel (MERCK) adsorbiert wird. Das Benzoleluat (600 ml) wird verworfen. Man erhält mit 600 ml Benzol-Äther (95:5) 810 mg Substanz, die aus Methanol kristallisiert. Nach dem Umlösen aus demselben Lösungsmittel verbleiben 700 mg vom Smp. $172\text{--}173^\circ$. $[\alpha]_D^{23} = -58,5^\circ$ ($c = 1,0\%$, CHCl_3); UV.: $\lambda_{\text{max}} = 321\text{ m}\mu$ ($\epsilon = 19100$); IR.: $\nu(\text{CO}) = 1822, 1760$ und 1692 cm^{-1} .

$\text{C}_{33}\text{H}_{25}\text{O}_{12}\text{N}$ (637,62) Ber. C 62,18 H 5,53 N 2,19% Gef. C 62,03 H 5,67 N 2,18%

Novobiocin = 7-(3-Carbamoyl- α -noviosyloxy)-4-hydroxy-3-[4-hydroxy-3-isopenten-(2')-yl-benzamido]-8-methyl-cumarin (**11**): 700 mg der Verbindung **10** werden in 30 ml flüssigem Ammoniak gelöst und innert 2 Std. das Ammoniak wieder verdampft. Das gelbliche Harz wird aus 5 ml Aceton und 3 ml Wasser kristallisiert und noch 2mal aus Methanol-Eisessig-Wasser (10:4:1) umgelöst. Man erhält 68 mg Novobiocin vom Smp. $159\text{--}161^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = -62^\circ$ ($c = 1\%$, Äthanol). IR.: $\nu(\text{OH}) = 3450\text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{NH}) = 3330\text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{CO}) = 1715$ und 1688 cm^{-1} .

$\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{O}_{11}\text{N}_2 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ (614,63) Ber. C 59,02 H 6,07 N 4,43% Gef. C 59,01 H 6,20 N 4,21%

Das IR.-Absorptionsspektrum ist identisch mit demjenigen des natürlichen Antibioticums Novobiocin⁸⁾. Das synthetische und das natürliche Präparat zeigen dieselbe mikrobiologische Aktivität gegenüber dem Testorganismus *Staphylococcus aureus* P 6538.

3-(4-Acetoxy-3-isopentyl-benzamido)-4-benzyloxy-7-hydroxy-8-methyl-cumarin (**14**): 4,2 g (25 mMol) 3-(4-Acetoxy-3-isopentyl-benzamido)-4,7-dihydroxy-8-methyl-cumarin [5b] werden in 100 ml Aceton in der Wärme gelöst. Zur Lösung fügt man tropfenweise bei 25° 50 ml 0,25M Phenyl-diazomethanlösung in tiefsiedendem Petroleumäther (Siedebereich $40\text{--}45^\circ$). Es tritt während des Eintropfens Kristallisation ein. Nach 3 Std. Rühren wird filtriert. Man erhält 2,65 g vom Smp. $254\text{--}256^\circ$. IR.: $\nu(\text{OH} + \text{NH}) = 3250\text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{CO}) = 1760, 1695$ und 1660 cm^{-1} .

$\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{O}_7\text{N}$ (529,57) Ber. C 70,30 H 5,90% Gef. C 69,95 H 6,20%

3-(4-Acetoxy-3-isopentyl-benzamido)-4-benzyloxy-7-(2,3-O-carbonyl- α -noviosyloxy)-8-methyl-cumarin (**15**): 5,15 g der Verbindung **14** werden in 100 ml frisch destilliertem Chinolin durch Erwärmen auf 115° in Lösung gebracht. Nach dem Abkühlen der Lösung fügt man 4,3 g Silberoxid und 8,6 g frisch geglühtes Calciumsulfat hinzu. Die Suspension wird gerührt und bei 25° das 2,3-O-Carbonyl- β -noviosylchlorid (**1**) (frisch hergestellt aus 2,5 g Methyl-2,3-O-carbonyl-noviosid, vgl.⁸⁾) in 25 ml dest. Chinolin zugetropft. Nach 4stdg. Rühren wird mit 300 ml Essigester verdünnt und die ausgeschiedenen Salze über Cellit abfiltriert. Das rotbraune Filtrat wird mit 3N Schwefelsäure und mit Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Abdampfen des Essigesters im Vakuum verbleiben 5,5 g eines rotbraunen Öls. Es wird zur Reinigung in wenig Benzol gelöst und an 110 g Silicagel (MERCK) adsorbiert. Das Benzoleluat (2 l), das 800 mg

⁸⁾ Isoliert aus Albamycin (UPJOHN).

Öl enthält, wird verworfen. 2,2 l Benzol-Äther (9:1) lösen 2,4 g eines ockerfarbenen Harzes ab; $[\alpha]_D = -13,5^\circ$ ($c = 1\%$, CH_2Cl_2).

3-(4-Acetoxy-3-isopentyl-benzamido)-7-(2,3-O-carbonyl- α -noviosyloxy)-4-hydroxy-8-methyl-cumarin (16): 2,4 g der Verbindung **15** werden in 50 ml Methanol in Gegenwart von 500 mg 5-proz. Palladiumkohle hydriert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum verbleiben 1,8 g eines gelblichen Harzes, das in wenig Methanol gelöst zur Kristallisation gebracht wird. Nach dem Umlösen aus demselben Lösungsmittel erhält man 600 mg gelbe derbe Kristalle vom Smp. 110–111°. $[\alpha]_D^{20} = -50^\circ$ ($c = 1\%$, CH_2Cl_2); IR.: $\nu(\text{CO}) = 1810, 1760, 1695$ und 1615 cm^{-1} .

$\text{C}_{33}\text{H}_{37}\text{O}_{12}\text{N}$ (639,64) Ber. C 61,95 H 5,83 N 2,19% Gef. C 61,69 H 6,25 N 2,32%

Dihydronovobiocin und Dihydro-isonovobiocin (Gemisch): 600 mg der Verbindung **16** werden in 25 ml flüssigem Ammoniak gelöst und dieses nach 2 Std. verdampft. Der Rückstand wird in wenig Essigester aufgenommen, die Lösung mit 20 ml 1N Natronlauge extrahiert und das alkalische Filtrat sogleich in 30 ml 1N Schwefelsäure eingetropft. Die Suspension wird mit Essigester extrahiert und dieser anschließend mit Wasser neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum abgedampft. Das gelbliche Harz konnte nicht zur Kristallisation gebracht werden. $[\alpha]_D^{23} = -50,50$ ($c = 1\%$, CH_2Cl_2). IR.: $\nu(\text{OH}) = 3400 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{NH}) = 3340 \text{ cm}^{-1}$; $\nu(\text{CO}) = 1715$ und 1685 cm^{-1} . Die Abwesenheit der IR.-Absorption bei 1810 cm^{-1} (Carbonat) lässt die Schlussfolgerung zu, dass vollständige Ammonolyse stattgefunden hat.

Das erhaltene Gemisch der beiden zu erwartenden Isomeren zeigt 80% der mikrobiologischen Aktivität des Dihydronovobiocins gegenüber dem Prüfungsorganismus *Staphylococcus aureus* P 6538. Bezogen auf diese Aktivität besteht das Gemisch aus 80% Dihydronovobiocin und 20% des inaktiven Dihydro-isonovobiocins.

Äquilibrierungsversuch: Dihydronovobiocin in flüssigem Ammoniak: 500 mg Dihydronovobiocin mit einer mikrobiologischen Aktivität = 100 gegenüber dem Prüfungsorganismus *Staphylococcus aureus* P 6538 werden in 25 ml flüssigem Ammoniak gelöst und dieses nach 2 Std. verdampft. Die Aufarbeitung geschieht in Analogie zu **11**. Der Smp., die spezifische Drehung, sowie die mikrobiologische Aktivität des erhaltenen Produktes entsprechen denjenigen des Ausgangsmaterials. Es gilt die Schlussfolgerung, dass die ammonolytische Ringöffnung der Cyclocarbonat-Gruppe nicht mit einer Äquilibrierung der beiden Isomeren verbunden ist.

SUMMARY

The glycosidation of 4-benzyloxy-7-hydroxy-8-methyl-cumarin (**2**) with 2,3-O-carbonyl- β -noviosyl chloride (**1**) leading to the α -glycoside (**3**) is described. This intermediate is transformed successively: (a) by hydrogenolysis (**4**), (b) introduction of an amine function (**5**) (**6**), (c) acylation with 4-acetoxy-3-(isopent-2'-enyl)-benzoyl chloride (**10**), (d) ammonolysis of **10**, into a mixture of novobiocin (**11**) and isonovobiocin (**12**), of which novobiocin was obtained by fractional crystallisation.

Chemische Forschungsabteilung der
F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Novobiocin II: B. P. VATERLAUS, J. KISS & H. SPIEGELBERG, *Helv.* **47**, 381 (1964).
- [2] B. P. VATERLAUS & H. SPIEGELBERG, *Helv.* **47**, 508 (1964).
- [3] B. P. VATERLAUS, K. DOEBEL, J. KISS, A. I. RACHLIN & H. SPIEGELBERG, *Experientia* **19**, 383 (1963).
- [4] E. WALTON, J. O. RODIN, F. W. HOLLY & K. FOLKERS, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 1489 (1960).
- [5] a) C. F. SPENCER, C. H. STAMMER, J. O. RODIN, E. WALTON, F. W. HOLLY & K. FOLKERS, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 2655 (1956); b) C. F. SPENCER, C. H. STAMMER, J. O. RODIN, E. WALTON, F. W. HOLLY & K. FOLKERS, *ibid.* **80**, 140 (1958).
- [6] C. S. HUDSON, *J. Amer. chem. Soc.* **37**, 66 (1909).
- [7] J. W. HINMAN, E. L. CARON & H. HOEKSEMA, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 3789 (1957).
- [8] C. M. McCLOSKEY, *Advances Carbohydrate Chemistry* **12**, 148 (1957).

- [9] A. J. BIRCH, private Mitteilung.
 [10] F. R. BATCHELOR, F. P. DOYLE, J. U. C. NAYLER & G. N. ROBINSON, *Nature* **183**, 257 (1957).
 [11] R. B. MORIN, B. G. JACKSON, E. H. FLYNN & R. W. ROESKE, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 3400 (1962).
 [12] a) J. W. HINMAN, H. HOEKSEMA, E. L. CARON & W. G. JACKSON, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 1072 (1956); b) C. H. STAMMER, E. WALTON, A. N. WILSON, R. W. WALKER, N. R. TRENNER, F. W. HOLLY & K. FOLKERS, *ibid.* **80**, 137 (1958); c) C. H. SHUNK, C. H. STAMMER, E. A. KACZKA, E. WALTON, C. F. SPENCER, A. N. WILSON, J. W. RICHTER, F. W. HOLLY & K. FOLKERS, *ibid.* **78**, 1770 (1956).
 [13] J. W. HINMAN, E. L. CARON & H. HOEKSEMA, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 5321 (1957).
 [14] Brit. Pat. 878907 (UPJOHN Co, Kalamazoo Mich. USA).
 [15] Schweiz. Patentschrift Nr. 361361 (MERCK & Co. INC., Rahway N. J. USA).
 [16] E. A. KACZKA, C. H. SHUNK, J. W. RICHTER, F. J. WOLF, M. M. GASSER & K. FOLKERS, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 4125 (1956).
 [17] A. FURLENMEIER, C. v. PLANTA & B. P. VATERLAUS, Kurzreferat, XIXth International Congress of Pure and Applied Chemistry, 10.-17. Juli 1963 (London).

50. Novobiocin IV[1]¹⁾

Die Synthese von *epi*-Noviose und deren Epimerisierung zu Noviose²⁾

von J. Kiss und H. Spiegelberg

(18. XII. 63)

Im Zusammenhang mit unseren Versuchen zur Totalsynthese von Novobiocin [2] haben wir auch *epi*-Noviose (5,5-Di-C-methyl-4-O-methyl-L-xylose) synthetisiert und deren Epimerisierung zu Noviose (5,5-Di-C-methyl-4-O-methyl-L-lyxose) durchgeführt.

		6	CH ₂ -OH	6		
1		5	HO-C-H	5		1
2	H-C-OH	4	HO-C-H	4	HO-C-H	2
3	H-C-OH	3	H-C-OH	3	H-C-OH	3
4	CH ₃ O-C-H	2	HO-C-H	2	CH ₃ O-C-H	4
5		1		1		5
	Noviose		D-Glucose		<i>epi</i> -Noviose	

¹⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 407.

²⁾ Vortrag J. Kiss im Birkbeck College (University of London) am 23. 10. 1962 (Syntheses in the Field of Noviose and Allied Compounds).