

63. Zur Struktur von Papulacandin B, einem neuen antifungischen Antibiotikum¹⁾

Vorläufige Mitteilung

von Peter Traxler, Hans Fritz und Wilhelm J. Richter

Departement Forschung, Division Pharma und Physikalische Abteilung,
Zentrale Funktion Forschung Ciba-Geigy AG, CH-4000 Basel.

(2. II. 1977)

On the structure of Papulacandin B, a new antibiotic with antifungal activity

Summary

Structure **1** has been established for Papulacandin B (C₄₇H₆₄O₁₇), a new antibiotic from *Papularia sphaerosperma* (PERS.) HÖHNEL by means of spectral analysis of **1** and some derivatives and degradation products. Base catalysed hydrolysis of **1** gave the two unsaturated fatty acids **2** and **3** and the spirocyclic diglycosid **4**. The structure of **4** was determined by further degradation reactions.

Nach der Suche von neuen Antibiotika konnte aus Kulturen von *Papularia sphaerosperma* (PERS.), HÖHNEL²⁾ [1] ein neuer antibiotischer Komplex isoliert werden, der Papulacandin genannt wurde [2]. Von den bis heute isolierten und charakterisierten fünf strukturell eng verwandten Komponenten bildet Papulacandin B (**1**) die Hauptkomponente. Die Papulacandine zeigen alle sehr gute Aktivität gegen Sprosspilze, vor allem gegen *Candida albicans* [3] [4].

Papulacandin B (**1**) besitzt die Summenformel C₄₇H₆₄O₁₇ (Mol.-Gewicht 900). UV.-Spektrum: Vier Maxima bei 232, 240, 268 und 300 nm. Die UV.-Maxima sowie die IR.-Banden bei 1690, 1645 und 1620 cm⁻¹ deuten auf eine oder mehrere ungesättigte Estergruppen hin. Im 360-MHz-NMR.-Spektrum des Papulacandins B (s. Fig. 1) erkennt man die Signale mehrerer Methylgruppen bei 0,9 ppm und einer vinylicischen Methylgruppe bei 1,7 ppm. Im Bereiche 5,5 bis 8 ppm liegen die Signale zahlreicher olefinischer Protonen. Die beiden doppelten Dublette bei 7,2 ppm und 7,8 ppm lassen

¹⁾ Vorgetragen an der Herbstversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft vom 7.–10. Oktober 1976 in Genf.

²⁾ Wir danken Herrn Prof. E. Müller, Institut für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, für die Art-Bestimmung.

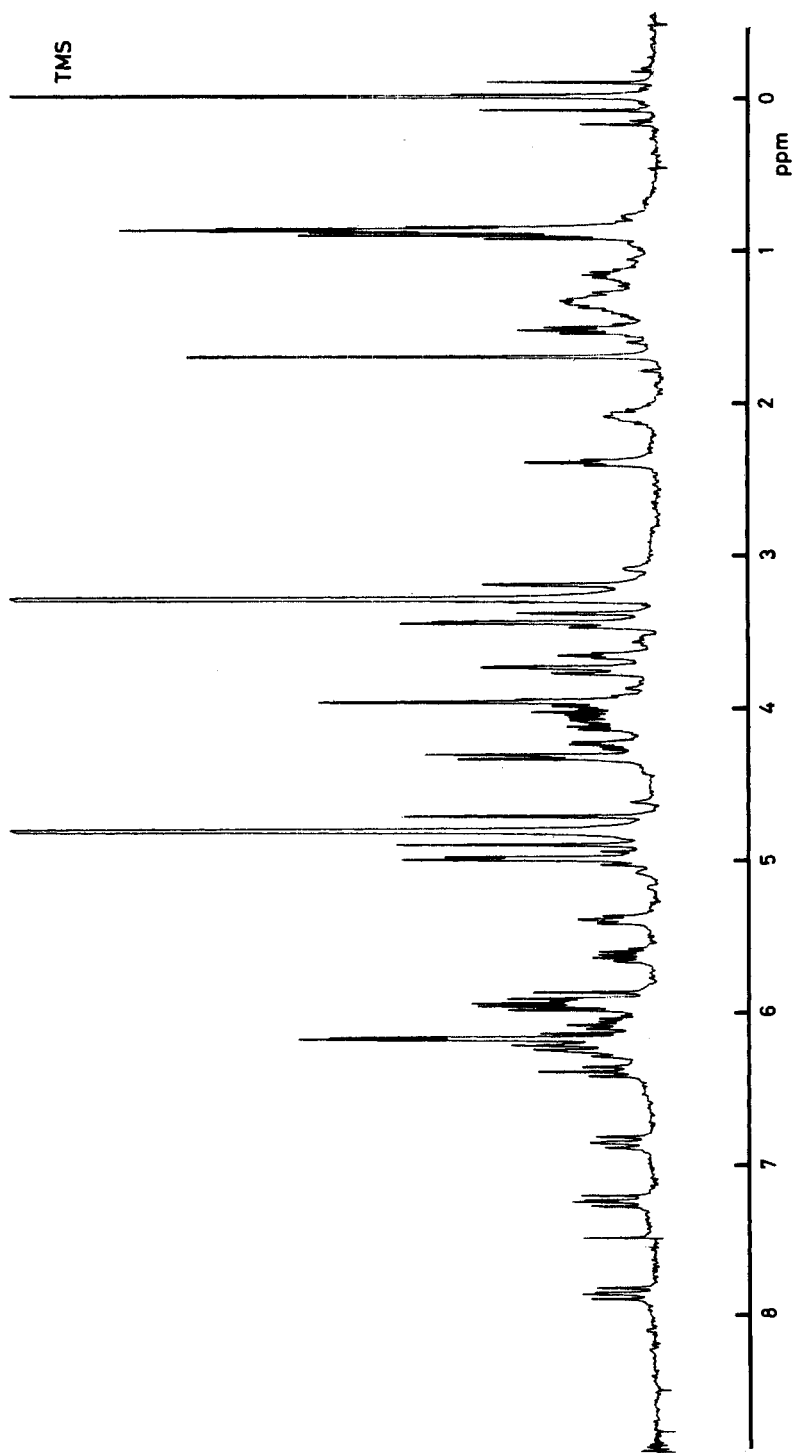


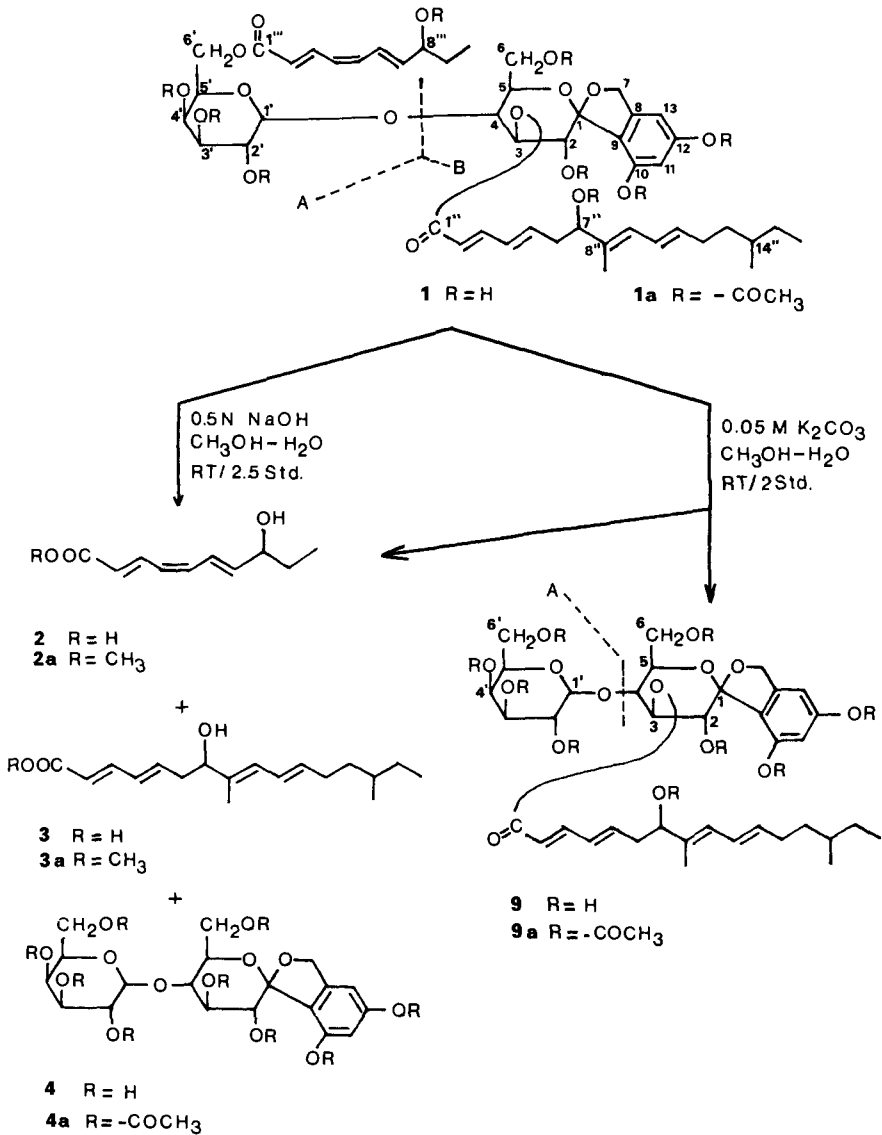
Fig. 1. 360-MHz-NMR.-Spektrum von Papulacandin B (1) in CD_3OD ³⁾

³⁾ Aufgenommen auf einem HX-360-Instrument der Fa. Bruker-Spectrospin. Wir danken der Fa. Spectrospin in Fällanden für die Möglichkeit zur Aufnahme der 360-MHz-NMR.-Spektren.

Protonen in β -Stellung zu einer Carbonylgruppe vermuten. Im ^{13}C -NMR.-Spektrum sind die Signale von 46–48 C-Atomen erkennbar. Die hohe Zahl von Methylen- und Methingruppen neben Sauerstoffatomen im NMR.- und ^{13}C -NMR.-Spektrum deuten auf die Anwesenheit von mindestens einem Zuckerbaustein hin⁴⁾.

Bei der Hydrierung von **1** wurden 7 Mol Wasserstoff aufgenommen. Im NMR.-Spektrum des Hydrierungsproduktes sind die olefinischen Protonen und die vinyl-

Schema 1. Abbaureaktionen von *Papulacandin B* (1)



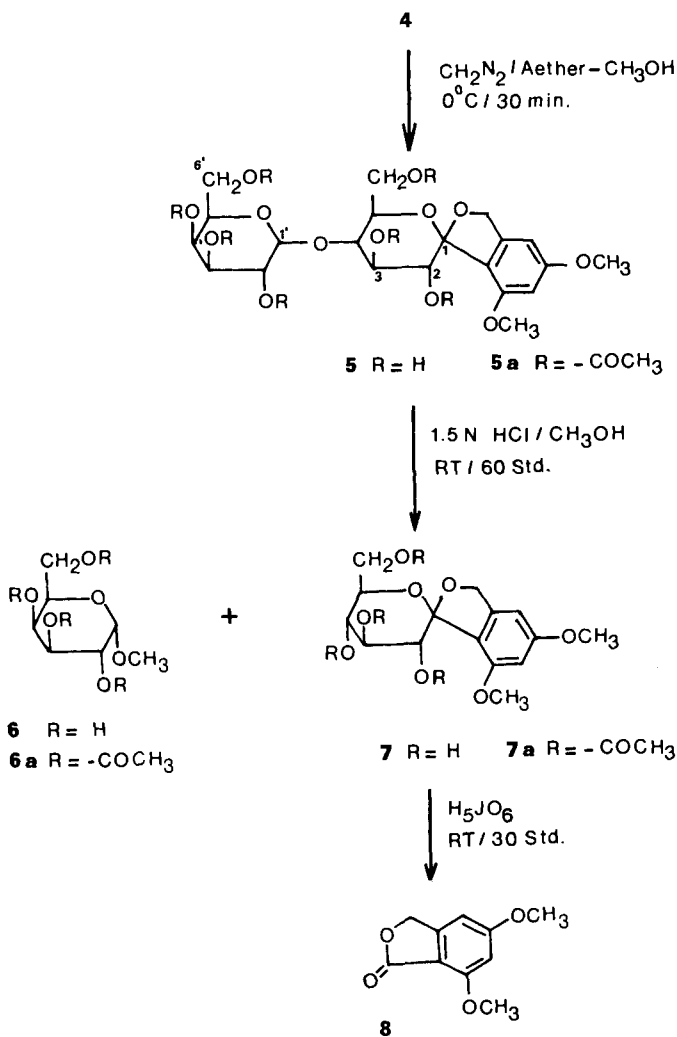
4) Eine ausführliche Diskussion dieser Spektren wird in einer späteren Mitteilung erfolgen.

sche Methylgruppe verschwunden. Acetylierung von **1** lieferte ein Polyacetat **1a**. Im 360-MHz-NMR.-Spektrum waren 9 Acetatgruppen zählbar.

Aufschluss über die Struktur von **1** ergab eine basische Hydrolyse mit 0,5N NaOH. Es konnten dabei 3 Bruchstücke isoliert werden, nämlich die zwei mehrfach ungesättigten Fettsäuren **2** und **3** und das spirocyclische Diglycosid **4**, «Zuckerteil» genannt (s. *Schema 1*).

Die Struktur der dreifach konjugierten Fettsäure **2** (C₁₀H₁₄O₃, UV.-Spektrum: Maximum bei 299 nm) ergab sich aus der Interpretation der ¹H-NMR.- und ¹³C-NMR.-Spektren des Methylesters **2a** (MS.: M⁺ bei m/e 196). Die Kopplungs-

Schema 2. Abbau des «Zuckerteils» **4**



konstanten im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum sprechen für eine *trans-cis-trans*-Anordnung der Doppelbindungen⁴).

Die Strukturermittlung der zweiten Fettsäure **3** ($\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_3$, UV.-Spektrum: Maxima bei 240 und 252 nm) erfolgte durch spektroskopische Untersuchung des Methylesters **3a** (M^+ bei m/e 306)⁴), wie für **2a**.

Das dritte Bruchstück der basischen Hydrolyse, das spirocyclische Diglycosid **4** ($\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$; M^+ des Nonaacetats **4a** bei m/e 840), wurde zur Aufklärung seiner Struktur weiter abgebaut (s. *Schema 2*). Verätherung der beiden phenolischen Hydroxylgruppen mit Diazomethan ergab den Dimethyläther **5** ($\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_{13}$; M^+ des Heptaacetats **5a** bei m/e 784). Methanolyse von **5** mit 1,5 N methanolischer Salzsäure

Tabelle 1. Ausgewählte NMR.-Daten von Papulacandin B (**1**), Tetradecahydro-papulacandin B, seinem Nonaacetat, sowie von einigen Abbauprodukten des Papulacandins B

(Chemische Verschiebung δ in ppm; in Klammern die Kopplungskonstanten J in Hz)

Verbindung	H-C(2)	H-C(3)	H-C(1')	H-C(2')	H-C(3')	H-C(5')	H-C(6')
Papulacandin B (1)	4,32 <i>d</i> (10)	5,44 <i>t</i> (10)	ca. 4,3 ^{b)}	^{a)}	^{a)}	3,65 <i>t</i> (5,5)	4,11 <i>d</i> × <i>d</i> (7/11) 4,25 <i>d</i> × <i>d</i> (5,5/11)
Tetradecahydro- papulacandin B	4,33 <i>d</i> (10)	5,36 <i>t</i> (10)	4,30 <i>d</i> (8)	ca. 3,5 ^{b)}	ca. 3,5 ^{b)}	3,65 <i>t</i> (5)	4,20 <i>d</i> × <i>d</i> (5/11) 4,25 <i>d</i> × <i>d</i> (7/11)
Tetradecahydro- papulacandin B- Nonaacetat	5,61 <i>d</i> (10)	5,55 <i>t</i> (10)	4,45 <i>d</i> (8)	5,10 <i>d</i> × <i>d</i> (8/10)	4,90 <i>d</i> × <i>d</i> (4/10)	^{a)}	^{a)}
4a	5,75 <i>d</i> (10)	5,66 <i>d</i> × <i>d</i> (10/10)	4,60 <i>d</i> (8)	5,25 <i>d</i> × <i>d</i> (8/10)	5,06 <i>d</i> × <i>d</i> (4/10)	4,01 <i>m</i> ^{b)}	4,15 ^{b)}
7	4,17 <i>d</i> (10)	3,69 <i>t</i> (10)	–	–	–	–	–
7a	5,81 <i>d</i> (10)	5,47 <i>t</i> (10)	–	–	–	–	–
9	4,33 <i>d</i> (10)	5,40 <i>t</i> (10)	4,28 <i>d</i> (8)	ca. 3,5 <i>d</i> × <i>d</i> ^{b)} (8/10)	ca. 3,5 <i>d</i> × <i>d</i> ^{b)} (4/10)	nach höherem Feld verschoben ^{a)}	
β -D-O-Methylga- lactopyranosid- tetraacetat [6]	–	–	4,45 <i>d</i> × <i>d</i> (1,5/7,4)	5,21 <i>d</i> × <i>d</i> (7,8/10,5)	5,06 <i>d</i> × <i>d</i> (3,0/10,5)	3,98 <i>m</i> ^{b)} (1,5/6,4)	4,19 <i>AB</i> ₂ ^{b)}

^{a)} Die Lage konnte nicht genau bestimmt werden, da Überlagerung mehrerer Protonen.

^{b)} Das Signal wird durch andere Signale ganz oder teilweise überdeckt.

lieferte hauptsächlich zwei Produkte, nämlich α -D-O-Methylgalactopyranosid (**6**), dessen Tetraacetat **6a** nach allen Kriterien mit Referenzmaterial identisch war, und Verbindung **7** (C₁₅H₂₀O₈, M⁺ bei m/e 328), die durch Perjodsäureoxydation in 5,7-Dimethoxyphthalid (**8**) (C₁₀H₁₀O₄, M⁺ bei m/e 194) übergeführt wurde, dessen spektroskopische Werte mit den Daten der Literatur übereinstimmen [5].

Bei einer selektiven basischen Hydrolyse von Papulacandin B (**1**) mit 0,05M K₂CO₃ konnte neben der schon erwähnten Fettsäure **2** als Produkt einer partiellen Hydrolyse **9** isoliert werden (s. *Schema 1*).

Die Art des zweiten Zuckers im «Zuckerteil» **4**, seine Verknüpfung mit dem Galactoserest sowie auch die Verknüpfung der drei Hydrolysenbruchstücke **2**, **3** und **4** untereinander ergab sich aus der Interpretation der 360-MHz-NMR.- und der Massenspektren von Papulacandin B (**1**) sowie von einigen Derivaten und Abbauprodukten von **1** (s. Tab. 1)⁵.

Durch Vergleich mit den Literaturwerten von β -D-O-Methylgalactopyranosid-tetraacetat [**6**] konnten im Zuckeracetat **4a** die Protonen an C(1') bis C(6') zugeordnet werden. Aus den Kopplungskonstanten von je 10 Hz ergab sich die β -*trans*-Verknüpfung mit **7**. In den Spektren von **7** und dessen Tetraacetat **7a** konnten mit Hilfe von Entkopplungsversuchen die Protonen 2 bis 6 lokalisiert werden. Die Kopplungskonstanten von 10 Hz sprechen für eine *trans*-äquatoriale Anordnung der Hydroxylgruppen. Beim zweiten Zuckerbaustein handelt es sich somit um eine Glucose, die spiroständig mit dem aromatischen Rest verbunden ist. Die Konfiguration dieser Verknüpfung ist noch offen⁶.

Die Zuordnung der Zuckerprotonen, wie sie im acetylierten Zuckerteil **4a** getroffen wurde, lässt sich sehr gut auch auf Tetradeceahydropapulacandin B-Nonaacetat übertragen (s. Tab. 1). Vergleicht man die Lage der C(2)- und C(3)-Protonen, wie sie im Hydrierungsprodukt von Papulacandin B gefunden wurde, mit derjenigen seines Acetats, so sieht man, dass das C(3)-Proton bei tiefem Feld, nämlich bei 5,36 ppm als Triplett erscheint, also bei ähnlichem Feld wie im Nonaacetat **4a** oder auch im acetylierten Abbauprodukt **7a**. Aus dieser Lage ist zu schliessen, dass die C(3)-Hydroxylgruppe in Papulacandin B (**1**) in acylierter Form vorliegt und somit mit einer der beiden Fettsäuren verestert ist. Andererseits erscheint das C(2)-Proton in Tetradeceahydropapulacandin B bei 4,33 ppm als Dublett, bei ähnlichem Feld also, wie in der unacetylierten Verbindung **7**. Daraus folgt, dass die C(2)-Hydroxylgruppe frei vorliegen muss.

Im 360-MHz-NMR.-Spektrum von **9** (s. Tab. 1) fehlen alle Signale der Fettsäure **2**, während jene der Fettsäure **3** vorhanden sind. Das C(2)- und das C(3)-Proton erscheinen wiederum bei gleichem Feld wie bei Papulacandin B (**1**). Somit muss die C(3)-Hydroxylgruppe mit der Fettsäure **3** verestert sein.

Es bleibt noch die Verknüpfung der kurzen Fettsäure **2** mit dem Zuckerteil **4** abzuklären. Zwei Multiplette, die in **1** bei 4,11 und 4,25 ppm gefunden wurden, können den beiden Protonen einer CH₂-OH-Gruppe zugeordnet werden. Ihre Kopplung

⁵) Eine Röntgenstrukturanalyse des Di-(*p*-brombenzyl)äthers von **4** ist in Bearbeitung.

⁶) Sowohl konventionelle Elektronenstoss(EI)-, als auch Felddesorptions(FD)-Massenspektren wurden mit einem *Varian* MAR CH 5 DF Massenspektrometer mit FD/FI/EI-Kombinationsquelle aufgenommen.

mit dem benachbarten C(5)-Proton, das bei 3,65 ppm als Tripletts erscheint, konnte durch Doppelresonanzversuche gezeigt werden. In **9**, Produkt der partiellen Hydrolyse, sind hingegen sowohl die beiden Multiplette als auch das Tripletts nach höherem Feld verschoben, wo sie nicht lokalisiert werden konnten, da von den Signalen anderer Protonen überlagert. Dies spricht eindeutig für eine Veresterung der kurzen Fettsäure mit einer der beiden primären C(6)-Hydroxylgruppen von **4**. Die Massenspektren von Papulacandin B (**1**) sowie diejenigen der Derivate **1a** und **9a** bestätigten diese Annahme. Im Felddesorptionsmassenspektrum von **1**⁶) wurde ein Bruchstück (A+H)⁺ mit der Masse *m/e* 344 gefunden, das dem Ester der Galactose mit der kurzen Fettsäure entspricht. Das dazu entsprechende Bruchstück B wurde bei *m/e* 556 gefunden. In den EI.-Spektren von **1a** wurde Rest A ohne zentrales Sauerstoffatom als Produkt der Spaltung der C(1)'-O-Bindung bei *m/e* 495 registriert und ist, der Absättigung von drei Doppelbindungen entsprechend, im Tetradehydro-Derivat nach *m/e* 501 verschoben. Im Massenspektrum von **9a**, wo die kurze Fettsäure durch einen Acetatrest ersetzt ist, erscheint dieses Bruchstück erwartungsgemäss bei *m/e* 331 (Basisspektrum⁴). Mit diesen Befunden ist auch die Verknüpfung der kurzen Fettsäure **2** mit der primären C(6)'-Hydroxylgruppe der Galactose gesichert. Papulacandin B darf aufgrund der bisherigen Ergebnisse Struktur **1** zugeordnet werden.

Wir danken den Herren Dres. *H. Bickel* und *J. Nüesch* für das Interesse, das sie dieser Arbeit entgegengebracht haben.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *M. B. Ellis*, «Dematiou Hyphomycetes», The Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 1971.
 - [2] *J. Gruner* & *P. Traxler*, *Experientia*, in Druck.
 - [3] *Ciba-Geigy AG*, Patent DOS 2 609 611 mit Priorität v. 13.3.75.
 - [4] *P. Traxler*, *J. Gruner* & *J. A. L. Auden*, *J. of Antibiotics*, in Druck.
 - [5] *E. M. Howells* & *G. T. Newbold*, *J. chem. Soc.* 4592 (1965).
 - [6] *H. Libert*, *J. Schuster* & *L. Schmid*, *Chem. Ber.* 101, 1902 (1968).
-