

129. Cyclopeptid-Antibiotika aus *Aspergillus*-Arten. Struktur der Echinocandine C und D¹⁾

von René Traber, Camilla Keller-Juslén, Hans-Rudolf Loosli, Max Kuhn und Albert von Wartburg
Sandoz AG, Pharma Departement, Chemische Forschung, CH-4002 Basel, Schweiz

(19.III.79)

Cyclopeptide antibiotics from *Aspergillus* species. Structure of echinocandins C and D

Summary

The echinocandins B, C and D are antifungal antibiotics produced by a strain of *Aspergillus rugulosus*. All three metabolites are closely related representing cyclic oligopeptides composed of six amino acids and a linolic acid residue in an amide linkage. The complete structure of echinocandin B (**1**) has recently been established by X-ray analysis. Structural assignments to the new minor metabolites C and D have now been made by hydrolytic and oxidative cleavage reactions, formation of *N*-acyl- α -aminoethers as well as by chemical correlations and extensive NMR. examinations. Echinocandin C (**2**), $C_{52}H_{81}N_7O_{15}$, contains 3-hydroxyhomotyrosine in the place of 3,4-dihydroxyhomotyrosine present in **1**. Echinocandin D (**3**), $C_{52}H_{81}N_7O_{13}$, differs in two amino acids: 3,4-dihydroxyhomotyrosine and 4,5-dihydroxyornithine, unusual units of **1** being replaced by 3-hydroxyhomotyrosine and ornithine.

Bei unserem mikrobiologischen Screening auf neue Antibiotika isolierten wir aus einer am Jaunpass (Schweiz) gesammelten Bodenprobe einen *Aspergillus*-Stamm (NRRL 8039), der in Submerskultur ein Gemisch antifungisch aktiver Metabolite produzierte [1]. Der neue Stamm NRRL 8039 liess sich aufgrund seiner charakteristischen morphologischen Merkmale nach *Raper & Fennel* [2] als *Aspergillus rugulosus* THOM & RAPER bestimmen. Zur Gewinnung des Wirkstoffkomplexes wurde die Kulturbrühe mit Essigester ausgerührt. Aus dem anfallenden Rohextrakt konnten durch wiederholte Chromatographie an Kieselgel und Gel-filtration an Sephadex LH-20 drei einheitliche, strukturell nahe verwandte Peptidantibiotika (**1**, **2** und **3**) isoliert werden. Die amorphe Hauptkomponente (Laborbezeichnung SL 7810) wurde aufgrund spektralanalytischer Daten und orientierender Aminosäureanalysen als cyclisches Oligopeptid, aufgebaut aus 6 Aminosäuren mit einem Linolsäurerest in Amidbindung, charakterisiert [1]. SL 7810 erwies sich in der Folge mit dem von *Benz et al.* [3] aus *Aspergillus nidulans* var. *echi-*

¹⁾ Auszugsweise vorgetragen an der Herbstversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft in Bern, 20./21. Oktober 1978.

nulatus isolierten Echinocandin B als identisch. Für SL 7810 wurde deshalb der Name Echinocandin B übernommen und die beiden neuen Nebenmetabolite als Echinocandine C und D bezeichnet. Über die Strukturermittlung des Echinocandins B haben wir kürzlich berichtet [1]. In der vorliegenden Arbeit werden die Echinocandine C (2) und D (3) mit dem gut untersuchten Hauptmetaboliten B (1) [1] [3-5] verglichen und ihr chemischer Bau aufgeklärt.

Orientierende Untersuchungen. - Die neuen Echinocandine C und D sind gegen Luft und Licht empfindlich, da sie, wie Echinocandin B, am Peptidgerüst einen Linolsäurerest tragen. Bei der katalytischen Hydrierung werden 2 mol H₂ aufgenommen und die stabileren Tetrahydroverbindungen (5 bzw. 6) gebildet; saure Spaltung liefert aus 5 und 6 erwartungsgemäss Stearinsäure. Hydrolyse von Echinocandin C (2) und Tetrahydroechinocandin D (6) mit 6N HCl bei 115° und Analyse der Aminosäuren nach Moore & Stein [6] ergibt Threonin (2 mol) und 4-Hydroxyprolin (1 mol) neben mehreren nicht identifizierten Spaltstücken. Beide Aminosäuren sind auch aus Echinocandin B (1) erhalten worden [1] [3]. Tetrahydroechinocandin D (6) liefert zusätzlich noch 1 mol L-Ornithin, dessen Konfiguration nach präparativer Isolierung bestimmt wurde.

Die UV.-Spektren und weitere physikalisch-chemische Daten der Echinocandine und ihrer Tetrahydroverbindungen sind in *Tabelle 1* angeführt.

Tabelle 1. *Physikalisch-chemische Daten der Echinocandine und ihrer Tetrahydroderivate*

| Metabolit | Rf-Wert ^{a)} | Smp. | $[\alpha]_D^{20b)}$ | UV. (in Methanol) λ_{\max} in nm log ϵ | |
|---|-----------------------|----------|---------------------|---|----------------------|
| Echinocandin B (1) C ₅₂ H ₈₁ N ₇ O ₁₆ | 0,28 | 160-163° | -48,3° | 194 276 226 ^{c)} | 5,01 3,17 4,13 |
| Tetrahydro- echinocandin B (4) C ₅₂ H ₈₅ N ₇ O ₁₆ | 0,28 | 210-212° | -47,8° | 194 277 227 ^{c)} | 4,88 3,12 4,03 |
| Echinocandin C (2) C ₅₂ H ₈₁ N ₇ O ₁₅ | 0,47 | 158-160° | -44,7° | 193 278 226 ^{c)} | 4,97 3,20 4,12 |
| Tetrahydro- echinocandin C (5) C ₅₂ H ₈₅ N ₇ O ₁₅ | 0,47 | 198-201° | -44,2° | 194 278 227 ^{c)} | 4,92 3,27 4,09 |
| Echinocandin D (3) C ₅₂ H ₈₁ N ₇ O ₁₃ | 0,59 | 164-168° | -45,5° | 193 278 224 ^{c)} | 4,98 3,24 4,12 |
| Tetrahydro- echinocandin D (6) C ₅₂ H ₈₅ N ₇ O ₁₃ | 0,59 | 198-200° | -44,3° | 193 278 224 ^{c)} | 4,94 3,20 4,02 |

a) Kieselgel-Fertigplatten «Merck»; Fließmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 70:25:5; Nachweis siehe exper. Teil.

b) In Methanol.

c) Schulter.

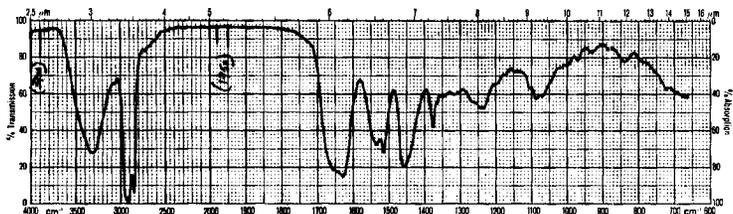


Fig. 1. IR.-Spektrum von Echinocandin C (2) in Nujol

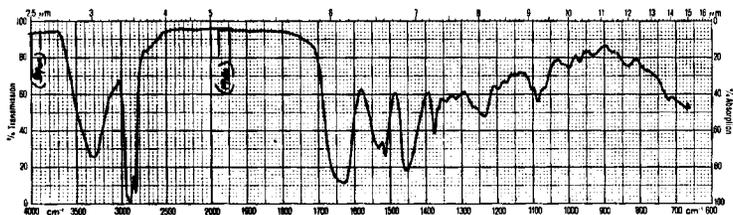


Fig. 2. IR.-Spektrum von Echinocandin D (3) in Nujol

Die IR.-Spektren der Nebenmetabolite C und D zeigen gegenüber dem Spektrum von Echinocandin B [3] nur geringfügige Unterschiede. Auffällig ist die dominierende, breite Amidbande bei $1630\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$; Keton- oder Esterbanden treten nicht auf (Fig. 1 und 2).

In den $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Echinocandine (Fig. 3, 4 und 5) sind mehrere gemeinsame Strukturelemente augenfällig. Die Signale bei $7,2\text{--}8,2\text{ ppm}$ entsprechen 5 CONH-Gruppen und bei $6,6, 7,0$ und $9,1\text{ ppm}$ ($AA'BB'$ -System + phenol. OH) erscheinen die Resonanzen eines *p*-Hydroxyphenylrestes. Durch Austausch mit D_2O können weitere OH-Gruppen nachgewiesen werden. Das Diensystem der Linolsäure ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) ist durch Signale bei $5,2\text{--}5,5$ und $2,8\text{ ppm}$ gekennzeichnet.

Die $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren der Tetrahydroechinocandine 4, 5 und 6 (s. exper. Teil) enthalten u. a. 7 Carbonylkohlenstoff- ($169\text{--}176\text{ ppm}$) sowie vier C-Methyl-Signale. Unter Berücksichtigung der nachgewiesenen Stearinsäure ergeben die gemessenen relativen Intensitäten für alle drei Komponenten C_{52} -Formeln. Nach den Elementaranalysen liegen ferner 7 N-Atome vor. In den Felddesorptions-Massenspektren der Tetrahydroechinocandine B, C und D treten die entsprechenden Massenpeaks bei m/e 1063, 1047 und 1015 auf. Daraus berechnen sich die in Tabelle 1 angegebenen Bruttoformeln. Die Massendifferenzen zwischen 4 und 5 und zwischen 4 und 6 von 16 bzw. 48 Einheiten zeigen, dass 5 und 6 gegenüber Tetrahydroechinocandin B (4) ein bzw. drei Sauerstoffatome weniger enthalten. Die vorliegenden Daten illustrieren die nahe Verwandtschaft zwischen den Echinocandinen und lassen vermuten, dass die strukturellen Unterschiede lediglich in der Zahl der OH-Gruppen bestehen.

Struktur von Echinocandin B. - Eingehende Untersuchungen über die beim hydrolytischen Abbau von Echinocandin B auftretenden genuinen Aminosäuren

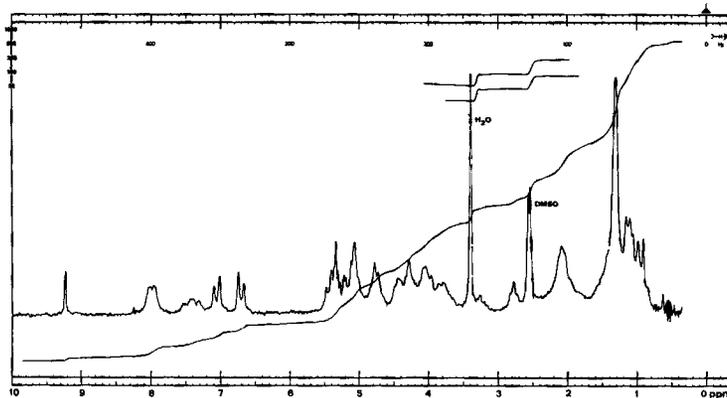


Fig. 3. ¹H-NMR.-Spektrum von Echinocandin B (1) in d₆-DMSO (100 MHz; TMS = 0 ppm)

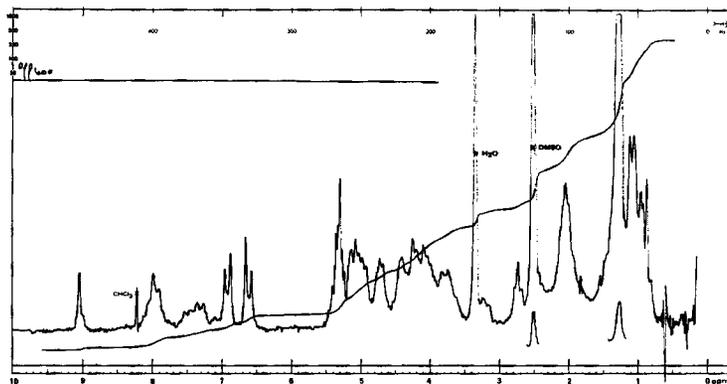


Fig. 4. ¹H-NMR.-Spektrum von Echinocandin C (2) in d₆-DMSO (100 MHz; TMS = 0 ppm)

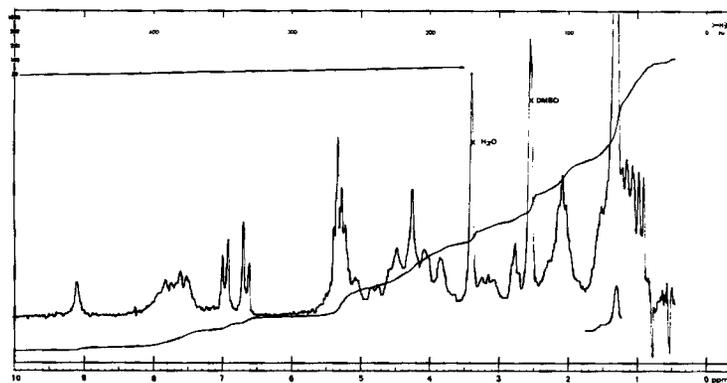
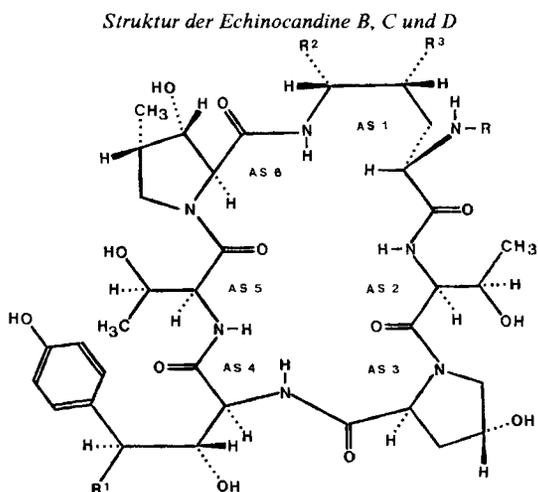


Fig. 5. ¹H-NMR.-Spektrum von Echinocandin D (3) in d₆-DMSO (100 MHz; TMS = 0 ppm)

und Artefakte wurden zunächst von *Benz et al.* [3], *Koyama* [4] und später von *Keller-Schierlein & Widmer* [5] publiziert. Die Struktur von Echinocandin B (**1**) konnte kürzlich in unseren Laboratorien durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt werden [1]. Zur Gewinnung gut kristallisierender Derivate mit Schweratom benutzen wir die charakteristische Reaktion des Echinocandins B mit Alkoholen, die zu *N*-Acyl- α -aminoäthern führt (s. u.). Bei der Röntgenstrukturanalyse des (Tetrahydroechinocandin B)-*o*-chlormercuribenzyläthers (**7**) waren alle Atome des Peptidteils in der Elektronendichte ersichtlich. Echinocandin B (**1**) stellt ein cyclisches Hexapeptid dar, das aus (2*S*, 4*R*, 5*R*)-4, 5-Dihydroxyornithin, L-Threonin, L-4-Hydroxyprolin, (2*S*, 3*S*, 4*S*)-3, 4-Dihydroxyhomotyrosin, L-Threonin und (2*S*, 3*S*, 4*S*)-4-Methyl-3-hydroxyprolin [3] [4] aufgebaut ist. Die terminale Aminogruppe des 4, 5-Dihydroxyornithins schliesst den Peptidring, die α -Aminogruppe ist mit Linolsäure acyliert [1]. Die absolute Konfiguration des Echinocandins B (**1**) stützt sich auf die absolute Konfiguration des L-Threonins und des L-4-Hydroxyprolins [3].

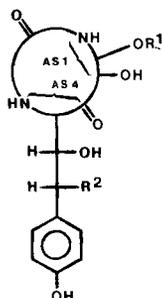


| | | |
|---|---|--|
| $R^1 = R^2 = R^3 = \text{OH}$ | } | $R = \text{Linolsäurerest: Echinocandin B}$ 1 $R = \text{Stearinsäurerest: Tetrahydroechinocandin B}$ 4 |
| $R^1 = \text{H}, R^2 = R^3 = \text{OH}$ | } | $R = \text{Linolsäurerest: Echinocandin C}$ 2 $R = \text{Stearinsäurerest: Tetrahydroechinocandin C}$ 5 |
| $R^1 = R^2 = R^3 = \text{H}$ | } | $R = \text{Linolsäurerest: Echinocandin D}$ 3 $R = \text{Stearinsäurerest: Tetrahydroechinocandin D}$ 6 |

Äther-Derivate der Echinocandine B und C. - Die in Echinocandin B (**1**) und seiner Tetrahydroverbindung **4** enthaltene, charakteristische Aldehydammoniak-Gruppierung verrät sich durch die selektive, säurekatalysierte Reaktion mit Alkoholen unter Bildung von *N*-Acyl- α -aminoäthern vom Typ **8** [1]. Analog verläuft die Umsetzung mit Thiolen zu Thioäthern. Die Konfiguration an C(5) des involvierten Dihydroxyornithins bleibt erhalten: Tetrahydroechinocandin B (**4**) kann beispielsweise leicht hydrogenolytisch aus seinem Benzyläther **10** regeneriert wer-

den. Bei stärkerer Säurekonzentration und/oder erhöhter Temperatur beteiligt sich neben der HO-Gruppe am C(5) des 4,5-Dihydroxyornithins auch die benzyliche OH-Gruppe des 3,4-Dihydroxyhomotyrosins an der Reaktion. Mit Methanol entstehen unter diesen Bedingungen aus **4** die Bis-methyläther **9**, die ein Gemisch der am Benzyl-Kohlenstoffatom Epimeren darstellen. Echinocandin C (**2**) und Tetrahydroechinocandin C (**5**) liefern mit Alkoholen nur die entsprechenden Monoätherderivate; Bis-äther werden auch unter verschärften Bedingungen nicht gebildet.

Echinocandin D (**3**) und sein Tetrahydroderivat (**6**) reagieren nicht mit Alkoholen; offenbar fehlen in **3** und **6** die zur Ätherbildung befähigten OH-Gruppen.



- 7 $R^1 = \text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{HgCl}(o\text{-}), R^2 = \text{OH}$
 8 $R^1 = \text{CH}_3, R^2 = \text{OH}$
 9 $R^1 = \text{CH}_3, R^2 = \sim \text{OCH}_3$
 10 $R^1 = \text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_5, R^2 = \text{OH}$
 11 $R^1 = \text{CH}_3, R^2 = \text{H}$

Glykolspaltungen mit NaIO_4 und $\text{Pb}(\text{OAc})_4$. - Auch bei der oxydativen Spaltung zeigen die Echinocandine C (**2**) und D (**3**) gegenüber dem Hauptmetaboliten **1** charakteristische Abweichungen: Tetrahydroechinocandin B (**4**) verbraucht 2 mol NaIO_4 entsprechend den zwei frei vorliegenden Glykolgruppierungen [1]. Der Methyläther **8** benötigt nur 1 mol Oxydationsmittel, da die HO-Gruppe am C(5) des 4,5-Dihydroxyornithins blockiert ist. Sowohl aus **4** wie aus **8** lässt sich mit $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ *p*-Hydroxybenzaldehyd als Spaltprodukt des 3,4-Dihydroxyhomotyrosins fassen [1]. Tetrahydroechinocandin C (**5**) reagiert nur mit 1 mol NaIO_4 , sein Methyläther **11** verbraucht kein Perjodat. *p*-Hydroxybenzaldehyd lässt sich nach $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ -Oxydation von **5** nicht nachweisen.

Tetrahydroechinocandin D verhält sich gegen NaIO_4 oder $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ inert und enthält folglich keine vicinale Diolgruppierung. Aus diesem Reaktionsmuster lassen sich für die Nebenmetabolite **2** und **3** gegenüber Echinocandin B (**1**) folgende strukturellen Unterschiede herauschälen: Tetrahydroechinocandin C (**5**) enthält noch 4,5-Dihydroxyornithin als Baustein, hingegen fehlt das benzyliche Hydroxyl an der Homotyrosin-Einheit. Damit erklärt sich die ausschliessliche Bildung des Monomethyläthers **11** und das Verhalten von **5** und **11** bei der Oxydation. Tetrahydroechinocandin D (**6**) differiert von **4** in zwei Aminosäureeinheiten: **6** enthält Ornithin (das bei der AS-Analyse direkt nachgewiesen wurde) und 3-Hydroxyhomotyrosin (wie **5**) anstelle der entsprechenden Dihydroxy-aminosäuren. Mit diesen Strukturvorschlägen sind auch die festgestellten Differenzen im Sauerstoffgehalt der Echinocandine (Tab. 1) im Einklang.

Struktur des Echinocandins C (2**).** - Eine unabhängige Bestätigung der tentativ formulierten Struktur **2** für Echinocandin C bringt zunächst ein Vergleich der ^{13}C -

Tabelle 2. ^{13}C -NMR.-Signale der aromatischen Aminosäure in den Tetrahydroechinocandinen B (4) und C (5)

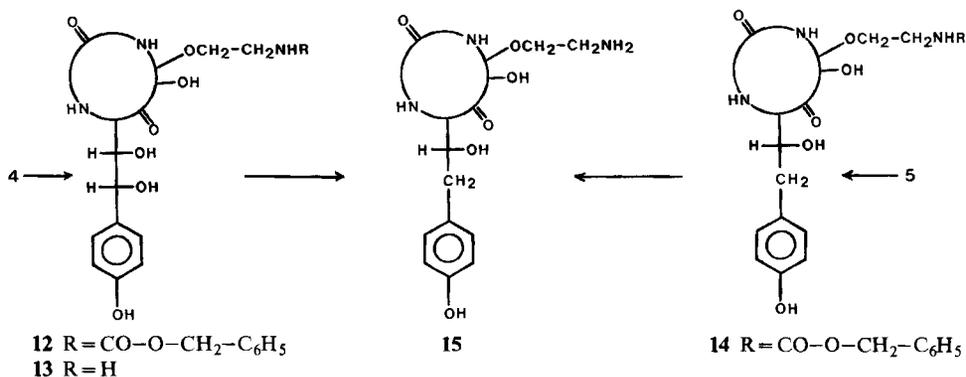
| C | | | $\Delta\delta$ [ppm] $= \delta_4 - \delta_5$ |
|------------|--|---|---|
| | 4 ($\text{R}^1 = \text{OH}$) δ [ppm] | 5 ($\text{R}^1 = \text{H}$) δ [ppm] | |
| α | 55,9 | 57,2 | - 1,3 |
| β | 76,6 | 74,1 | + 2,5 |
| γ | 75,2 ^{a)} | 40,7 | + 34,5 |
| δ | 132,2 | 129,1 | + 3,1 |
| ϵ | 129,1 (2) | 130,9 (2) | - 1,8 |
| ζ | 115,8 (2) | 115,7 (2) | + 0,1 |
| η | 157,7 | 156,3 | + 1,4 |

a) Bei 75,2 ppm erscheint auch das C(3)-Signal im 4-Methyl-3-hydroxyprolin (in 4 rel. Intensität 2). Diese Resonanz erleidet in 5 keine Verlagerung und weist jetzt die rel. Intensität 1 auf.

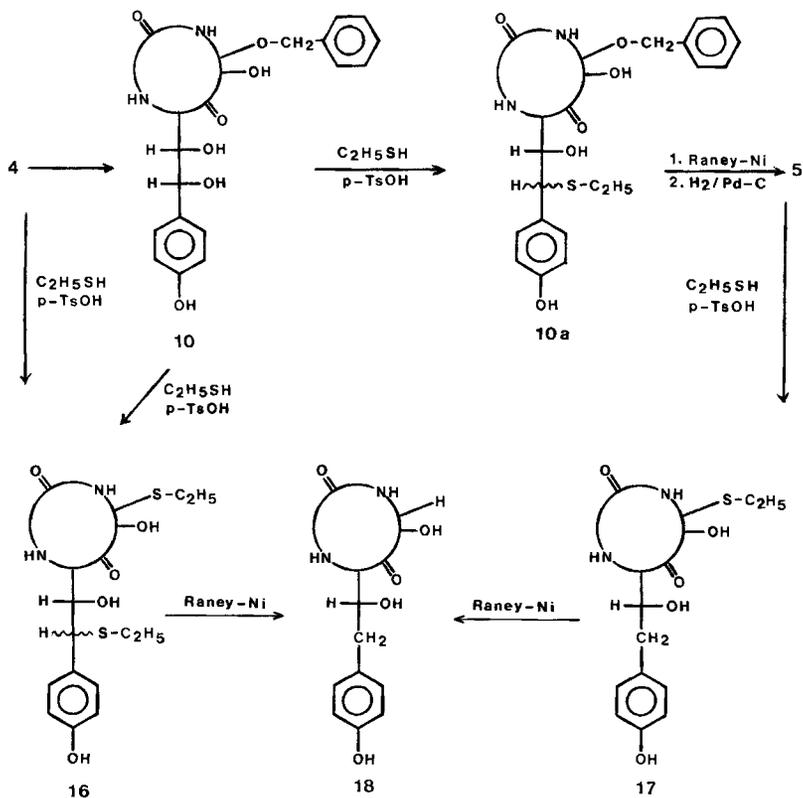
NMR.-Spektren der Tetrahydroverbindungen 4 und 5 (Tab. 2). Das Fehlen der benzyliischen Hydroxylgruppe in Tetrahydroechinocandin C (5) wird durch den Unterschied in der chemischen Verschiebung um 34,5 ppm des γ -C-Atoms der aromatischen Aminosäure sowie durch die verstärkte Abschirmung vom C_β um 2,5 ppm angezeigt.

Auch im Bereich der aromatischen sp^2 -Kohlenstoffatome sind zwischen 4 und 5 deutliche Veränderungen der chemischen Verschiebungen zu beobachten, die durch die unterschiedliche Substitution am Benzyl-C-Atom (C_γ) verursacht werden (vgl. [7]). Da die restlichen Signale in den ^{13}C -NMR.-Spektren von 4 und 5 untereinander nur geringfügige Abweichungen aufweisen, sind zusätzliche Unterschiede in den Strukturen der Tetrahydroechinocandine B (4) und C (5) unwahrscheinlich.

Ein chemischer Beweis für die vermutete Struktur von Echinocandin C (2) lässt sich durch Verknüpfung der Tetrahydroverbindungen 4 und 5 erbringen. Leider misslingt die selektive Eliminierung der benzyliischen OH-Gruppe in 4 (unter Bildung von 5), da durch die Anwesenheit des benachbarten zweiten Hydroxyls die reduktive Eliminierung der benzyliischen Hydroxylfunktion derart erschwert wird, dass milde Reaktionsbedingungen ($\text{Pd}/\text{C}/\text{H}_2$ in schwach saurem Milieu, 20°) [8] nicht genügen; unter verschärften Bedingungen reagiert aber auch die 5-OH-Gruppe des Ornithinrestes, wobei unübersichtliche Gemische entstehen. Tetrahydroechinocandin B (4) wird deshalb zunächst mit 2-(N-Benzoyloxy-carbonyl-amino)äthanol zum Ätherderivat 12 umgesetzt. Übliche Abspaltung der Carbo-benzyloxy-Schutzgruppe liefert den entsprechenden (2-Aminoäthyl)äther 13. Das Hydrochlorid von 13 ist wasserlöslich und kann durch 15stündige Hydrierung ($\text{Pd}/\text{C}/\text{H}_2$) in 0,1N HCl bei 50° in die Desoxyverbindung 15 übergeführt werden. Die Relaisverbindung 15 erweist sich als identisch mit (Tetrahydroechinocandin C)-(2-aminoäthyl)äther (15), der über das geschützte Zwischenprodukt 14 aus Tetrahydroechinocandin C (5) zugänglich ist.



Als weitere Möglichkeit zur Verknüpfung der Tetrahydroecchinocandine **B** (**4**) und **C** (**5**) interessierte uns auch eine Reaktionsfolge über gemischte Ätherderivate vom Typ **10a**. Reduktive Entschwefelung und Hydrogenolyse der Benzylgruppe sollte von **10a** direkt zum Tetrahydroecchinocandin **C** (**5**) führen. Es zeigt sich jedoch, dass **10a** schwer zugänglich ist. Beim Umsatz des Benzyläthers **10** mit Äthylmercaptan entsteht nämlich vorwiegend der Bis-thioäther **16**, da unter den benö-



tigten Reaktionsbedingungen der Benzylrest durch das stark nucleophile C_2H_5SH verdrängt wird. Der Bis-thioäther **16**, der auch direkt aus **4** mit Äthylmercaptan unter Zusatz von *p*-Toluolsulfonsäure erhalten wird, stellt ein Gemisch der am Benzylkohlenstoffatom epimeren Verbindungen dar. Hydrogenolyse von **16** mit Raney-Nickel liefert die Bis-desoxyverbindung **18**, die mit 5-Orn-desoxy-tetrahydroechinocandin C (**18**), hergestellt durch Reduktion des aus **5** erhältlichen Äthylthioäthers **17**, identisch ist.

Diese Korrelationen der Tetrahydroverbindungen **4** und **5** beweisen, dass Echinocandin C (**2**) nur in einem Aminosäurebaustein von Echinocandin B (**1**) differiert: Der Nebenmetabolit C enthält 3-Hydroxyhomotyrosin anstelle des in **1** vorliegenden 3,4-Dihydroxyhomotyrosins. Die restlichen Aminosäuren und ihre Sequenz sind gleich.

Struktur von Echinocandin D. – Aus den verfügbaren Analysen, spektroskopischen Daten und chemischen Befunden resultierte für Echinocandin D die vorgeschlagene Struktur **3**. Eine unabhängige Kontrolle der einzelnen Strukturelemente wird durch den Vergleich der ^{13}C -NMR.-Spektren der Tetrahydroverbindungen C (**5**) und D (**6**) ermöglicht (siehe *Tab. 5* und *6* im exper. Teil). Im Spektrum von **6** zeigen lediglich 3 Signale signifikante Abweichungen: anstelle der in **5** auftretenden Resonanzen bei 70,5 und 74,5 ppm²⁾, die hydroxylierten Methinkohlenstoffatomen zugeordnet werden, sowie bei 35,0 ppm (Methylenkohlenstoffatom) erscheinen bei Tetrahydroechinocandin D (**6**) drei neue Signale bei 24,6; 27,9 und 38,0 ppm. Diese Veränderungen sind mit dem Fehlen von zwei OH-Gruppen bzw. mit dem Vorliegen von Ornithin in **6** gut vereinbar. Die vorgenommenen Zuordnungen der Kohlenstoffsignale des 4,5-Dihydroxyornithins in **5** und des Ornithins in **6** sowie die entsprechenden $\Delta\delta$ -Werte (vgl. [7]) sind in *Tabelle 3* zusammengefasst.

Strukturelle Abweichungen an den zwei Threonin-Einheiten und am Methylhydroxyprolin können ausgeschlossen werden: die Verschiebungen der Methylsignale im Spektrum von **6** werden nicht beeinflusst. Da ferner in **6** nur *ein* Methy-

Tabelle 3. ^{13}C -chemische Verschiebungen der Kohlenstoffatome des 4,5-Dihydroxyornithins in Tetrahydroechinocandin C (**5**) bzw. des Ornithins in Tetrahydroechinocandin D (**6**) (22,63 MHz; d_4 -Methanol; TMS=0 ppm)

| C | α β γ δ | | | | $\Delta\delta$ [ppm] = $\delta_5 - \delta_6$ |
|----------|---|--|--|--|---|
| | $\cdots \text{CO}-\underset{\text{NH}}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{CH}_2-\underset{\text{R}^3}{\underset{ }{\text{CH}}}-\underset{\text{R}^2}{\underset{ }{\text{CH}}}-\text{NH} \cdots$ | | | | |
| | 5 $R^2 = R^3 = \text{OH}$ δ [ppm] | | 6 $R^2 = R^3 = \text{H}$ δ [ppm] | | |
| α | 51,3 | | 52,6 | | – 1,3 |
| β | 35,0 | | 27,9 | | + 7,1 |
| γ | 70,5 | | 24,6 | | + 45,9 |
| δ | 74,1 | | 38,0 | | + 36,1 |

2) Das in **5** an der Intensität erkennbare, zweite Signal bei 74,1 ppm stammt vom β -Kohlenstoffatom der aromatischen Aminosäure (vgl. *Tab. 2*). In **6** tritt diese Resonanz bei 73,7 ppm auf und erfährt somit keine signifikante Verlagerung.

len-C-Signal verlagert ist, muss auch die 4-Hydroxyprolin-Einheit intakt vorliegen. Das gleiche gilt für die aromatische Aminosäure (= 3-Hydroxyhomotyrosin), deren entsprechende Kohlenstoffsignale in beiden Spektren bei gleichen ppm-Werten auftreten. Die bis auf die drei diskutierten Signale feststellbare Kongruenz der ^{13}C -NMR.-Spektren (max. Abweichungen $\pm 0,5$ ppm) erlaubt den Schluss, dass sich Tetrahydroechinocandin D (6) von C (5) nur durch das Vorliegen von Ornithin anstelle von 4,5-Dihydroxyornithin unterscheidet, im restlichen Bau und damit auch in der Aminosäuresequenz jedoch keine Variationen bestehen.

Experimenteller Teil

Allgemeines. - Zur Säulenchromatographie diente Kieselgel «Merck», Korngrösse 0,063-0,2 mm. Dünnschichtchromatographie erfolgte auf Kieselgel-Fertigplatten «Merck»; Fließmittel: Chloroform/Methanol/Wasser 70:25:5 (wenn nicht anders vermerkt); Detektion mit Jod oder 0,2proz. $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ -Lösung in 50proz. Schwefelsäure mit anschliessendem Erwärmen auf 130°. Die UV.-Spektren wurden in Methanol auf einem Beckmann-Spektralphotometer Mod. DK 2 aufgenommen. Die IR.-Spektren (Angaben in cm^{-1}) wurden, soweit nicht anders angegeben, in Nujol auf einem Perkin-Elmer-IR-Spektrophotometer Mod. 21 mit Filter bestimmt. Die Aufnahmen der ^1H - und ^{13}C -NMR.-Spektren (in d_6 -DMSO bzw. d_4 -Methanol) erfolgten auf einem Bruker HX-90-E sowie auf einem Varian HA-100; interner Standard: Tetramethylsilan = 0 ppm. Die Felddesorptions-Massenspektren (MS.) wurden auf einem CEC-Massenspektrometer 21-110B mit einer FD-Quelle als Erweiterungsgerät aufgenommen (Beschleunigungsspannung +4 kV, +6 kV; Kathodenpotential -2,2 kV, -2,3 kV; Quellentemperatur 40°).

Isolierung der Echinocandine B (1), C (2) und D (3). - Die durch aerobe Submerszuchtung des Stammes *Aspergillus rugulosus* (NRRL 8039) gewonnene Kulturbrühe (450 L) wurde bei pH 7 3mal mit je 500 l Essigester ausgerührt; anschliessend wurde die organische Phase mit 50 l Wasser gewaschen und i.V. eingedampft. Der Rückstand (320 g) wurde an der 4fachen Menge Kieselgel fraktioniert. Nach Abtrennung von inaktiven Begleitstoffen mit Chloroform + 10 bis 20% Methanol wurden die antifungisch aktiven Metabolite mit Chloroform/Methanol 1:1 eluiert (16,4 g). Bei der nachfolgenden Chromatographie an 1 kg Kieselgel mit Chloroform + 20% Methanol wurden zuerst Mischfraktionen von Echinocandin C und D (2,5 g) erhalten, während die späteren, mit Chloroform + 30% Methanol eluierten Fraktionen vorwiegend Echinocandin B enthielten. Nach Gelfiltration der angereicherten B-Fraktionen (8,1 g) an 1,2 kg Sephadex LH 20 mit Methanol fiel reines Echinocandin B als amorphes Pulver an.

Die weitere Auftrennung der 2,5 g Mischfraktionen Echinocandin C und D an 1 kg Kieselgel mit Chloroform + 20% Methanol lieferte in den ersten Fraktionen (0,75 g) vorwiegend Echinocandin D, in den späteren angereichertes C (1,7 g).

Zur Gewinnung von reinem Echinocandin D wurden die 0,75 g an 1 kg Kieselgel mit Chloroform + 10 bis 15% Methanol nachchromatographiert; nach anschliessender Gelfiltration von 0,55 g an 1,2 kg Sephadex LH 20 mit Methanol wurde DC.-einheitliches Echinocandin D erhalten.

Analoge Auftrennung von 1,7 g (Echinocandin C)-Mischfraktionen an 1 kg Kieselgel mit Chloroform + 20% Methanol und anschliessende Gelfiltration der stark angereicherten Fraktionen an 1,2 kg Sephadex LH 20 mit Methanol ergab reines Echinocandin C.

Die einzelnen Komponenten liegen im Antibiotika-Komplex in folgender Verteilung vor: Echinocandin B ca. 80-85%, Echinocandin C ca. 10-15%, Echinocandin D ca. 5%.

Echinocandin B (1). Amorphes weisses Pulver vom Smp. 160-163° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -48,3^\circ$ ($c = 0,81$, Methanol). - UV.: siehe Tabelle 1. - ^1H -NMR.: Figur 3.

| | | | | |
|---|-------------|-------|-------|---------|
| $\text{C}_{52}\text{H}_{81}\text{N}_7\text{O}_{16}$ | Ber. C 58,9 | H 7,7 | N 9,2 | O 24,1% |
| (1060,253) | Gef. „ 58,8 | „ 7,9 | „ 9,2 | „ 24,5% |

Echinocandin C (2). Amorphes weisses Pulver vom Smp. 158-160° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -44,7^\circ$ ($c = 0,72$, Methanol). - UV.: siehe Tabelle 1. - IR.: Figur 1. - ^1H -NMR.: Figur 4.

| | | | | |
|---|-------------|-------|-------|---------|
| $\text{C}_{52}\text{H}_{81}\text{N}_7\text{O}_{15}$ | Ber. C 59,8 | H 7,8 | N 9,4 | O 23,0% |
| (1044,254) | Gef. „ 59,2 | „ 7,8 | „ 9,3 | „ 23,2% |

Echinocandin D (3). Amorphes weisses Pulver vom Smp. 164-168° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -45,5^\circ$ ($c = 0,81$, Methanol). - UV.: siehe *Tabelle 1*. - IR.: *Figur 2*. - $^1\text{H-NMR.}$: *Figur 5*.

$\text{C}_{52}\text{H}_{81}\text{N}_7\text{O}_{13}$ Ber. C 61,7 H 8,0 N 9,7 O 20,6%
(1012,256) Gef. „ 61,7 „ 8,3 „ 9,5 „ 22,0%

Herstellung der Tetrahydroderivate der Echinocandine B, C und D. - Zur Suspension von 1 g vorhydrierter 10proz. Pd/C in 250 ml Äthanol wurden 5 g Echinocandin B in 50 ml Äthanol gegeben und 3 Std. bei RT. unter Atmosphärendruck hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde eingedampft, wobei Tetrahydroechinocandin B als amorphes Pulver anfiel.

Die Herstellung der Tetrahydroechinocandine C und D erfolgte analog.

Tetrahydroechinocandin B (4). Amorphes weisses Pulver; aus Äthanol/Wasser 95:5 kristallin, Smp. 210-212° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -47,8^\circ$ ($c = 0,95$, Methanol). - UV.: siehe *Tabelle 1*. - $^{13}\text{C-NMR.}$: *Tabelle 4*. - MS. (m/e): 1063 (M^+).

$\text{C}_{52}\text{H}_{85}\text{N}_7\text{O}_{16}$ Ber. C 58,7 H 8,0 N 9,2 O 24,1%
(1064,285) Gef. „ 58,9 „ 8,4 „ 9,3 „ 24,5%

Tetrahydroechinocandin C (5). Amorphes weisses Pulver vom Smp. 198-201° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -44,2^\circ$ ($c = 1,64$, Methanol). - UV.: siehe *Tabelle 1*. - IR.: wie **2**. - $^1\text{H-NMR.}$: wie **2**, hingegen fehlen Signale bei 2,8 und 5,2-5,5 (CH=CH-CH₂-CH=CH). - $^{13}\text{C-NMR.}$: *Tabelle 5*. - MS. (m/e): 1047 (M^+).

$\text{C}_{52}\text{H}_{85}\text{N}_7\text{O}_{15}$ Ber. C 59,6 H 8,2 N 9,3 O 22,9%
(1048,286) Gef. „ 59,6 „ 8,5 „ 9,1 „ 23,3%

Tetrahydroechinocandin D (6). Amorphes weisses Pulver vom Smp. 198-200° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -44,3^\circ$ ($c = 1,22$, Methanol). - UV.: siehe *Tabelle 1*. - IR.: wie **3**. - $^1\text{H-NMR.}$: wie **3**, hingegen fehlen Signale bei 2,8 und 5,2-5,5 (CH=CH-CH₂-CH=CH). - $^{13}\text{C-NMR.}$: *Tabelle 6*. - MS. (m/e): 1015 (M^+).

$\text{C}_{52}\text{H}_{85}\text{N}_7\text{O}_{13}$ Ber. C 61,5 H 8,4 N 9,6 O 20,5%
(1016,288) Gef. „ 61,5 „ 8,5 „ 9,8 „ 20,7%

Nachweis der Fettsäure in Tetrahydroechinocandin C (5) und D (6). - Es wurden 250 mg Tetrahydroechinocandin C (5) in 10 ml 6N HCl während 4 Std. bei 110° unter N₂ erwärmt. Die abgekühlte Lösung wurde mit Äther ausgeschüttelt; die Ätherphase ergab nach Behandlung mit CH₂N₂ 76 mg Stearinsäuremethylester, identisch nach GC., $^1\text{H-NMR.}$ und MS. mit einer authentischen Probe.

Tabelle 4. $^{13}\text{C-NMR.}$ -Spektrum von *Tetrahydroechinocandin B* (4) (bei 22,63 MHz in d₄-Methanol; TMS=0 ppm)

| δ (ppm) | Rel. Intensität (geschätzt) | δ (ppm) | Rel. Intensität (geschätzt) |
|----------------|--------------------------------|----------------|----------------------------------|
| 175,3 | 1 | 58,3 | 1 |
| 173,5 | 1 | 56,8 | 1 |
| 172,7 | 1 | 56,4 | 1 |
| 171,9 | 1 | 55,9 | 1 |
| 171,7 | 2 | 52,6 | 1 |
| 169,1 | 1 | 51,3 | 1 |
| 157,7 | 1 | 38,8 | 2 |
| 132,2 | 1 | 36,7 | 1 |
| 129,1 | 2 | 35,0 | 1 |
| 115,8 | 2 | 32,8 | 1 |
| 76,6 | 1 | 30,6 | x CH ₂ (Stearinsäure) |
| 75,2 | 2 | 26,9 | 1 |
| 74,1 | 1 | 23,6 | 1 |
| 70,6 | 2 | 20,1 | 1 |
| 69,3 | 2 | 19,5 | 1 |
| 68,0 | 1 | 14,4 | 1 |
| 62,1 | 1 | 11,3 | 1 |

Tabelle 5. ^{13}C -NMR.-Spektrum von Tetrahydroechinocandin C (5) (bei 22,63 MHz in d_4 -Methanol; TMS=0 ppm)

| δ (ppm) | Rel. Intensität (geschätzt) | δ (ppm) | Rel. Intensität (geschätzt) |
|----------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|
| 175,3 | 1 | 57,2 | 1 |
| 173,4 | 1 | 56,9 | 1 |
| 173,2 | 1 | 56,3 | 1 |
| 172,1 | 1 | 52,6 | 1 |
| 171,9 | 1 | 51,3 | 1 |
| 171,7 | 1 | 40,7 | 1 |
| 169,3 | 1 | 38,8 | 2 |
| 156,3 | 1 | 36,6 | 1 |
| 130,9 | 2 | 35,0 | 1 |
| 129,1 | 1 | 32,8 | 1 |
| 115,7 | 2 | 30,6 } 30,2 } | x CH_2 (Stearinsäure) |
| 75,2 | 1 | 26,8 | 1 |
| 74,1 | 2 | 23,5 | 1 |
| 70,9 | 1 | 20,1 | 1 |
| 70,5 | 1 | 19,5 | 1 |
| 69,1 | 2 | 14,4 | 1 |
| 68,0 | 1 | 11,2 | 1 |
| 62,1 | 1 | | |
| 58,5 | 1 | | |

Tabelle 6. ^{13}C -NMR.-Spektrum von Tetrahydroechinocandin D (6) (bei 22,63 MHz in d_4 -Methanol; TMS=0 ppm)

| δ (ppm) | Rel. Intensität (geschätzt) | δ (ppm) | Rel. Intensität (geschätzt) |
|----------------|--------------------------------|------------------|--------------------------------|
| 175,5 | 1 | 57,0 | 1 |
| 173,9 | 1 | 56,6 | 1 |
| 173,3 | 1 | 52,6 | 2 |
| 172,0 | 1 | 40,6 | 1 |
| 171,4 | 2 | 38,6 | 2 |
| 169,7 | 1 | 38,0 | 1 |
| 156,2 | 1 | 36,6 | 1 |
| 130,7 | 2 | 32,7 | 1 |
| 129,1 | 1 | 30,5 } 30,2 } | x CH_2 (Stearinsäure) |
| 115,7 | 2 | 27,9 | 1 |
| 75,5 | 1 | 26,8 | 1 |
| 73,7 | 1 | 24,6 | 1 |
| 70,9 | 1 | 23,5 | 1 |
| 69,6 | 1 | 20,1 | 1 |
| 68,9 | 1 | 19,5 | 1 |
| 67,8 | 1 | 14,4 | 1 |
| 62,0 | 1 | 11,2 | 1 |
| 58,4 | 1 | | |
| 57,7 | 1 | | |

Analog wurden aus 100 mg Tetrahydroechinocandin D (6) 23,2 mg Stearinsäuremethylester erhalten.

Isolierung von L-Ornithin aus Tetrahydroechinocandin D (6). - Es wurden 3,05 g Tetrahydroechinocandin D durch Erhitzen in 90 ml 6N HCl während 17 Std. bei 115° hydrolysiert. Der Eindampfrückstand wurde in 50 ml Wasser gelöst und zur Entfernung der Stearinsäure 3mal mit Äther extrahiert. Die wässrige Phase wurde auf eine schwach basische Ionenaustauschersäule (Dowex AG 3-X4, Acetatform) gegeben und solange mit Wasser nachgewaschen, bis das Filtrat Ninhydrin-negativ war. Das Eluat wurde eingedampft und an 250 g Kieselgel mit 1-Propanol/Wasser/Eisessig 4:1:1 aufgetrennt. Die ersten Fraktionen enthielten Threonin und Hydroxyprolin neben weiteren Komponenten, die späteren Fraktionen ergaben 474 mg DC.-einheitliches Ornithin (Flm.: 1-Propanol/Wasser/Essigsäure 4:1:1; Det.: Ninhydrin). Zweimalige Kristallisation aus heissem wässrigem Äthanol lieferte 318 mg L-Ornithin (als Acetat), das sich nach Überführung in das Monohydrochlorid [Smp. 245-247°, $[\alpha]_D^{20} = +11,6^\circ$ ($c = 2,03$, Wasser)] als identisch mit authentischem L-Ornithin · HCl erwies [vgl. Lit. 9]: $[\alpha]_D^{20} = +11,0^\circ$ ($c = 5,5$, Wasser)].

(Tetrahydroechinocandin B)-methyläther (8) und (Tetrahydroechinocandin B)-bis(methyläther) (9). - Die Lösung von 3,19 g Tetrahydroechinocandin B in 15 ml Methanol wurde mit 30 mg *p*-Toluolsulfonsäure versetzt und 3 Std. bei RT. gerührt. Die Säure wurde mit 1N NaHCO₃ neutralisiert, danach wurde eingedampft und der Rückstand in Chloroform/2-Propanol 7:3 aufgenommen. Nach 2maligem Waschen mit Wasser wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und i.V. eingedampft. Das Rohprodukt wurde an 300 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol/Wasser 84:15:1 chromatographiert, wobei zuerst 244 mg (8%) 9 als Epimerengemisch im Verhältnis ca. 1:2 und anschliessend 2,33 g (72%) 8 eluiert wurden.

8. Amorphes weisses Pulver; Smp. 220° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -38,8^\circ$ ($c = 1,1$, Methanol). - IR. (KBr): 1080 (C-O-C). - ¹H-NMR.: 3,2 (s, 3 H, OCH₃).

| | | | | |
|--|-------------|-------|-------|---------|
| C ₅₃ H ₈₇ N ₇ O ₁₆ | Ber. C 59,0 | H 8,1 | N 9,1 | O 23,7% |
| (1078,312) | Gef. „ 58,9 | „ 8,4 | „ 9,0 | „ 24,0% |

9. Amorphes weisses Pulver; Smp. 215° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -30,8^\circ$ ($c = 1,34$, Methanol). - IR. (KBr): 1080 (C-O-C). - ¹H-NMR.: 3,2 (s, 3 H, C₆(AS1)-OCH₃); 3,1 und 3,0 (2s im Verhältnis 1:2, 3 H, C₇(AS4)~OCH₃, Epimerengemisch).

| | | | | |
|--|-------------|-------|-------|---------|
| C ₅₄ H ₈₉ N ₇ O ₁₆ | Ber. C 59,4 | H 8,2 | N 9,0 | O 23,4% |
| (1092,339) | Gef. „ 59,1 | „ 8,4 | „ 9,1 | „ 23,0% |

(Tetrahydroechinocandin B)-benzyläther (10). - Die Lösung von 3,19 g Tetrahydroechinocandin B und 6,48 g Benzylalkohol in 30 ml Dioxan wurde mit 60 mg *p*-Toluolsulfonsäure 7 Std. bei RT. stehen gelassen. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei 8; Chromatographie des Rohproduktes an 300 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol/Wasser 86:13:1 ergab 1,85 g (53%) 10. Smp. 208-211°; $[\alpha]_D^{20} = -44,1^\circ$ ($c = 0,51$, Methanol). - IR. (KBr): 740 und 700 (Aromat monosubst.). - ¹H-NMR.: 7,3 (s, 5 H, C₆H₅); 4,5 (s, 2 H, OCH₂C₆H₅).

| | | | | |
|--|-------------|-------|-------|---------|
| C ₅₉ H ₉₁ N ₇ O ₁₆ | Ber. C 61,4 | H 7,9 | N 8,5 | O 22,2% |
| (1154,410) | Gef. „ 61,4 | „ 8,1 | „ 8,5 | „ 22,5% |

Hydrierung von 10 zu Tetrahydroechinocandin B (4). - Zur Suspension von 50 mg vorhydriertem 10proz. Pd/C in 5 ml Äthanol wurden 380 mg 10 in 5 ml desselben Lösungsmittels gegeben und 3½ Std. bei Atmosphärendruck und RT. hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde i.V. eingedampft; der Rückstand lieferte nach Chromatographie an 50 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol/Wasser 80:17,5:2 185 mg Substanz, die sich nach ¹H- und ¹³C-NMR. als identisch mit Tetrahydroechinocandin B (aus 1) erwies.

(Tetrahydroechinocandin B)-*o*-chlormercuribenzyläther (7). - Es wurden 1,08 g Tetrahydroechinocandin B mit 1,37 g *o*-Chlormercuribenzylalkohol [10] analog der Herstellung von 10 umgesetzt. Chromatographie des Rohproduktes an Kieselgel mit Chloroform/Methanol/Wasser 80:17,5:2 lieferte 339 mg amorphes 7; aus Methanol Kristalle vom Smp. 201-204°. - ¹H-NMR.: 4,4 (s, 2 H, OCH₂C₆H₄HgCl); 7,1-7,6 (m, C₆H₄HgCl).

| | | | | | |
|--|-------------|-------|--------|---------|--------|
| C ₅₉ H ₉₀ ClHgN ₇ O ₁₆ | Ber. C 51,0 | H 6,5 | Cl 2,6 | Hg 14,4 | N 7,1% |
| (1389,445) | Gef. „ 51,2 | „ 6,8 | „ 2,3 | „ 14,6 | „ 7,0% |

(Tetrahydroechinocandin C)-methyläther (11). - Die Herstellung erfolgte wie bei 8. Aus 1,05 g Tetrahydroechinocandin C wurden 790 mg (74%) 11 als amorphes weisses Pulver erhalten; Smp. 200-203° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -40,2^\circ$ ($c = 0,51$, Methanol). - IR. (KBr): 1080 (C-O-C). - $^1\text{H-NMR.}$: 3,2 (s, 3 H, OCH_3).

$\text{C}_{53}\text{H}_{87}\text{N}_7\text{O}_{15}$ Ber. C 59,9 H 8,3 N 9,2 O 22,6%
(1062,313) Gef. „ 59,7 „ 8,3 „ 9,3 „ 23,0%

Glykospaltungen mit $\text{Pb}(\text{OAc})_4$. - a) Von Tetrahydroechinocandin B (4). Eine Lösung von 1,08 g Tetrahydroechinocandin B (4) in 20 ml Methanol wurde mit 630 mg $\text{Pb}(\text{OAc})_4^3$ versetzt und nach einstündigem Rühren bei RT. schonend eingedampft. Die Extraktion des Rückstandes mit Chloroform/2-Propanol 7:3 ergab ca. 1 g Rohprodukt; anschliessende Chromatographie an 60 g Kieselgel mit Chloroform + 10% Methanol lieferte 69 mg *p*-Hydroxybenzaldehyd vom Smp. 113-116^{o4}, der durch Vergleich mit einer authentischen Probe identifiziert wurde (UV-, IR- und $^1\text{H-NMR.}$ -Spektren).

b) (Tetrahydroechinocandin B)-methyläther (8). Aus 1,08 g 8 wurden auf analoge Weise wie bei 4 79 mg (65%) *p*-Hydroxybenzaldehyd vom Smp. 116-117,5^{o4} isoliert.

c) Tetrahydroechinocandin C (5) und (Tetrahydroechinocandin C)-methyläther (11). Nach Behandlung von 5 oder 11 mit $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ unter obigen Bedingungen konnte kein *p*-Hydroxybenzaldehyd nachgewiesen werden.

Chemische Verknüpfung von Tetrahydroechinocandin C (5) mit Tetrahydroechinocandin B (4). - (Tetrahydroechinocandin B)-[2-(*N*-benzyloxycarbonylamino)äthyl]äther (12). Zu einer Lösung von 7,8 g (40 mmol) 2-(*N*-Benzyloxycarbonylamino)äthanol [11] in 20 ml Dioxan wurden 19 mg (0,1 mmol) *p*-TsOH (Monohydrat) und 4,26 g (4 mmol) Tetrahydroechinocandin B (4) gegeben. Nach 9 Std. Stehenlassen bei RT. wurde mit 0,1 ml wässrigem 1N NaHCO_3 neutralisiert und i.V. bei 40° eingedampft. Der Rückstand wurde in 10 ml Methanol gelöst und an 120 g Sephadex LH 20 mit Methanol aufgetrennt. Dabei enthielten die zuerst eluierten Fraktionen 5,6 g angereichertes 12 und die späteren Fraktionen 7,1 g 2-(*N*-Benzyloxycarbonylamino)äthanol. Die 5,6 g aus der Sephadex-Gelfiltration wurden an 75 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol/Wasser 88:11:1 chromatographiert, wobei 3,7 g (74%) 12 als farbloses amorphes Pulver erhalten wurden. Smp. 187-189°; $[\alpha]_D^{20} = -36,0^\circ$ ($c = 0,66$, Methanol). - $^1\text{H-NMR.}$: 2,6 (t, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3,2 (t, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 5,0 (s, 2 H, $\text{CO-O-CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$); 7,3 (s, 5 H, C_6H_5).

$\text{C}_{62}\text{H}_{96}\text{N}_8\text{O}_{18}$ Ber. C 60,0 H 7,8 N 9,0 O 23,2%
(1241,488) Gef. „ 59,8 „ 7,9 „ 8,9 „ 23,3%

(Tetrahydroechinocandin B)-(2-aminoäthyl)äther (13). Zur Suspension von 1,4 g vorhydriertem 10proz. Pd/C in 100 ml Äthanol/Eisessig 9:1 wurden 14 g 12 in 100 ml desselben Lösungsmittel-Gemisches gegeben und während 4 Std. bei RT. unter Atmosphärendruck hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wurde i.V. eingedampft und das Rohprodukt (14,1 g) an 100 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol/Wasser 80:17,5:2 (+0,5% Essigsäure) chromatographiert. Die Spitzenfraktionen wurden vereinigt, eingedampft und anschliessend in 50 ml Methanol aufgenommen; durch Fällung mit 300 ml Äther wurden 12,8 g (97%) $13 \cdot \text{CH}_3\text{COOH}$ erhalten. Zur Freisetzung der Base wurden 8,59 g $13 \cdot \text{CH}_3\text{COOH}$ in 250 ml Chloroform/2-Propanol 7:3 unter Zugabe von 20 ml Wasser gelöst. Darauf wurden 10 ml 1N NaHCO_3 zugegeben, die organische Phase abgetrennt und 2mal mit je 100 ml Chloroform/2-Propanol 7:3 nachextrahiert. Nach Trocknen der vereinigten organischen Auszüge über Na_2SO_4 wurde i.V. eingedampft, der Rückstand in 25 ml Methanol aufgenommen und die Lösung zu 500 ml Äther getropft, wobei 7,59 g (93%) 13 (freie Base) als amorphes weisses Fällungsprodukt anfielen. Smp. 213-216°; $[\alpha]_D^{20} = -45,1^\circ$ ($c = 1,60$, Methanol). - $^1\text{H-NMR.}$: 2,6 (t, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$) und 3,3 (t, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$).

$\text{C}_{54}\text{H}_{90}\text{N}_8\text{O}_{16}$ Ber. C 58,6 H 8,2 N 10,1 O 23,1%
(1107,354) Gef. „ 58,3 „ 8,3 „ 10,0 „ 23,5%

(Tetrahydroechinocandin C)-[2-(*N*-benzyloxycarbonylamino)äthyl]äther (14). Die Herstellung erfolgte wie bei 12 beschrieben. Aus 2,62 g (2,5 mmol) Tetrahydroechinocandin C wurden nach chromatographischer Reinigung 2,15 g (70%) 14 als amorphes weisses Pulver erhalten. Smp. 180-182°; $[\alpha]_D^{20} = -38,3^\circ$ ($c = 0,71$, Methanol).

$\text{C}_{62}\text{H}_{96}\text{N}_8\text{O}_{17}$ Ber. C 60,8 H 7,9 N 9,1 O 22,2%
(1225,489) Gef. „ 61,3 „ 8,0 „ 9,4 „ 22,4%

3) 85proz. Präparat (stabilisiert mit Essigsäure), Fluka.

4) Lit. [9]; Smp. 117°.

(Tetrahydroechinocandin C)-(2-aminoäthyl)äther-hydrochlorid (**15** · HCl). Die hydrogenolytische Abspaltung der Benzylloxycarbonyl-Schutzgruppe erfolgte wie bei der Herstellung von **13**. Aus 1,7 g **14** wurden nach Chromatographie an Kieselgel mit Chloroform/Methanol/Wasser 70:25:5 (+0,5% Essigsäure) 1,56 g **15** · CH₃COOH erhalten.

Zur Bereitung des Hydrochlorids wurden 1,56 g **15** · CH₃COOH in 6 ml Methanol gelöst und unter Eiskühlung tropfenweise mit einer ätherischen HCl-Lösung bis zur schwach sauren Reaktion versetzt. Durch Zugabe von 250 ml Äther wurde das Hydrochlorid von **15** ausgefällt: weisses amorphes Pulver vom Smp. 190–192°; $[\alpha]_D^{20} = -44,7^\circ$ ($c = 0,52$, Methanol).

| | | | | | |
|--|-------------|-------|--------|-------|---------|
| C ₅₄ H ₉₀ N ₈ O ₁₅ · HCl | Ber. C 57,5 | H 8,1 | Cl 3,1 | N 9,9 | O 21,3% |
| (1127,816) | Gef. „ 56,9 | „ 8,2 | „ 3,5 | „ 9,8 | „ 21,7% |

Desoxyverbindung **15** aus (Tetrahydroechinocandin B)-(2-aminoäthyl)äther (**13**). Zunächst wurden 1,0 g 10proz. Pd/C in 25 ml 0,1N HCl während 30 Min. vorhydriert; nach Zugabe von 1,0 g **13** · CH₃COOH in 25 ml 0,1N HCl wurde 15 Std. bei 50° unter Atmosphärendruck hydriert. Der Katalysator wurde abzentrifugiert, die wässrige Lösung mit 5 ml 1N NaOH neutralisiert und 2mal mit je 250 ml Chloroform/2-Propanol 7:3 extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase über Na₂SO₄ wurde i.V. eingedampft und der Rückstand an 50 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol/Wasser 80:17,5:2 (+0,5% Essigsäure) chromatographiert: 223 mg **15** · CH₃COOH.

Zur Bereitung des Hydrochlorids wurde das Produkt in 0,5 ml Methanol gelöst und danach unter Eiskühlung tropfenweise mit ätherischer HCl-Lösung bis zur schwach sauren Reaktion versetzt. Durch Zugabe von 50 ml Äther wurde das Hydrochlorid ausgefällt: amorphes Pulver vom Smp. 190–193°; $[\alpha]_D^{20} = -43,2^\circ$ ($c = 0,78$, Methanol). Dieses erwies sich als identisch (¹³C-NMR.) mit authentischem (Tetrahydroechinocandin C)-(2-aminoäthyl)äther-hydrochlorid, hergestellt aus Tetrahydroechinocandin C über die Carbobenzoxyverbindung **14**.

Zur Freisetzung der Base wurden 492 mg Hydrochlorid von **15** in 100 ml Chloroform/2-Propanol 7:3 gelöst und nach Zugabe von 10 ml Wasser mit 5 ml 1N NaOH-Lösung ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde 2mal mit je 100 ml Chloroform/2-Propanol 7:3 nachextrahiert, die vereinigten organischen Extrakte über Na₂SO₄ getrocknet und i.V. eingedampft, wobei **15** als freie Base anfiel. Smp. 204–209°; $[\alpha]_D^{20} = -42,8^\circ$ ($c = 0,69$, Methanol).

| | | | | |
|--|-------------|-------|--------|---------|
| C ₅₄ H ₉₀ N ₈ O ₁₅ | Ber. C 59,4 | H 8,3 | N 10,3 | O 22,0% |
| (1091,355) | Gef. „ 59,0 | „ 8,4 | „ 10,1 | „ 22,3% |

(Tetrahydroechinocandin B)-bis(äthylthioäther) (**16**). Man liess 10,64 g (10 mmol) Tetrahydroechinocandin B (**4**) in 50 ml Dioxan/Dimethylformamid 9:1 mit 12,4 g (0,2 mol) Äthylmercaptan und 760 mg (4 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure 4 Std. bei 50° stehen. Die Säure wurde mit 1N NaHCO₃ neutralisiert, das überschüssige C₂H₅SH i.V. abdestilliert und der Rückstand in Chloroform/2-Propanol 7:3 aufgenommen. Nach 2maligem Waschen mit Wasser wurde die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und i.V. eingengt. Das Rohprodukt wurde an 1,5 kg Kieselgel mit Chloroform/Methanol/Wasser 88:11:1 chromatographiert: 8,98 g (78%) **16** als Epimerengemisch. Smp. 200–203° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -48,0^{(5)}$ ($c = 1,03$, Methanol). - ¹H-NMR.: 2,5 (*qa*, 2 H, C₈(AS1)-S-CH₂); 2,05 (2*qa*, 2 H, C₇(AS4)~S-CH₂).

| | | | | | |
|---|-------------|-------|-------|--------|--------|
| C ₅₆ H ₉₃ N ₇ O ₁₄ S ₂ | Ber. C 58,4 | H 8,1 | N 8,5 | O 19,4 | S 5,6% |
| (1152,523) | Gef. „ 58,3 | „ 8,4 | „ 8,6 | „ 19,7 | „ 5,4% |

(Tetrahydroechinocandin C)-äthylthioäther (**17**). Eine Lösung von 10,49 g (10 mmol) Tetrahydroechinocandin C (**5**) in 100 ml Dioxan wurde 2 Std. mit 37 ml (0,5 mol) Äthylmercaptan und 190 mg (0,1 mmol) *p*-Toluolsulfonsäure bei 50° gerührt. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei **16**; Chromatographie des Rohproduktes an 1 kg Kieselgel mit Chloroform/Methanol/Wasser 88:11:1 ergab 7,66 g (71%) **17** als amorphes weisses Pulver; Smp. 205° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -44^\circ$ ($c = 1,1$, Methanol). - ¹H-NMR.: 2,5 (*m*, 2 H, CH₂-S).

| | | | | | |
|--|-------------|-------|-------|--------|--------|
| C ₅₄ H ₈₉ N ₇ O ₁₄ S | Ber. C 59,4 | H 8,2 | N 9,0 | O 20,5 | S 2,9% |
| (1092,405) | Gef. „ 59,3 | „ 8,5 | „ 9,1 | „ 21,0 | „ 3,0% |

⁵) Opt. Drehung abhängig von der Zusammensetzung des Epimerengemisches.

5-Orn-desoxy-tetrahydroechinocandin C (18) aus 17. Die Hydrierung von 1,09 g (1 mmol) **17** erfolgte in 10 ml Dioxan mit ca. 5 g Raney-Nickel während 24 Std. bei 40°. Anschliessend wurde über Talk/Hyflo filtriert und der Rückstand ausgiebig mit Chloroform/Methanol 1:1 gewaschen. Nach Vereinigen der Waschlösung mit dem Filtrat wurde zur Trockene eingengt und der Rückstand (1,02 g) an 200 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol/Wasser 87:12:1 chromatographiert. Es resultierten 477 mg (46%) **18** als amorphes weisses Pulver. Smp. 206–208°; $[\alpha]_D^{20} = -36,4^\circ$ ($c = 1,2$, Methanol).

| | | | | |
|-------------------------|-------------|-------|-------|---------|
| $C_{52}H_{85}N_7O_{14}$ | Ber. C 60,5 | H 8,3 | N 9,5 | O 21,7% |
| (1032,287) | Gef. „ 60,7 | „ 8,5 | „ 9,8 | „ 22,0% |

Bis-desoxyverbindung 18 aus 16. Die Hydrierung von 1,15 g (1 mmol) **16** erfolgte in 10 ml Dioxan mit ca. 10 g Raney-Nickel während 48 Std. Nach Aufarbeitung wie oben ergab die Chromatographie des Rohproduktes (1,06 g) an 200 g Kieselgel mit Chloroform/Methanol/Wasser 88:11:1 300 mg (29%) **18** als weisses amorphes Pulver. Smp. 205–208°; $[\alpha]_D^{20} = -36,2^\circ$ ($c = 0,53$, Methanol).

| | | | | |
|-------------------------|-------------|-------|-------|---------|
| $C_{52}H_{85}N_7O_{14}$ | Ber. C 60,5 | H 8,3 | N 9,5 | O 21,7% |
| (1032,287) | Gef. „ 60,4 | „ 8,6 | „ 9,2 | „ 21,9% |

Die Bis-desoxyverbindung **18** (aus **16**) erwies sich aufgrund der analytischen und spektralen Daten als identisch mit der aus **17** hergestellten Verbindung **18**.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] C. Keller-Juslén, M. Kuhn, H. R. Loosli, T. J. Petcher, H. P. Weber & A. von Wartburg, *Tetrahedron Letters* 1976, 4147.
- [2] K. B. Raper & D. I. Fennel, 'The Genus *Aspergillus*', Williams & Williams Co., Baltimore 1965.
- [3] F. Benz, F. Knüsel, J. Nüesch, H. Treichler, W. Voser, R. Nyfeler & W. Keller-Schierlein, *Helv.* 57, 2459 (1974).
- [4] G. Koyama, *Helv.* 57, 2477 (1974).
- [5] W. Keller-Schierlein & J. Widmer, *Helv.* 59, 2021 (1976).
- [6] S. Moore & W. H. Stein, *J. biol. Chemistry* 192, 663 (1951).
- [7] E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl & W. Simon, «Strukturaufklärung organischer Verbindungen», Springer-Verlag 1976.
- [8] W. H. Hartung & R. Simonoff, in 'Organic Reactions', Vol. VII, p. 263, Ed. R. Adams, J. Wiley & Sons, Inc., New York 1953.
- [9] 'Handbook of Chemistry & Physics', 58th ed., Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, 1977–78.
- [10] T. Ukai, Y. Yamamoto & M. Yotsuzuka, *Chem. Abstr.* 50, 5665^c (1956).
- [11] W. G. Rose, *J. Amer. chem. Soc.* 69, 1385 (1947).