

24. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen

190. Mitteilung¹⁾

Über das 4-Oxo-homotyrosin, ein Abbauprodukt des Echinocandins B

von Walter Keller-Schierlein und Beda Joos

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule, CH-8092 Zürich

(2.XI.79)

Summary

D,L-4-Oxo-homotyrosine was synthesized by the acetylaminomalonic ester pathway. The optical resolution was carried out by means of the enzyme acylase I. The L-configuration of the enzymatically produced amino acid was confirmed by degradation to L-aspartic acid.

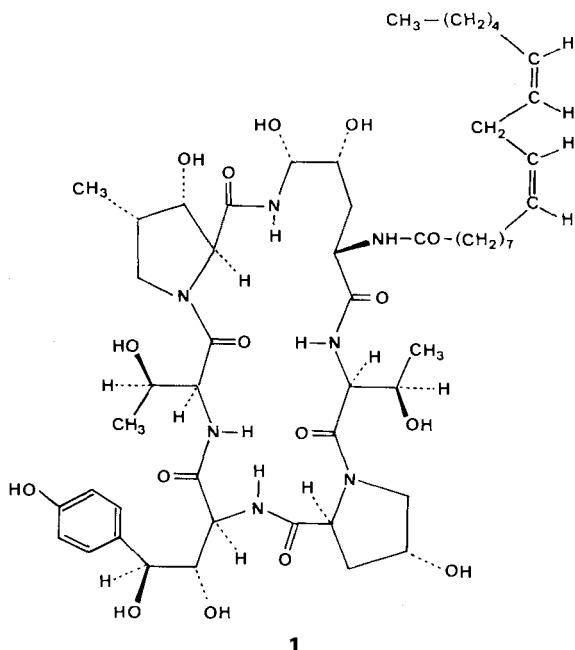
4-Oxo-homotyrosine obtained by degradation of the polypeptide antibiotic echinocandine B has D-configuration, but its optical purity is low. A hypothetical explanation for its formation from the (2S,3S,4S)-3,4-dihydroxyhomotyrosine residue of echinocandine B is proposed.

Dem antifungischen Polypeptid-Antibioticum Echinocandin B wird aufgrund der Röntgenstrukturanalyse eines Schweratom-Derivates [3]²⁾, sowie eingehender Abbauprobe [2] die Formel **1** zugeschrieben: diese enthält u.a. einen Rest des 3,4-Dihydroxy-homotyrosins, dem aufgrund der Röntgenanalyse die (2S,3S,4S)-Konfiguration **2** zukommt. Beim solvolytischen Abbau wird diese Aminosäure nicht unverändert erhalten: aus den Produkten der Hydrolyse mit 6N HCl wurde als einziges aromatisches Abbauprodukt das 1-Amino-3-(*p*-hydroxyphenyl)-propan-2-on (**3**) isoliert: offensichtlich wurde die benzyliche Hydroxylgruppe durch Wasserabspaltung eliminiert, worauf die gebildete β -Ketosäure decarboxyliert wurde.

Völlig anders verlief der Abbau von **1** mit wasserfreien Säuren [4]. Durch Erwärmen von Tetrahydroechinocandin B in Trifluoressigsäure und anschließende Methanolyse bildete sich ein Tripeptid, das u.a. den Rest des 4-Oxo-homotyrosins (**4**) enthielt; durch saure Hydrolyse des Tripeptids konnte das 4-Oxo-homotyrosin gewonnen werden. Ähnlich verlief der Abbau mit konz. Schwefelsäure [4]. Mit wasserfreier Säure wird demnach unerwarteterweise die nichtbenzyliche Hydroxyl-

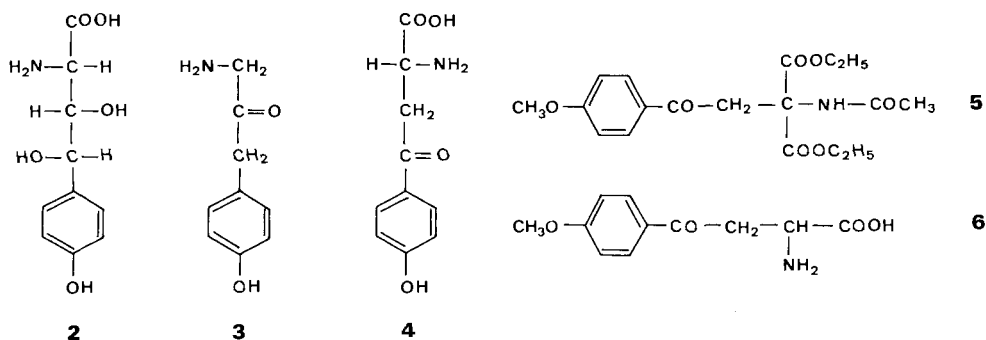
¹⁾ 191. Mitt. s. [1].

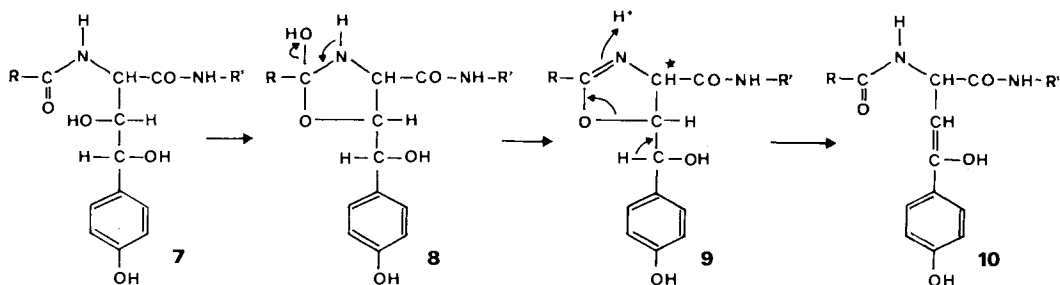
²⁾ Das daraus abgeleitete Bild der Molekel ist unvollständig, da die Linolsäure-Seitenkette durch die Röntgenanalyse nicht erfasst wurde; wahrscheinlich deswegen, weil sie im Kristallgitter z.T. ungeordnet vorliegt.



gruppe in Stellung 3 des 3,4-Dihydroxy-homotyrosinrestes durch Wasserabspaltung eliminiert. Aufgrund von Drehungsverschiebungen vermuteten wir, dass dem schwach linksdrehenden Abbauprodukt 4 die *D*-Konfiguration zukomme [4]; andererseits ist der 3,4-Dihydroxy-homotyrosinrest im intakten Antibioticum gemäss Röntgenstrukturanalyse [3] sicher ein *L*-Aminosäurerest. Im folgenden beschreiben wir Versuche, diesen scheinbaren Widerspruch aufzuklären.

Zunächst wurde *D,L*-4-Oxo-homotyrosin (*D,L*-4) synthetisch hergestellt. Durch Umsetzung von *p*-Methoxyphenacylbromid mit Acetylaminalonsäurediäthylester [5] und durch Hydrolyse des Kondensationsproduktes 5 mit Salzsäure wurde der Methyläther 6 erhalten; bei der Verwendung von Bromwasserstoffsäure wurde gleichzeitig auch die Methyläthergruppe gespalten. Das kristalline Produkt besass die analytischen und spektroskopischen Eigenschaften von *D,L*-4 [4].





Für die Racematspaltung verwendeten wir die in vielen Fällen bewährte enzymatische Methode mit Acylase I [6]. Da die *N*-Acetylverbindung von *D,L*-4 vom Enzym kaum angegriffen wurde, setzten wir das in manchen Fällen besser spaltbare *N*-Chloracetylderivat ein [7]. Zwar verlief die enzymatische Spaltung auch hier viel langsamer und weniger vollständig als etwa beim *N*-Acetyl-*D,L*-phenylalanin, erlaubte aber doch die Herstellung einer genügenden Menge der rechtsdrehenden Aminosäure; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +41,9^\circ$ ($c=0,49$, 1 N HCl). Das regenerierte Chloracetylderivat gab bei der sauren Hydrolyse die linksdrehende Aminosäure mit einer optischen Reinheit von ca. 50% $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -20,2^\circ$ ($c=0,4$, 1 N HCl).

Von der rechtsdrehenden Form war schon aufgrund der Bildungsweise anzunehmen, dass es sich um die *L*-Aminosäure handle. Diese Annahme wurde durch Abbau mit Ozon [8] bestätigt, der optisch reine *L*-Asparaginsäure lieferte.

Der Abbau von Tetrahydrochinocandin B mit wasserfreien Säuren, den wir mit ähnlichem Ergebnis wie früher [4] wiederholten, führt zu linksdrehendem 4-Oxo-homotyrosin, (4), dem aufgrund obiger Ergebnisse *D*-Konfiguration zugeschrieben werden muss; seine optische Reinheit ist allerdings gering (32% [4] bzw. 11% nach dem Umkristallisieren).

Aufgrund dieses Befundes könnte für die Bildung von *D*-4-Oxo-homotyrosin durch Abbau von Tetrahydrochinocandin B, welches aber den entsprechenden (2*S*)-Aminosäurerest enthält, die durch die Formeln 7-10 dargestellte Hypothese unter Nachbargruppen-Beteiligung angeführt werden: im angenommenen Zwischenprodukt 9 ist das (mit * bezeichnete) α -ständige Proton durch die C=N-Doppelbindung und die Amid-Carbonylgruppe doppelt aktiviert und sollte leicht austauschbar sein; die Reprotonierung kann, da sich der Vorgang in einer chiralen Molekel abspielt, sehr wohl bevorzugt von der Seite erfolgen, die zu einem *D*-Aminosäurerest führt.

Dem Stipendienfonds der *Basler chemischen Industrie* und der *ETH Zürich* danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Allgemeines: s. [9]. 2-Acetylamino-2-(*p*-methoxyphenacyl)-malonsäure-diäthylester (5). Zu 2,42 g Natrium in 120 ml abs. Alkohol wurden unter leichtem Erwärmen 25,9 g Acetamidomalonsäurediäthylester gegeben [5]. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurden in kleinen Portionen 23,5 g *p*-Methoxyphenacylbromid zugegeben und 18 Std. gerührt. Nach 24 Std. Stehen bei 0° wurde filtriert, der

Rückstand gut mit Wasser gewaschen und nach dem Trocknen über P_2O_5 zweimal aus Essigester umkristallisiert. Ausbeute 34,37 g (92%) Kristalle, Smp. 119° . - IR. ($CHCl_3$): 3420, 1748, 1682, 1605, 1580, 1500 cm^{-1} . - 1H -NMR. ($CDCl_3$): 1,26 (t, $J=7$, 6 H); 1,98 (s, 3 H); 3,86 (s, 3 H); 4,22 (s, 2 H); 4,28 (qa, $J=7$, 4 H); 6,92 und 7,92 ($AA'BB'$ -System, $J_{AB}=9$, 4 H); 7,12 (br. s, NH).

$C_{18}H_{23}NO_7$ (365,37) Ber. C 59,18 H 6,33 N 3,83% Gef. C 59,21 H 6,43 N 3,75%

D,L-4-Oxo-homotyrosinmethyläther-hydrochlorid (HCl-Salz von 6). Der Ester **5** (2 g in 15 ml Eisessig) und 15 ml konz. Salzsäure wurden 5 Std. unter Rückfluss gekocht. Während dieser Zeit wurden in mehreren Portionen weitere 15 ml konz. Salzsäure zugegeben. Nach dem Eindampfen im Vakuum wurde zweimal etwas Wasser zugefügt und erneut eingedampft. Umkristallisieren aus Alkohol/Äther (Filtrieren der heissen Lösung) gab 1,32 g (93%) Hydrochlorid von **6** mit Smp. 183° (Zers.). - IR. (KBr): 3650-2250 (br.), 1742, 1670, 1608 cm^{-1} . - 1H -NMR. (DMSO- d_6): 3,72 (d, $J=5$, 2 H); 3,86 (s, 3 H); 4,30 (t, $J=5$, 1 H); 7,06 und 7,95 ($AA'BB'$ -System, $J_{AB}=9$, 4 H); 8,1-9,0 (br., 3 H, mit D_2O austauschbar).

$C_{11}H_{14}ClNO_4$ Ber. C 50,87 H 5,43 N 5,39 Cl 13,65%
(259,69) Gef. ,, 50,68 ,, 5,43 ,, 5,27 ,, 13,78%

D,L-4-Oxo-homotyrosin (4). Der Ester **5** (5 g) wurde mit 330 ml 48proz. Bromwasserstoffsäure 3 Tage unter Rückfluss gekocht. Der dunkelbraune Eindampfrückstand wurde in 2 l 1N CH_3COOH bei 70° mit Aktivkohle gerührt und durch *Celite* filtriert. Das Filtrat wurde langsam durch eine Säule ($2,5 \times 72\text{ cm}$) mit *Amberlite* IR-45 (20-50 mesh, OH-Form) filtriert und mit 2N CH_3COOH nachgewaschen, bis das Eluat mit Ninhydrin keine Farbreaktion mehr gab (2,9 l Eluat). Nach dem Einengen i.V. kristallisierten 2,41 g (84%) 4-Oxo-homotyrosin aus, Smp. $233-241^\circ$ (Zers.). - IR. (KBr): 3650-2100 (br.), 1662, 1630, 1610-1540 (br.). - 1H -NMR. (CF_3COOD): 7,19 und 8,11 ($AA'BB'$ -System, $J_{AB}=9$, 4 H; 4,89 (m, 1 H); 4,17 (d, $J=4,5$, 2 H).

$C_{10}H_{11}NO_4$ (209,20) Ber. C 57,41 H 5,30 N 6,70% Gef. C 57,46 H 5,32 N 6,64%

N-Chloracetylderivat von D,L-4. Zu 2,3 g **D,L-4-Oxo-homotyrosin** in 7 ml 4N Natronlauge wurden unter Rühren bei 0° abwechselungsweise in kleinen Portionen 3,8 g Chloressigsäureanhydrid und 5,5 ml 4N Natronlauge zugegeben [7]. Nach 2 Std. wurde mit konz. Salzsäure angesäuert und die mit Wasser auf 50 ml verdünnte Lösung 4mal mit je 100 ml Essigester ausgezogen. Nach dem Trocknen und Eindampfen wurde die Lösung des Rückstandes in Methanol durch Sephadex LH-20 ($2 \times 78\text{ cm}$) chromatographiert. Die gemäss DC. einheitlichen Fraktionen gaben nach dem Eindampfen und Umkristallisieren aus Essigester-Petroläther 1,82 g (58%) Chloracetylderivat, Smp. 177° . - IR. (KBr): 3700-2400 (br.), 1655, 1610-1560 (br.). - 1H -NMR. (CD_3OD): 3,52 ($d \times d$, $J_1=18$, $J_2=5$, 1 H); 3,66 ($d \times d$, $J_1=18$, $J_2=6$, 1 H); 4,12 (s, 2 H); 4,7-5,1 (m, 1 H); 6,93 und 7,97 ($AA'BB'$ -System, $J_{AB}=9$, 4 H). - ^{13}C -NMR. (CD_3OD): 40,4 (t), 43,0 (t), 49,9 (d), 116,3 (d, 2 C), 129,3 (s), 131,8 (d, 2 C), 163,9 (s), 168,7 (s), 174,0 (s), 197,4 (s).

L-4-Oxo-homotyrosin (L-Form von 4). Zu einer Suspension von 1,26 g Chloracetylderivat von **D,L-4** in 40 ml Wasser wurden 4,4 ml 1N Natronlauge zugetropft, wobei eine homogene Lösung von pH 7,3 entstand. Nach der Zugabe von 100 mg Acylase I (*Fluka AG*, Buchs SG) liess man 28 Std. bei 38° stehen. Nach der Zugabe von ca. 1 ml Eisessig wurde 2 Tage auf 0° gekühlt, vom ausgeschiedenen Protein abfiltriert, im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand durch 3maliges Ausziehen mit je 50 ml Essigester vom Chloracetylderivat befreit. Der unlösliche Anteil (405 mg) wurde mit 1N Essigsäure an Sephadex G-15 chromatographiert und die ninhydrinpositiven Fraktionen zu 128 mg (14%) krist. L-4-Oxo-homotyrosin eingedampft. Smp. $210-216^\circ$ (Zers.). - $[\alpha]_D^{25} = +41,9^\circ$ ($c=0,49$ in 1N HCl). IR. (KBr): 3650-2100 (br.), 1655, 1602, 1552. - 1H -NMR. (CF_3COOD) wie die **D,L**-Verbindung (s. oben).

Unter gleichen Bedingungen wurden aus N-Acetyl-D,L-phenylalanin schon nach 2 Std. 18% optisch reines L-Phenylalanin erhalten.

Eine Lösung von **4** (L-Form) in verd. HCl gab beim Eindampfen das Hydrochlorid als farbloses Pulver. Nach 2maligen Eindampfen mit wenig Wasser und Trocknen im Hochvakuum Smp. $186-198^\circ$ (Zers.). $[\alpha]_D = +19,6^\circ$ ($c=0,38$ in Wasser). - IR. (KBr): 3650-2200 (br.), 1742, 1661, 1608 cm^{-1} .

$C_{10}H_{12}ClNO_4$ Ber. C 48,89 H 4,92 N 5,70 Cl 14,43%
(245,66) Gef. ,, 48,84 ,, 5,01 ,, 5,52 ,, 14,30%

Angereichertes D-4-Oxo-homotyrosin. Die in Essigester löslichen Anteile nach der enzymatischen Spaltung (938 mg) gaben beim Chromatographieren an 100 g Kieselgel (Elution mit $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3:1) 728 mg Chloracetylderivat mit Smp. 177° , $[\alpha]_D = -11,8^\circ$ ($c = 1,1$ in EtOH). 150 mg davon wurden 2 Std. mit 5 ml 5N HCl unter Rückfluss hydrolysiert. Nach 2maligen Umkristallisieren des Rückstands aus Alkohol/Äther wurden 50 mg D-4-Oxo-homotyrosin-hydrochlorid erhalten. $[\alpha]_D = -20,2^\circ$ ($c = 0,4$ in 1N HCl); optische Reinheit ca. 57%.

Abbau zu L-Asparaginsäure. Das synthetische L-4-Oxo-homotyrosin (L-Form von 4) (108 mg) in 25 ml 5proz. wässr. Ameisensäure wurde während 24 Std. bei 20° ozonisiert (ca. 2 g O_3 in 20 l O_2 pro Std.) [8]. Nach Zugabe von 2 ml 30proz. Wasserstoffsuperoxid und 2 ml Ameisensäure wurde 3 Tage bei 20° stehengelassen und dann eingedampft. Der Rückstand wurde mit Wasser an Amberlite IR-45, darauf an Sephadex G-10 (1×35 cm) chromatographiert und gab 31 mg (45%) nach DC. einheitliche Asparaginsäure. 10 mg davon wurden aus ca. 0,5 ml Wasser umkristallisiert zu 4,5 mg farblosen Kristallen, Smp. $320\text{--}323^\circ$ (Zers.), die durch Vergleich mit authentischer L-Asparaginsäure (DC. und IR. in KBr) identifiziert wurden. $[\alpha]_D^{25} = +5,95^\circ$ ($c = 0,37$ in Wasser); $+23,3^\circ$ ($c = 0,43$ in 5N HCl); Vergleichswerte $+6,23^\circ$ bzw. $+24,6^\circ$.

D-4-Oxo-homotyrosin aus Echinocandin B. Eine Lösung von 1 g Tetrahydroechinocandin B [2] in 50 ml Trifluoressigsäure wurde 16 Std. auf 75° erwärmt. Nach dem Eindampfen wurde das rohe Peptidgemisch 16 Std. mit 40 ml 6N Salzsäure im zugeschmolzenen Rohr auf 110° erhitzt. Die entstandene Stearinsäure wurde durch Ausschütteln mit Äther entfernt und die wasserlöslichen Anteile nach dem Eindampfen mit 1N Essigsäure an Sephadex G-15 ($2,5 \times 39$ cm) chromatographiert. Zuerst wurden die schon früher [2] als Hydrolyseprodukte von Echinocandin B identifizierten Aminosäuren eluiert. Spätere Fraktionen (35 mg, unrein) enthielten u. a. das 1-Amino-3-(*p*-hydroxyphenyl)-2-propanon, das als Diacetylderivat (12 mg nach präp. DC. und Umkristallisieren) identifiziert wurde. Zuletzt wurden 81 mg (41%) 4-Oxo-homotyrosin erhalten, von dem 25 mg direkt aus der Eluierungslösung auskristallisierten. $[\alpha]_D = -4,66^\circ$ ($c = 0,86$ in 1N HCl). Ein früher [4] hergestelltes nicht umkristallisiertes Präparat hatte $[\alpha]_D = -13,4^\circ$ gezeigt.

Die Mikroanalysen verdanken wir den Herren *W.* und *D. Manser*, die Spektren unserem Laboratorium für Instrumentalanalyse (Leitung Prof. Dr. *J. F. M. Oth*).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] *W. A. König, H. Drautz & H. Zähler*, Liebigs. Ann. Chem. (im Druck).
- [2] *F. Benz, F. Knüsel, J. Nüesch, H. Treichler, W. Voser, R. Nyfeler & W. Keller-Schierlein*, Helv. 57, 2459 (1974).
- [3] *C. Keller-Juslén, M. Kuhn, H. R. Loosli, T. J. Petcher, H. P. Weber & A. von Wartburg*, Tetrahedron Letters 1976, 4147; vgl. auch *R. Traber, C. Keller-Juslén, H. R. Loosli, M. Kuhn & A. von Wartburg*, Helv. 62, 1252 (1979).
- [4] *W. Keller-Schierlein & J. Widmer*, Helv. 59, 2021 (1976).
- [5] *C. E. Dalgliesh*, J. chem. Soc. 1952, 137.
- [6] *S. M. Birnbaum, L. Lewintow, R. B. Kingsley & J. P. Greenstein*, J. biol. Chemistry 194, 455 (1952); vgl. *J. P. Greenstein & M. Winitz*, 'Chemistry of the Amino Acids', (John Wiley & Sons, New York, 1961), Vol. 3, S. 2172 und 2363; *B. Maurer & W. Keller-Schierlein*, Helv. 52, 388 (1969).
- [7] *Th. Wieland in Houben-Weyl*, «Methoden der organischen Chemie» (Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1958), Vol. 11/2, S. 342.
- [8] *H. Corradi & E. Hardegger*, Helv. 38, 2038 (1955); vgl. *W. Keller-Schierlein, A. Klaus, H. U. Naegeli, G. Wolf & H. Zähler*, Experientia 31, 1001 (1975).
- [9] *W. Keller-Schierlein & E. Kupfer*, Helv. 62, 1501 (1979).