

## MANUMYCIN

Karsten Schröder und Axel Zeeck \*

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität, D-34 Göttingen, Windausweg 2

(Received in Germany 13 October 1973; received in UK for publication 30 October 1973)

Das von *Streptomyces parvulus* produzierte Manumycin<sup>1)</sup> wurde aus dem Mycel von Stamm Tü 64<sup>2)</sup> neu isoliert und durch Verteilung (Desaga-Ronor, 400 Kammern, CCl<sub>4</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O = 5/4/1), Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/2% Methanol) und Kristallisation aus Methanol/Wasser (Klärung mit Aktiv-Kohle) gereinigt. Blaßgelbe Sternchen vom Schmp. 139-141°C (Zers.),  $[\alpha]_D^{20} = -185^\circ$  (c = 0.4 in Chloroform). Summenformel (C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) und Mol.-Masse (550) sichern die Analysenzahlen (Ber. C 67.62, H 6.92, N 5.09, O 20.34; Gef. C 67.69, H 7.06, N 4.95, O 20.38), die potentiometrische Titration und das Feld-Desorption-Massenspektrum<sup>3)</sup>. Manumycin hemmt das Wachstum gram-positiver Bakterien, die Wirkung wird durch bislang nicht bekannte Bestandteile komplexer Nährböden abgeschwächt. Die spektroskopischen Daten und die auf drei Wegen (I-III) erhaltenen Abbauprodukte (vgl. Reaktionsschema) führen zur Konstitutionsformel.

Katalytische Hydrierung (Pd/A-Kohle in Methanol) von Manumycin (1) liefert ein komplexes Substanzgemisch, aus dem chromatographisch (Kieselgel, Chloroform/2% Methanol) farbloses Hydromanumycin 2 (Schmp. 93-95°C) in 40% Ausbeute abgetrennt wurde. UV (Methanol):  $\lambda_{\max} = 256$  ( $\epsilon$  23500), 210 nm (30100). MS (70 eV, Hochauflösung): M<sup>+</sup> (m/e 528), das nacheinander C<sub>13</sub>H<sub>24</sub>O, C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>2</sub> und C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O verliert. Chromsäure-Oxidation von 2 bei Raumtemp. (Abbau I) liefert Octan-disäure 5 (identifiziert als Dimethylester C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub> durch Retentionszeit und Fragmentierungsmuster, GC/MS-Kombination) und 2,4,6-Trimethyl-decansäureamid (3), das durch Chloroform-Extraktion der Reaktionslösung bei pH 10 rein erhalten wurde. 3 (C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>NO mit M<sup>+</sup> bei m/e 213) zeigt IR-Amidbanden (1653, 1460 cm<sup>-1</sup>) und die NH<sub>2</sub>-Gruppe im <sup>1</sup>H-NMR<sup>4)</sup> ( $\delta$  5.90/6.41). Es enthält vier C-Methylgruppen, von denen drei ( $\delta$  0.87, komplex) in der Kette stehen und eine ( $\delta$  1.15, d) den Ionen bei m/e 73 (100%) und 86 (48%) nach  $\alpha$ -ständig ist. Methanolyse von 3 führt zum 2,4,6-Trimethyl-decansäure-methylester (4, C<sub>14</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub> mit M<sup>+</sup> bei m/e 228 und Basispeak bei m/e 88), der im GC (6 m-Glassäule, 3 mm  $\phi$ , 3% BDA auf Chromosorb W, 145°C isotherm) in vier Peaks aufspaltet (Diastereomergemisch).

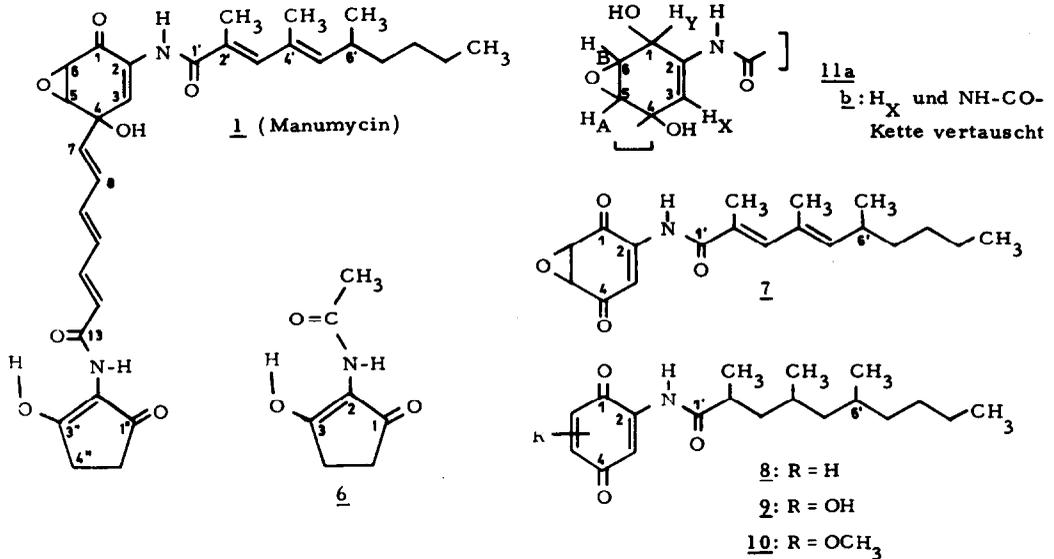
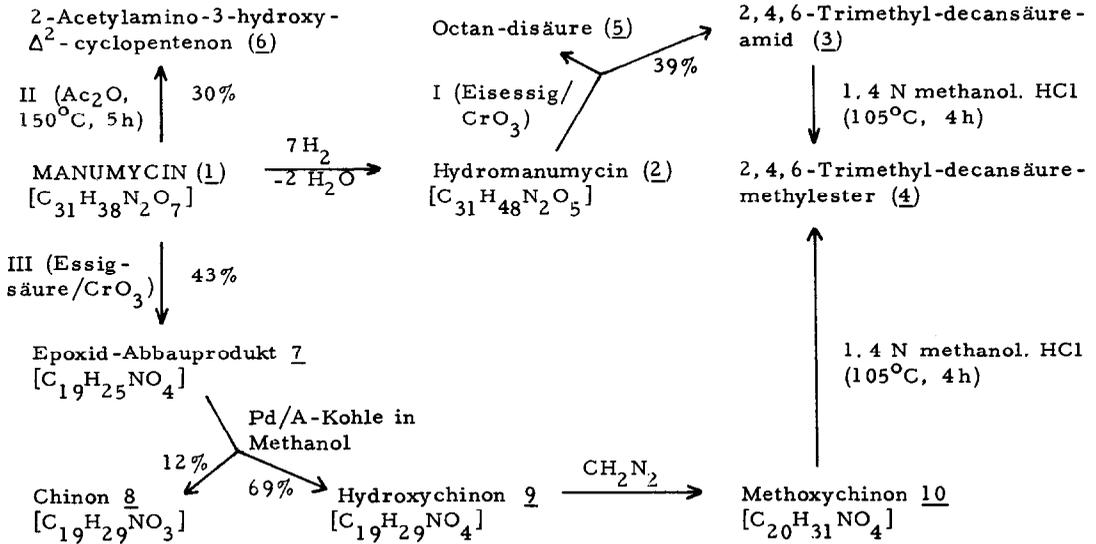
3 beweist, daß eine C<sub>13</sub>-Carbonsäure im Manumycin als Amid (NH bei  $\delta$  7.97) gebunden ist. Die Stellung der Methylgruppen ergibt sich aus dem <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum<sup>4)</sup> von 1. Zwei ( $\delta$  0.88 t, 0.98 d) von insgesamt vier C-Methylgruppen stehen an aliphatischem CH<sub>2</sub> ( $\delta$  1.26, von zwei

anderen CH<sub>2</sub>-Gruppen überlagert) bzw. CH ( $\delta$  2.56 m) und zwei ( $\delta$  1.82 und 2.04) an Olefin-C-Atomen. Wie <sup>1</sup>H-Doppel- und Dreifachresonanzversuche zeigen, koppelt 2.56-CH mit einem Olefin-H ( $\delta$  5.33, J = 10.0 Hz), das seinerseits mit 1.82-CH<sub>3</sub> eine Allyl-Kopplung (J = 1.6 Hz) gibt, die in gleicher Größenordnung zwischen dem 2.04-CH<sub>3</sub> und einem Olefin-H bei  $\delta$  6.77 auftritt. Eine schwache Wechselwirkung der Olefin-H (J < 0.5 Hz) erlaubt es, das Dienon-System der 1-Seitenkette zu formulieren. Ausgehend von der  $\alpha$ -Methylgruppe in 3 und 4 ergibt sich eine alternierende Methylverzweigung (Beteiligung von Propionsäure bei der Biogenese), das Ende der Kette bildet eine n-Butylgruppe ( $\delta$  1.26 für drei CH<sub>2</sub> und 0.88 für CH<sub>3</sub>). Bei der Hydrierung entstehen zwei neue Chiralitätszentren (C-6' ist nativ), so daß für 3 und 4 jeweils vier Diastereomere zu erwarten sind.

Acetolyse von 1 (Abbau II) führte zu 2-Acetylamino-3-hydroxy- $\Delta^2$ -cyclopentenon (6), das im Schm. (166-167°C) und in allen spektroskopischen Daten mit dem aus Limocrocine<sup>5</sup>) und Moenomycin<sup>6</sup>) isolierten Präparaten übereinstimmte. <sup>1</sup>H-NMR<sup>4</sup>):  $\delta$  13.20 (3-OH), 8.22 (NH), 2.53 (schwache A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>-Aufspaltung), 2.19 (s, N-Acetyl). Ähnliche Signale finden sich auch im Spektrum des Manumycins ( $\delta$  13.76, 8.16, 2.56) und Hydromanumycins 2 ( $\delta$  13.24, 8.07, 2.52), so daß ein entsprechender C<sub>5</sub>-Molekülteil auch im Antibioticum mit dem N-Atom zu einem Säureamid gehört. Durch vorsichtige Methanolyse von 2 (1.4 N methanol. HCl, 4 h bei 75°C) wird diese Amidbindung selektiv gespalten, es entsteht ein Methylester C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>NO<sub>4</sub> (M<sup>+</sup> bei m/e 447,  $\delta$  3.64 s für Ester-OCH<sub>3</sub>).

Chromsäure-Oxidation von 1 (Abbau III, 75 proz. Essigsäure, 6 h bei Raumtemp.) und Chromatographie der chloroformlöslichen Reaktionsprodukte an Kieselgel (Chloroform/2% Methanol) lieferte ein gelbes, öliges Abbauprodukt C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub> (M<sup>+</sup> bei m/e 331). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -8.1° (c = 1.0 in Chloroform); UV (Methanol):  $\lambda_{\max}$  = 320 ( $\epsilon$  11400), 245 nm (10600); IR (KBr): 3344 (NH), 1686 (sh), 1675, 1608 cm<sup>-1</sup>. Es enthält den C<sub>13</sub>-Acylamino-Rest des Manumycins [ $\delta$  8.28 (NH), 6.86/2.06 (3'-H/2'-CH<sub>3</sub>, J = 1.6 Hz), 5.41/1.83 (dd/d, 5'-H/4'-CH<sub>3</sub>, J = 1.6 Hz, J<sub>5',6'</sub> = 10.0 Hz), 2.48 (m, 6'-H), 1.26 (breit 3 CH<sub>2</sub>), 0.98/0.88 (d/t, 6'-CH<sub>3</sub>/ $\omega$ -CH<sub>3</sub>, J = 6.0 Hz)], der im MS benachbart C-6' fragmentiert (M-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>, M-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>) bzw. sich unter Spaltung der Säureamidbindung als Acylium-Ion bei m/e 193 (C<sub>13</sub>H<sub>21</sub>O) stabilisiert. Der C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>O<sub>3</sub>-Rest des Moleküls, der im <sup>1</sup>H-NMR<sup>4</sup>) ein ABX-System gibt ( $\delta$  3.92, 3.81, 7.56 mit J<sub>AB</sub> = 3.5 Hz und J<sub>AX</sub> = 2.5 Hz), enthält dem <sup>13</sup>C-NMR<sup>7</sup>) nach zwei C=O- ( $\delta$  189.7, 192.3), zwei CH-Gruppen ( $\delta$  54.1 und 55.4, d bei "off-resonance"-Teilentkopplung, Sauerstoff benachbart) und zwei Olefin-C und ist den Doppelbindungsäquivalenten zufolge ein Bicyclus. Mit diesen Daten am besten in Einklang steht das Epoxid 7. Den Beweis dafür liefert die katalytische Hydrierung. Durch Aufnahme von drei Mol H<sub>2</sub> wird in 7 das Dien des C<sub>13</sub>-Acylamino-Restes gesättigt und der Epoxidring geöffnet: 1) Dehydratisierung in der Reaktionslösung führt zu 8 [M<sup>+</sup> bei m/e 319; UV (Methanol):  $\lambda_{\max}$  = 380 ( $\epsilon$  1100), 256 (5100), 224 nm (7200); <sup>1</sup>H-NMR<sup>4</sup>):  $\delta$  8.01 (NH), 7.60 (s, 3-H), 6.75 (s, 5-H/6-H)], dessen Chromophor-Daten mit denen von 2-Acetamino-1,4-benzochinon<sup>8</sup>)

Reaktionschema



identisch sind. 2) Durch schnellere Dehydrierung beim Aufarbeiten an der Luft entsteht überwiegend 9, das an Oxalsäure-Kieselgel (Chloroform) gereinigt und mit Diazomethan in den Methyläther 10 überführt wurde [M<sup>+</sup> bei m/e 349; UV (Methanol):  $\lambda_{\text{max}} = 400$  ( $\epsilon$  1000),

293 (22300), 220 nm (15000);  $^1\text{H-NMR}^4$ ):  $\delta$  8.20 (NH), 7.50 (s), 5.88 (s, Chinon-H,  $\text{OCH}_3$  benachbart), 3.86 (s,  $\text{OCH}_3$ )]. Methanolyse von 10 führt zum Ester 4 (GC-Vergleich mit dem Präparat aus 3).

Manumycin zeigt im  $^1\text{H-NMR}^4$ ) ein 7 analoges ABX-System ( $\delta$  3.62, 3.72, 7.38). Das mit  $\text{H}_X$  koppelnde  $\text{H}_A$  (W-Kopplung,  $J = 2.5$  Hz) liegt hier jedoch bei höherem Feld als  $\text{H}_B$  ( $J_{AB} = 4.0$  Hz). Danach ist der Epoxidring ( $^{13}\text{C-NMR}^7$ ):  $\delta$  52.8 und 57.4 für zwei CH) und der  $\text{C}_6$ -Ring mit anhängendem  $\text{C}_{13}$ -Acylamino-Rest im Antibioticum analog wie in 7 gebaut. Es fehlt lediglich die C-4-Carbonylgruppe ( $^{13}\text{C-NMR}$ ), d. h. das Manumycin-Molekül muß an diesem C-Atom verlängert werden. Dafür stehen außer dem  $\text{C}_5$ -Teil, dessen Aminogruppe acyliert ist [ $^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  165.9 (13-CO), 197.8 (1"-CO), 175.1 (3"-C), 115.4 (2"-C), 32.5 (5"-C), 25.8 (4"-C)], noch sechs Olefin-CH zur Verfügung. Eine Trien-Kette an C-4 ( $\delta$  71.2 s, tertiäres OH bei  $\delta$  4.28) erklärt die bei der Oxidation des Hydromanumycins 2 nachgewiesene Octandisäure (5), dessen eine Carbonylgruppe aus C-4 hervorgegangen ist.

Offen war zunächst, ob der  $\text{C}_{13}$ -Acylamino-Rest des Manumycins an C-2 oder C-3 des Sechsrings steht. Reduktion mit  $\text{NaBH}_4$  (Methanol) und Chromatographie an Sephadex LH 20 ( $\text{CHCl}_3$ ) führte zum gelben Dihydromanumycin (Partialformel 11a oder 11b), in dessen  $^1\text{H-NMR}$   $\text{H}_X$  auf  $\delta$  6.14 (s, verbreitert) verschoben ist (Fehlen von 1-CO) und nur mit  $\text{H}_A$  ( $\delta$  3.37,  $J = 2.4$  Hz) koppelt, nicht jedoch mit  $\text{H}_Y$  ( $\delta$  4.44), das neu ist und mit  $\text{H}_B$  ( $\delta$  3.61,  $J = 2.8$  Hz) in Wechselwirkung steht ( $J_{AB} = 4.4$  Hz). Damit gilt Partialformel 11a und entsprechend 1 für Manumycin.

Die EI-Massenspektren verdanken wir den Herren Prof. Dr. G. Spiteller und Dr. G. Remberg (Göttingen), die  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren den Herren Dr. P. Christiansen und D. M. Wilson (Berkeley), sowie Herrn Prof. Dr. H. Wolf (Braunschweig). Herrn Prof. Dr. Dr. e. h. H. Brockmann sind wir für die großzügige Förderung unserer Arbeit zu Dank verpflichtet. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft hat die Arbeit durch Sachbeihilfen unterstützt.

#### LITERATUR

- 1) F. Buzzetti, E. Gäumann, R. Hütter, W. Keller-Schierlein, L. Neipp, V. Prelog und H. Zähler Pharm. Acta Helv. **38**, 871 (1963).
- 2) Der untersuchte Stamm wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. H. Zähler (Tübingen) zur Bearbeitung überlassen.
- 3) Das Spektrum verdanken wir den Herren K. H. Maurer und Dr. U. Rapp, Firma Varian MAT (CH 5 DF, Aufnahme während der Achema-73).
- 4) Alle  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren (Varian HA 100) in  $\text{CDCl}_3$ .
- 5) H. Brockmann, H.-U. May, W. Lenk und H. Brockmann jr., Chem. Ber. **102**, 3217 (1969).
- 6) R. Tschesche, D. Lenoir und H. L. Weidenmüller, Tetrahedron Lett. **1969**, 141; R. Tschesche, J. Blumbach und P. Welzel, Liebigs Ann. Chem. **1973**, 407.
- 7)  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren in  $\text{CDCl}_3$  (Varian XL 100, breitbandenkoppelt,  $\delta$ -Werte gegen TMS feldabwärts).
- 8) H. J. Teuber und O. Glosauer, Chem. Ber. **98**, 2939 (1965).