

STRUKTUR DES CYCLOPEPTID-ANTIBIOTIKUMS SL 7810 (= ECHINOCANDIN B)

C.Keller-Juslén, M.Kuhn, H.R.Loosli, T.J.Petcher, H.P.Weber und A.von Wartburg*
Sandoz AG, Pharma Departement, Chemische Forschung, Basel, Schweiz

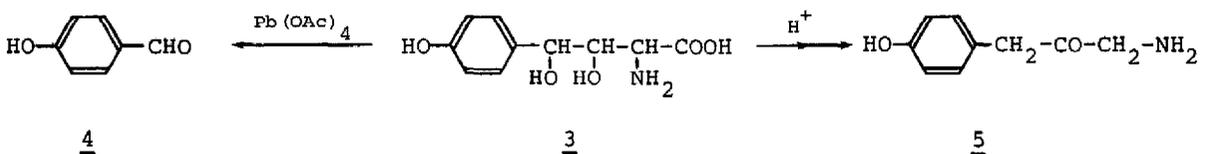
(Received in Germany 9 September 1976; received in UK for publication 27 September 1976)

Aus Submerskulturen von Aspergillus rugulosus (NRRL 8039) konnte ein antifungisch aktiver Hauptmetabolit, SL 7810 (1) als weisses, amorphes Pulver vom Smp. 160-163° isoliert werden; $[\alpha]_D^{20} = -48^\circ$ (MeOH); MG: ~1190 (osmometrisch). Analyse ber. für $C_{52}H_{81}N_7O_{16}$: C 58,9 H 7,7 N 9,2 O 24,1. Gef. C 58,8 H 7,9 N 9,2 O 24,5 %. UV: λ_{max}^{MeOH} 194 nm (log $\epsilon = 5,00$), 276 nm (log $\epsilon = 3,16$), Schulter bei 226 nm (log $\epsilon = 4,12$). IR: ν_{max}^{Nujol} 1630-1680 cm^{-1} (Amidcarbonyl; keine Keton- und Esterbanden). SL 7810 enthält weder COOH- noch basische Gruppen. Die Aminosäureanalyse nach Stein & Moore lieferte Threonin (2 Mol), 4-Hydroxyprolin (1 Mol) sowie mehrere nicht identifizierte Produkte. Bei der sauren Hydrolyse konnte ferner Linolsäure gefasst werden. Im 1H -NMR-Spektrum (d_6 -DMSO) von 1 sind ca. 80 1H -Signale sichtbar. 5 Dublette zwischen 7,2 und 8,2 ppm entsprechen NH-Signalen von Aminosäuren, die Resonanzen bei 6,7; 7,0 und 9,2 ppm (AA'BB'+phenol.OH) einem p-Hydroxyphenylrest. Durch Austausch mit D_2O wurden acht weitere OH-Signale nachgewiesen. Resonanzen der Linolsäure sind bei 5,2-5,5 und 2,8 ppm zu erkennen (-CH=CH-CH₂-CH=CH-). Das ^{13}C -NMR-Spektrum (d_4 -MeOH) zeigt u.a. 7 Carbonylkohlenstoff- (169-176 ppm) sowie vier C-Methyl-Signale. Bei der Hydrierung nimmt SL 7810 2 Mol H_2 (Pd/C) auf und geht unter Absättigung des Linolsäurerests in Tetrahydro-SL 7810 (2) über (Kristalle vom Smp. 190-205°/210-212°). Die im ^{13}C -NMR-Spektrum von 2 gemessenen relativen Intensitäten bestätigten die C_{52} -Formel und das ^{15}N -NMR-Spektrum ¹⁾ (d_4 -MeOH) wies auf 5 CONH- und 2 CON<-Gruppen hin.

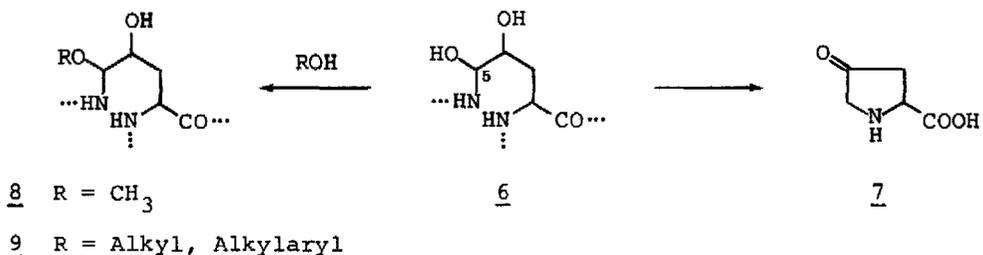
SL 7810 stellt somit ein vermutlich aus 6 Aminosäuren aufgebautes Oligopeptid dar, das einen Linolsäurerest in Amidbindung enthält. Gleiche Strukturelemente besitzt das von Benz et al. ²⁾ aus A. nidulans var. echinulatus isolierte Echino-

candin B. Die Struktur dieses Metaboliten wurde nicht aufgeklärt, doch liegen eingehende Befunde über hydrolytische Abbauprodukte vor ^{2,3)}. Der direkte Vergleich unseres SL 7810 mit Echinocandin B ⁴⁾ zeigte, dass die beiden Pilzstoffe identisch sind.

Eigene Versuche ergaben, dass Tetrahydro-SL 7810 (2) (= Tetrahydro-echinocandin B) ²⁾ zwei Mol NaJO₄ verbraucht und demnach zwei vicinale OH-Gruppen aufweist. Mit Pb(OAc)₄ wurden aus 2 mehrere Bruchstücke, darunter p-Hydroxybenzaldehyd (4) erhalten. Die eine Glykolgruppierung war folglich in der Seitenkette der aromatischen Aminosäure lokalisiert, die wir unter Berücksichtigung des von Benz et al. ²⁾ isolierten Artefakten 1(p-Hydroxyphenyl)-3-aminopropan-2-on (5) als 3,4-Dihydroxy-homotyrosin (3) formulierten.



Die zweite Glykolgruppe war in eine weitere, neue Aminosäure integriert, die sich später als 4,5-Dihydroxy-ornithin (6) erwies. Das bei der Hydrolyse von 1 auftretende L-4-Oxoprolin ²⁾ (7) bildete sich aus 6 als Sekundärprodukt.

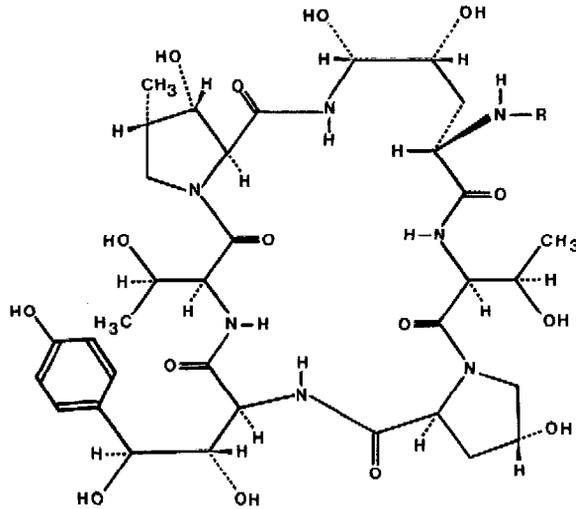


Die für 6 charakteristische, acylierte Amino-Gruppe reagierte mit Alkoholen zu Aetherderivaten: 2 lieferte mit MeOH/TsOH den entsprechenden Methyläther (8), der, wie zu erwarten, nur noch 1 Mol NaJO₄ verbrauchte.

Zur Aufklärung der Struktur des Echinocandin B mittels Röntgenanalyse wurden aus 2 eine Reihe von Aetherderivaten vom Typ 9 hergestellt die Schweratome enthalten. Ideale Voraussetzungen ergaben sich aus der Tatsache, dass die kristallinen Derivate 2-Jodäthyläther, o-Jodbenzyläther und o-Chlormercuribenzyl-

äther mit Tetrahydro-echinocandin B (2) isomorph sind. Tetrahydro-echinocandin B (2), $C_{52}H_{85}N_7O_{16}$, MG = 1064,3, kristallisierte aus Aethanol-Wasser (19:1) als hexagonale Bipyramiden; Raumgruppe $P6_222$, $a = 36,22(1)$, $c = 21,41(1)$ Å, $Z = 12$. Die experimentell bestimmte Dichte von $1,19(1)$ g/cm³ ergab $M = 1454(12)$ pro asymmetrische Einheit, woraus sich ein gewichtsmässiger Anteil von etwa 27 % Lösungsmittel im Kristall berechnen liess. Die Struktur wurde nach der Schweratommethode mit den Daten des isomorphen o-Chlormercuribenzyläthers gelöst und anschliessend mit den Daten von Tetrahydro-echinocandin B verfeinert (ca. 2800 signifikante Strukturparameter, $\sin\theta/\lambda < 0,459$ Å⁻¹). Alle Atome des Peptidteils und einige Lösungsmittelmoleküle waren in der Elektronendichte ersichtlich und wiesen nach der "Least Squares"-Verfeinerung normale Temperaturfaktoren von $B < 6$ Å² auf; hingegen war von der Fettsäure ausser den Atomen der Amidcarbonylgruppe und den ersten zwei CH₂-Gliedern auch in der Differenz-Elektronendichte nichts erkennbar. Offenbar sind die Fettsäureketten ungeordnet und/oder unterliegen starken thermischen Bewegungen.

Die vollständige Struktur des Echinocandin B wird durch Formel 1 illustriert. Echinocandin B stellt ein cyclisches Peptid dar, aufgebaut aus sechs Aminosäuren der L-Reihe, nämlich (2S,4R,5R)-4,5-Dihydroxyornithin, Threonin ²⁾, 4-Hydroxyprolin ²⁾, (2S,3S,4S)-3,4-Dihydroxyhomotyrosin, Threonin ²⁾ und (2S,3S,4S)-4-Methyl-3-hydroxyprolin ^{2,3)}. Die endständige Aminogruppe der formal als 4,5-Dihydroxyornithin bezeichneten Aminosäure schliesst den Peptidring, die α-Aminogruppe ist mit Linolsäure acyliert. Die Röntgenstrukturanalyse des o-Chlormercuribenzyläthers von 2 zeigte ferner, dass die Konfiguration des Orn-C-5 bei der Verätherung unverändert bleibt. Die absolute Konfiguration des Echinocandin B stützt sich auf die absolute Konfiguration des L-Threonins und des L-4-Hydroxyprolins.



1 R = Linolensäurerest: Echinocandin B (= SL 7810)

2 R = Stearinsäurerest: Tetrahydro-echinocandin B

LITERATUR

- 1) Die Aufnahmen der ¹⁵N-NMR-Spektren verdanken wir Herrn Dr. W.E. Hull (Bruker-Physik AG), Karlsruhe, BRD.
- 2) F. Benz, F. Knüsel, J. Nüesch, H. Treichler, W. Voser, R. Nyfeler und W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* 57, 2459 (1974).
- 3) G. Koyama, *Helv. Chim. Acta* 57, 2477 (1974).
- 4) Wir danken Herrn PD Dr. J. Nüesch (Ciba-Geigy) für die Ueberlassung eines Vergleichspräparates von Echinocandin B.