

DIE KONSTITUTION DES KIRROTHRICINS

Axel Zeeck*, Hans-Ullrich Hoppe und Ingeborg Hummel

Organisch-Chemisches Institut der Universität, Tammannstr. 2,
D-3400 Göttingen, Deutschland

Summary: Oxidation of the antibiotic kirrothricin with sodium metaperiodate gave several main degradation products (1, 2, 4). Interpretation of the spectral data of these compounds will lead to the constitution of kirrothricin (3).

Das von *Streptomyces cinnamomeus* (Stamm Tü 89) produzierte Kirrothricin (3) ist ein Engspektrum-Antibioticum, das die Protein-Biosynthese hemmt¹⁾. Durch das Vorliegen eines Tautomerengleichgewichts im Chromophor des Antibioticums, was sich durch Doppelzonenbildung im Chromatogramm an phosphatgepuffertem (pH = 7) Kieselgel (Chloroform/Methanol/33 proz. NH₃ = 80/20/1) und durch Signalaufspaltung im ¹H- und ¹³C-NMR der von der Tautomerie betroffenen Resonanzen zeigt, ist die direkte Interpretation der NMR-Daten des Kirrothricins erschwert. Die Konstitution 3 folgt aus den Abbauprodukten und dem Vergleich mit verwandten Antibiotica der Kirromycin-Gruppe, sowie deren Abbauprodukten²⁾. Gegenüber früheren Angaben^{1,2,3)} ist der Chromophor von 3 verändert.

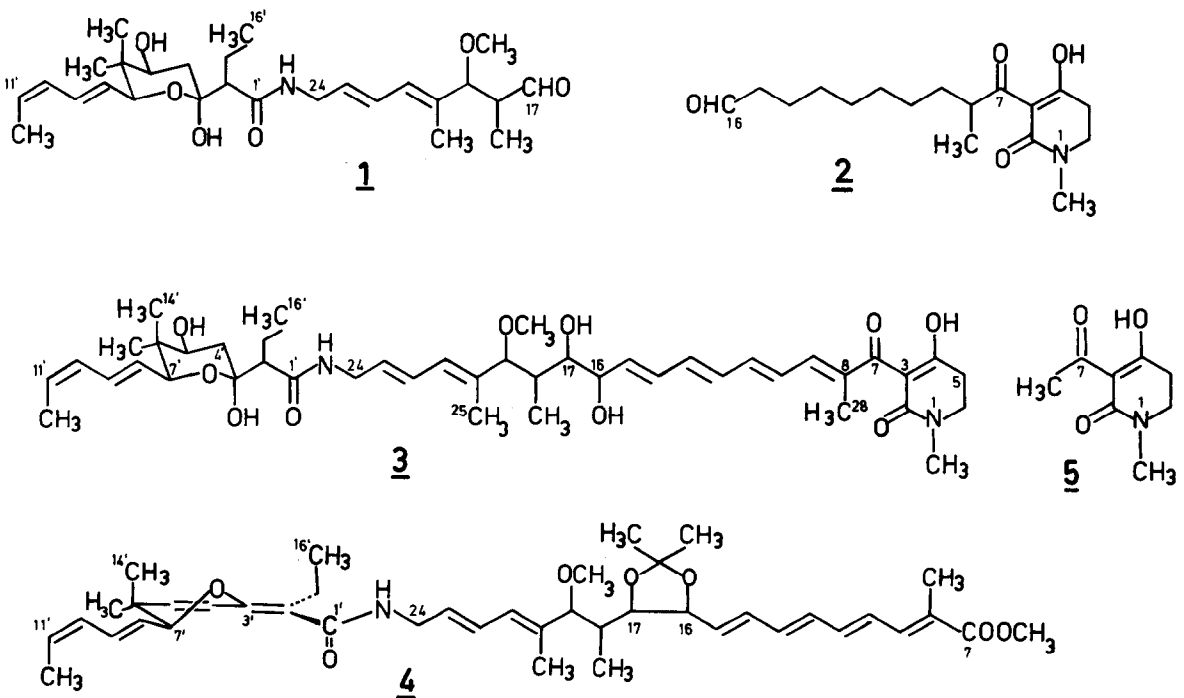
Für das gelbe Kirrothricin (3) ergibt sich aufgrund der Elementaranalyse in Verbindung mit Mol.-Masse-Bestimmungen die Summenformel C₄₄H₆₄N₂O₁₀ (781.0)[osmometrisch: 782 (Methanol), Titration mit 0.02 M NaOH: 771]. Das UV-Spektrum von 3 zeigt Banden [Methanol: λ_{max}(ε) = 333 (16900), 316 (sh), 282 (sh), 275 (17900), 240 (sh), 234 nm (48500)], die sich bei Zugabe von NaOH nur wenig, mit HCl im langwelligen Bereich deutlich ändern [Methanol/HCl: λ_{max}(ε) = 362 (11100), 324 (13700), 308 (14600), 291 (sh), 280 (17600), 273 (sh), 239 (sh), 234 nm (48100)]. Beim Dihydromocimycin⁶⁾ bewirkt der Übergang vom alkalischen ins saure Medium ebenfalls eine bathochrome Verschiebung des langwelligen Maximums, allerdings ist die UV-Absorption insgesamt ca. 25 nm kürzerwellig. Damit unterscheidet sich dieses deutlich von 3. Das bei der katalytischen Hydrierung (10 % Pd/A-Kohle, Methanol) gebildete Hexadecahydro-3 stimmt im UV-Spektrum [Methanol: λ_{max}(ε) = 277 (12400), 249 (sh), 240 nm (sh); Methanol/NaOH: λ_{max}(ε) = 285 (11500), 257 nm (12300)] mit der Modellsubstanz 5 überein und färbt sich wie diese mit Eisen(III)-chloridlösung rot. Bei der Ozonolyse von 3 mit nachfolgender Hydrolyse wird aus dem N-Heterocyclus N-Methyl-β-alanin freigesetzt.

Bei der Oxidation von 3 in t-Butanol/Wasser (1:1) mit 3 Moläquiv. Natriummetaperiodat (12 h, 25°C) läßt sich aus den chloroformlöslichen Reaktionsprodukten durch Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/10% Methanol) der farblose, amorphe C₂₇-Aldehyd 1 abtrennen [34 %, Schmp. 63-64°C, UV (Methanol): λ_{max}(ε) = 233 nm (47794); IR (KBr): 1720, 1658, 1629 cm⁻¹]. Die Summenformel

$C_{27}H_{43}NO_6$ sichern die Elementaranalyse, das Massenspektrum (M^+ : $m/e = 477$) und das ^{13}C -NMR-Spektrum (Tab. 1). Doppelresonanzexperimente im 1H -NMR-Spektrum (Tab. 2) bestätigen die Strukturelemente, lediglich die (20E)-Konfiguration wurde in Analogie zum Aurodox²⁾ angenommen. Hervorzuheben ist das ABX-System für 4'-H₂/5'-H, im Vergleich mit Kirromycin und Aurodox²⁾ fehlt 4'-OH, das dort die selektive Spaltung der 1'-Amidbindung ermöglicht.

Neben 1 entsteht beim Periodat-Abbau ein weiterer, labiler Aldehyd, der den fehlenden C₁₇-Teil des Antibiotikums enthält, sich aber nur in geringer Ausbeute fassen läßt. Vom Hexadecahydro-3 ausgehend erhält man den C₁₇-Aldehyd 2 [67 %, farbloses Öl, Rotfärbung mit FeCl₃, C₁₇H₂₇NO₄ (M^+ : $m/e = 309$, Hochauflösung); IR (KBr): 1720, 1650 cm⁻¹], der sich aus den chloroformlöslichen Reaktionsprodukten durch Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/10% Aceton) isolieren läßt. Die UV-Daten von 2 (Methanol/NaOH) entsprechen denen der Modellverbindung 5. Die 1H - und ^{13}C -NMR-Daten⁷⁾ stehen mit der Struktur 2 in Einklang. Die Stellung der C-Methylgruppe ergibt sich aus dem Schlüsselbruchstück des Massenspektrums bei $m/e = 183$ (54 %, M-126, McLafferty-Umlagerung).

Umsetzung von 3 mit Dimethoxypropan/Toluolsulfonsäure, anschließende Oxidation mit einem Überschuß Natriummetaperiodat in Wasser/t-Butanol (1:1) in Anwesenheit von Natriumhydrogencarbonat⁴⁾ und Methylierung der chloroformlöslichen Abbauprodukte mit Diazomethan (CHCl₃, 5 min, 20°C) führt nach Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/1% Methanol) zum (2Z)-Dianhydro-O-isopropylidenkirrothricinsäure-methylester (4) [farbloses Öl; IR (KBr): 1705, 1637 cm⁻¹; UV (Methanol): $\lambda_{max} = 345, 331, 233$ nm]. Aus dem Massenspektrum (M^+ : $m/e = 689$, Hochauflösung) folgt die Summenformel C₄₂H₅₉NO₇. Das 1H -NMR-Spektrum von 4 (Tab. 2) zeigt die 4'-Doppelbindung ($\delta = 5.96/6.36$,



Tab. 1. ^{13}C -NMR-Daten (25.2 MHz) in CDCl_3 [δ -Werte in ppm, Multiplizität durch off-resonance]

C-Atom	<u>1</u>	<u>4</u>
12'	10.8 (q)	10.7 (q)
14'	10.9 (q)	12.8 (q)
16'	12.0 (q)	12.9 (q)
25	12.2 (q)	13.5 (q)
27	13.5 (q)	15.3 (q)
13'	22.5 (q)	20.7 (q)
Olefine	125.5-130.1 [7C (d)]	118.3-142.1 [16 C (d)]
20	133.9 (s)	134.7 (s)
8	---	126.9 (s)
7'	88.2 (d)	90.3 (d)
6'	39.2 (s)	35.0 (s)
5'	71.8 (d)	Olefinbereich
4'	38.0 (t)	
3'	98.2 (s)	150.7 (s)
2'	57.3 (d)	114.8 (s)
15'	20.6 (t)	20.3 (t)
1'	175.0 (s)	166.7 (s)
24	41.3 (t)	41.5 (t)
19	76.3 (d)	74.9 (d)
26	56.1 (q)	51.7 (q)
18	48.5 (d)	35.6 (d)
17	204.0 (d)	84.6 (d)

Tab. 2. ^1H -NMR-Daten im CDCl_3 [δ -Werte in ppm, J (Hz)]

H-Atom	<u>1</u> a)	<u>4</u> b,d)
12'-H ₃	1.74 dd (7.5/2.0)	1.78 dd (7.0/2.0)
11'-H	5.48 dq (10.0/7.5)	6.75 - 5.52
10'-H	6.44 mc	
9'-H	6.00 m	
8'-H	5.58 dd (15.0/6.0)	
7'-H	4.20 d (6.0)	4.22 d (7.5)
6'-CH ₃	0.78 s / 0.94 s	1.00 s / 1.02 s
5'-H	3.87 m	5.96 d (10.0)
5'/3'-OH	um 3.9/2.1 c)	---
4'-H _e	2.00 dd (13.0/4.5)	6.36 d (10.0)
4'-H _a	1.37 dd (13.0/11.5)	---
2'-H	2.20 dd (11.0/4.0)	---
15'-H ₂	1.79 m (verdeckt)	2.42 q (7.5)
16'-H ₃	0.94 t (7.5)	1.09 t (7.5)
1'-NH	5.84 t (6.0) c)	7.94 t (breit)
24 -H ₂	4.00 m	4.02 dd (6.0/5.0)
23 -H	5.66 dt (15.0/6.5)	6.75 - 5.52
22 -H	6.44 mc	
21 -H	6.00 m	
20 -CH ₃	1.66 d (1.0)	1.52 d (1.0)
19 -H	3.61 d (10.0)	3.21 d (10.0)
19 -OCH ₃	3.17 s	3.10 s
18 -H	2.60 mc	1.83 m (verdeckt)
18 -CH ₃	0.86 d (7.0)	0.75 d (7.0)
17 -H	9.70 d (3.0)	4.37 dd (6.0/6.0)

a) 360 MHz, b) 270 MHz, c) austauschbar mit D_2O
d) fehlende Resonanzen im Text

J = 10 Hz), gegenüber 1 fehlt 2'-H, außerdem sind die Signale der 2'-Ethylgruppe zu tieferem Feld verschoben. Der Isopropylidenring [δ = 5.18 (16-H), 4.37 (17-H), 1.41/1.50 (2 CH₃)] hat 18-H (δ = 1.83) und 15-H (δ = 5.60) als Nachbarn. Das Integral im Bereich δ = 5.52-7.25 steht für insgesamt 16 Olefin-H, damit sind der Isopropylidenring und die Methoxycarbonylgruppe (δ = 3.78) über eine methylverzweigte (δ = 2.00, 8-CH₃) Tetraenkette verbunden. Die ^{13}C -NMR-Daten bestätigen im Vergleich zu 1 und 3 die Existenz von vier Olefin-C am Pyransystem, die Signale des O-Isopropylidenrings [δ = 25.1/25.4 (q, 2 CH₃), 79.1/84.6 (d, C-16/C-17), 107.1 (s)], der Methoxycarbonylgruppe [δ = 16&5 (s), 55.7 (q)] und der dazu α -ständigen Methylgruppe [δ = 27.4 (q)] ergänzen die Daten in Tabelle 1.

Das etwas schneller wandernde (*Z*E)-Isomere von **4** läßt sich ebenfalls isolieren. Seine spektralen Daten stimmen mit denen von **4** weitgehend überein. Auffällig diamagnetisch verschoben ist das $^1\text{H-NMR}$ -Signal des Amid-NH. Die zweimalige Dehydratisierung im Bereich des Tetrahydropyranringes von **3** erfolgt bereits unter dem Einfluß von *p*-Toluolsulfonsäure, wie Modellreaktionen an **1** zeigen.

Mit Selen(IV)-oxid in HMPTA ⁶⁾ (2 h, 90°C) entsteht 5,6-Dehydrokirrothricin [42%, $\text{C}_{44}\text{H}_{62}\text{N}_2\text{O}_{10}$; IR (KBr): 1709, 1637, 1539 cm^{-1}], in dessen $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum die Triplets für 5-H₂ und 6-H₂ (δ um 2.60/3.50) in **3** durch zwei Dubletts für 5-H/6-H [$\delta = 5.99/7.39$ (8 Hz)] ersetzt sind. Die langwellige UV-Bande in Methanol/HCl [$\lambda_{\text{max}} = 357$ ($\epsilon = 17000$)] und Methanol/NaOH [$\lambda_{\text{max}} = 345$ ($\epsilon = 23\,500$)] ist im Vergleich zu Kirromycin und Aurodox ²⁾ um 25 nm bathochrom verschoben, was mit dem um eine Doppelbindung verlängerten Chromophor in Einklang steht.

Für Kirrothricin (**3**) kann die Biosynthese in Übereinstimmung mit Aurodox ⁵⁾ formuliert werden. Die Dehydratisierung im Bereich von C-14 bis C-17 führt jedoch nicht zum Tetrahydrofuranring, sondern zum Tetraen. Die Glykol-OH-Gruppen (C-16/C-17) sind somit ein C-Atom weiter vom Stickstoffheterocyclus entfernt und konformativ anders angeordnet als bei den anderen Vertretern der Kirromycin-Gruppe ^{2,3)}. Formel **3** spiegelt nur eines der denkbaren Tautomeren wieder, es ist zu vermuten, daß die Stereochemie des Kirrothricins (**3**) der von Aurodox ²⁾ entspricht.

Wir danken Herrn Prof. Dr. H. Zähler (Tübingen) für die Überlassung von Kirrothricin-Rohprodukt, Herrn Dr. H.H. Földner (MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen) für die Aufnahme der 270 MHz- $^1\text{H-NMR}$ -Spektren und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Förderung.

Literatur

- 1) H. Zähler, I. Thein, A. Zeeck, I. Hummel, H.U. Hoppe, in Vorbereitung; I. Thein, Dissertation Univ. Tübingen 1977; I. Hummel, Diplomarbeit Univ. Göttingen 1977.
- 2) H. Maehr, M. Leach, T.H. Williams und J.F. Blount, *Can. J. Chem.* **58**, 501 (1980) und Zitate darin.
- 3) A. Parmeggiani und G. Sander in *Topics in Antibiotic Chemistry* (ed. by P.G. Sammes) Vol. 5, S. 157, Ellis Horwood Limited, Chichester 1980.
- 4) V.J. Lee und K.L. Rinehart jr., *J. Antibiotics* **33**, 408 (1980).
- 5) C.M. Liu, T.H. Williams und R.G. Pitcher, *J. Antibiotics* **32**, 414 (1979).
- 6) Gist-Brocades N.V. (H.M. Jongsma, H.J. Kooreman, J.L. van Os und C.P. Voss) D.O.S. 2621615 (1976).
- 7) $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 18.38$ ppm (s, 4-OH), 9.74 (t, $J = 1$ Hz, 16-H), 4.00 (mc, 8-H), 3.48 (t, $J = 7$ Hz, 6-H₂), 3.08 (s, N-CH₃), 2.64 (t, $J = 7$ Hz, 5-H₂), 2.42 (td, $J_t = 7$ Hz, $J_d = 1$ Hz, 15-H₂), 1.90-1.24 (m, 9-H₂-14-H₂), 1.14 (d, $J = 7$ Hz, 8-CH₃) [Tautomerengemisch, erkennbar an kleineren Nebensignalen der H-Atome in Chromophornähe]. $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 204.7$ (d, C-16), 199.2 (s, C-7), 190.5 (s, C-4), 172.4 (s, C-2), 101.2 (s, C-3), 45.1 (t, C-15), 43.8 (t, C-6), 38.0 (d, C-8), 34.6 (q, N-CH₃), 29.0 (t, C-5), 17.4 (q, 8-CH₃), ferner 37.9, 33.8, 29.4, 29.1, 27.2, 22.0 (alle t, C-9 bis C-14) [Kleinere Nebensignale zeigen das Tautomerengemisch an].

(Received in Germany 17 March 1981)