Liebigs Ann. Chem. **1980**, 622 – 628

Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, 189[1]

# Strukturaufklärung und Partialsynthese des Nucleosidantibiotikums Nikkomycin B

*Wilfried A. König**) und *Werner Hass*

Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität Hamburg, Martin-Luther-King-Platz 6, D-2000 Hamburg 13

*Wolfgang Dehler, Hans-Peter Fiedler* und *Hans Zähner*

Lehrstuhl Mikrobiologie I, Institut für Biologie II der Universität Tübingen, Auf der Morgenstelle 28, D-7400 Tübingen 1

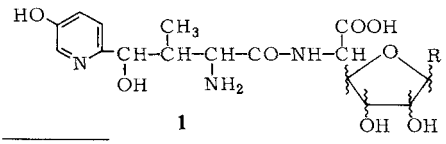
Eingegangen am 17. Juli 1979, in veränderter Form am 10. Oktober 1979

Das Kulturfiltrat von *Streptomyces tendae,* aus dem die Nucleosidantibiotika Nikkomycin Z[2] (**1a**) und Nikkomycin X[3] (**1b**) isoliert werden konnten, lieferte noch Nikkomycin B (**7**), das anstelle des 3-Hydroxypyridin-Systems von **1** einen *p*-Hydroxyphenyl-Rest im Aminosäurebaustein **6** enthält. Dieser ist peptidartig mit einer 5-Aminohexuronsäure verknüpft, an die 4-Formyl-4-imidazolin-2-on *N*-glykosidisch gebunden ist. Die Ableitung der Konstitution des neuen Aminosäurebausteins gelang durch Massenspektrometrie und Synthese eines Diastereomerengemisches der 2-Amino-4-hydroxy-4-(*p*-hydroxyphenyl)-3-methylbuttersäure (**6**). In der biologischen Aktivität ist Nikkomycin B von den genannten Vertretern dieser Gruppe nicht zu unterscheiden.

**Metabolites of Microorganisms, 189[1] – Structure Elucidation and Partial Synthesis of the Nucleoside Antibiotic Nikkomycin B**

In the culture filtrate of *Streptomyces tendae,* from which the nucleoside antibiotics nikkomycin Z[2] (**1a**) and nikkomycin X[3] (**1b**) were isolated, a third component, nikkomycin B (**7**), was found. This new antibiotic contains a *p*-hydroxyphenyl residue instead of a 3-hydroxypyridyl residue in the amino acid moiety (**6**). The amino acid is linked to a 5-amino hexuronic acid to which 4-formyl-4-imidazolin-2-one is bound as an *N*-glycoside. The structure of the new amino acid constituent could be derived by mass spectrometry and was confirmed by synthesis of a mixture of diastereomers of 2-amino-4-hydroxy-4-(*p*-hydroxyphenyl)-3-methylbutyric acid.

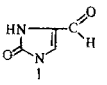
Die Nikkomycine sind Nucleosidantibiotika mit fungiziden Eigenschaften, die in ihrer Struktur an die Gruppe der Polyoxine erinnern[4]. Ihre biologische Wirkung beruht auf einer Hemmung der Chitinbiosynthese. Der Erzeugerstamm *Streptomyces tendae* produziert hauptsächlich die bereits beschriebenen Komponenten Nikkomycin Z[2] (**1a**) und Nikkomycin X[3] (**1b**).



**1**

**1a:** R =

**1b:** R =



*) Korrespondenz bitte an diesen Autor richten.

© Verlag Chemie, GmbH, D-6940 Weinheim, 1980

0170 – 2041/80/0404 – 0622 $ 02.50/0

Bei der chromatographischen Reinigung der Nikkomycin-Fraktion durch Gelfiltration an Biogel P2[5] fiel als Nebenkomponente *Nikkomycin B* an, das sich dünnschichtchromatographisch von **1a** und **b** unterscheidet.

**Chemische Spaltung von Nikkomycin B**

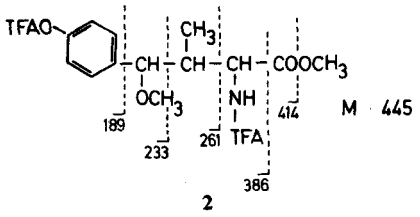
Die Nikkomycine lassen sich bereits mit 1 N Trifluoressigsäure an der Peptidbindung spalten[2,3], wobei ein Gemisch aus Nucleosid und Aminosäure erhalten wird. Die Spaltung wurde mit 5 mg Nikkomycin B durchgeführt und das Hydrolysat nach Veresterung mit methanolischer Salzsäure und Trifluoracetylierung mit Hexafluoracetanhydrid mittels kombinierter Gaschromatographie und Massenspektrometrie untersucht. Das Gaschromatogramm ergab dann eine Hauptkomponente und drei Nebenkomponenten. Die massenspektrometrischen Daten der vier Produkte, die unter Elektronenstoßbedingungen (EI) und mittels chemischer Ionisation (CI) mit Isobutan als Reaktionsgas untersucht wurden, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1. Massenspektrometrische Daten von **2**–**5**

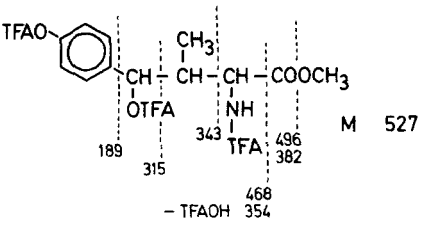
| Verb. | *m/e*-Werte (relative Intensitäten) |
|---|---|
| **2** | 414 (1%), 354 (1.3%), 301 (2.8%), 233 (100%), 185 (29%), 153 (20%), 91 (27%) |
| **3** | 414 (1.5%), 382 (2.5%), 354 (3.5%), 315 (28%), 287 (20%), 241 (23%), 185 (100%), 153 (76%), 69 (46%) |
| **4** | 413 (3.6%), 381 (17%), 354 (15%), 284 (13%), 241 (100%), 144 (12%), 115 (13%), 69 (26%) |
| **5** | 399 (1.6%), 355 (11%), 286 (33%), 242 (100%), 227 (43%), 152 (42%), 145 (32%), 138 (12%), 128 (61%), 115 (23%), 96 (11%), 91 (13%), 84 (36%), 77 (22%), 69 (82%) |

Während das EI-Spektrum von **2** keinen Molekülpeak aufweist, erhält man im CI-Spektrum ein intensives $[MH]^+$-Ion bei $m/e = 446$. Durch Vergleich dieses Massenspektrums mit dem des homologen Pentafluorpropionylderivates und durch Hochauflösungs-Massenspektrometrie der wichtigsten Fragmentionen wurde der Hauptkomponente die Struktur **2** zugeordnet.

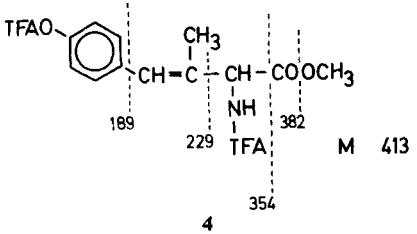
Das Basis-Ion $m/e = 233$ ergibt sich durch Benzylspaltung und beweist, daß die OH-Gruppe in Benzylstellung unter den Bedingungen, die üblicherweise zur säurekatalysierten Veresterung angewandt werden (1.5 N Lösung von HCl in wasserfreiem $CH_3OH$), verethert wird. Nach systematischen Untersuchungen von *Kruse*[6] tritt eine Methyletherbildung nur ein, wenn der Aromat in *p*-Stellung durch eine OH-Gruppe substituiert ist. Das Ion $m/e = 185$ ergibt sich durch Bindungsspaltung zwischen C-2 und C-3 unter H-Übertragung, möglicherweise nach einem McLafferty-Mechanismus. Durch Eliminierung von $CH_3OH$ aus $m/e = 185$ erhält man $m/e = 153$. Im oberen Massenbereich erkennt man $m/e = 414$ ($M - OCH_3$) und 354 ($M - CH_3OH - COOCH_3$). Das Ion $m/e = 301$ dürfte aus $m/e = 414$ durch Abspaltung von $CF_3CONH_2$ oder $CF_3COO$ entstehen.



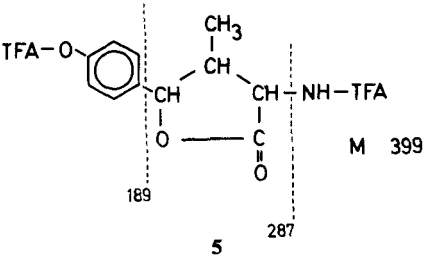

2




3




4




5

TFA = Trifluoracetyl; M = Molmasse

Die drei anderen Komponenten im Gaschromatogramm des substituierten Nikkomycin-B-Hydrolysats konnten aufgrund ihrer Massenspektren als das dreifach trifluoracetylierte Produkt **3** mit der Molekularmasse 527, als das Eliminierungsprodukt **4** und das Lacton **5** identifiziert werden.

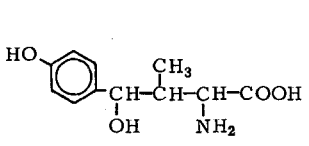
Im Massenspektrum von **3** ist das Molekülion nur mit weniger als 1% relativer Intensität zu erkennen. Die intensivsten Ionen sind *m/e* = 185, das die Estergruppe und das α-C-Atom mit der acylierten Aminogruppe enthält, und das daraus durch Methanol-Eliminierung resultierende Ion *m/e* = 153. Durch Abspaltung von $CF_3COO$ oder $CF_3CONH_2$ aus dem Molekülion ergibt sich *m/e* = 414. Dieses Ion zerfällt unter Methanol-Eliminierung weiter zu *m/e* = 382; durch CO-Abspaltung erhält man daraus *m/e* = 354. Das Ion *m/e* = 315 resultiert aus der Benzylspaltung und zerfällt weiter in *m/e* = 287, wobei unter Umlagerung einer Trifluoracetylgruppe CO eliminiert wird. Dieser Prozess wurde durch Hochauflösungsmessungen bestätigt. Das Ion der Masse 241 bildet sich durch Eliminierung von $CF_3CONH_2$ aus *m/e* = 354 und hat die Summenformel $C_{12}H_8O_2F_3$.

Die Struktur **4** ist ein weiteres Reaktionsprodukt der Hydrolyse von Nikkomycin B. Hier bildet das schon erwähnte Ion *m/e* = 241 den Basispeak. Das Molekülion *m/e* = 413 zerfällt unter Methanol-Eliminierung in *m/e* = 381 und unter Abspaltung des Esterrestes in *m/e* = 354. Das Ion mit der Massenzahl 284 (Summenformel: $C_{13}H_9F_3NO_3$) entsteht durch Verlust eines Trifluoracetylradikals aus *m/e* = 381.

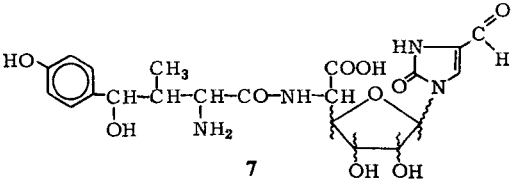
Das Molekülion von **5** *m/e* = 399 zerfällt in der für Lactone typischen Weise unter CO- und $CO_2$-Abspaltung (*m/e* = 371 bzw. 355). Die Eliminierung von $CF_3CONH_2$ führt zu *m/e* = 286, das unter $CO_2$-Eliminierung zum Basision 242 führt, woraus durch Abspaltung eines Methylradikals *m/e* = 227 entsteht.

Die Vielfalt der bei der Hydrolyse und Derivatbildung entstehenden Produkte zeigt, daß es sich bei der 2-Amino-4-hydroxy-4-(*p*-hydroxyphenyl)-3-methylbuttersäure (**6**), dem Aminosäurebaustein von Nikkomycin B, um eine sehr labile Verbindung handelt. Im Vergleich dazu ist die analoge, das Pyridinsystem enthaltene Aminosäure aus Nikkomycin Z und X wesentlich stabiler.

Als weitere Bausteine konnten im Hydrolysat die schon beschriebenen 5-Aminohexuronsäure[2] und 4-Formyl-4-imidazolin-2-on[3] als Trimethylsilylderivate durch GC/MS nachgewiesen werden.



**6**



**7**

Die Struktur von Nikkomycin B (**7**) hat somit große Ähnlichkeit mit der von Nikkomycin X (**1b**). Sie wird durch das $^1$H-NMR-Spektrum (Abbildung 1) bestätigt. Dieses weist bei $\delta = 0.8$ ein Dublett mit $J = 7.2$ Hz auf, das der Methylgruppe in β-Stellung der Aminosäure zuzuordnen ist. Das benachbarte Proton absorbiert bei $\delta = 2.48$ und koppelt mit dem α-Proton, dessen Resonanz bei $\delta = 4.34$ liegt und mit dem γ-Proton, das bei $\delta = 5.06$ absorbiert. Die Resonanzen des Zuckerbausteins liegen im Bereich $\delta = 4.3 - 4.6$ neben dem HDO-Signal. Lediglich das Proton am C-1 des Zuckers ($\delta = 5.61$) läßt sich eindeutig zuordnen. Bei $\delta = 6.86$ und 7.23 liegen die Signale von 4 Protonen (d; $J = 8.2$ Hz), die in ihrer Symmetrie typisch für das AA'BB'-System eines *para*-disubstituierten Aromaten sind. Schließlich erkennt man noch die Singuletts von H-5 bei $\delta = 7.75$ und das des Aldehydprotons der heterocyclischen Base bei $\delta = 9.25$.

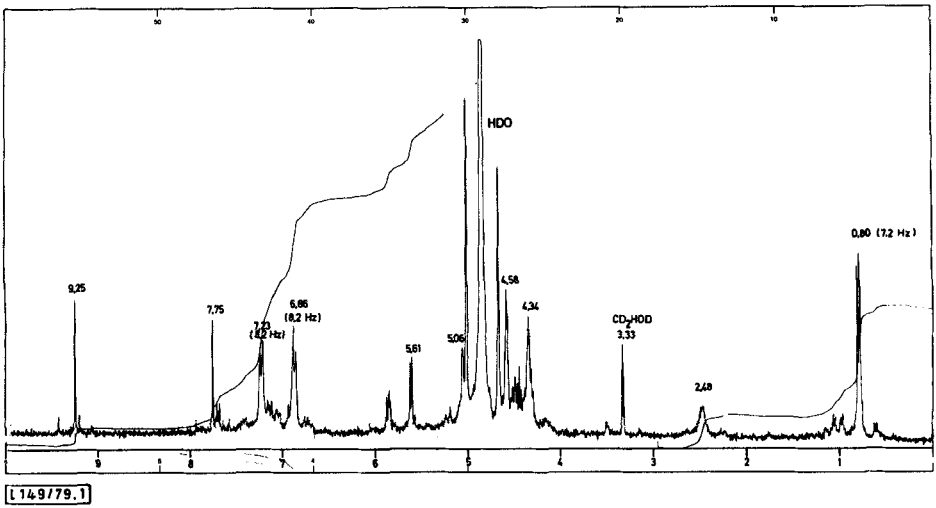
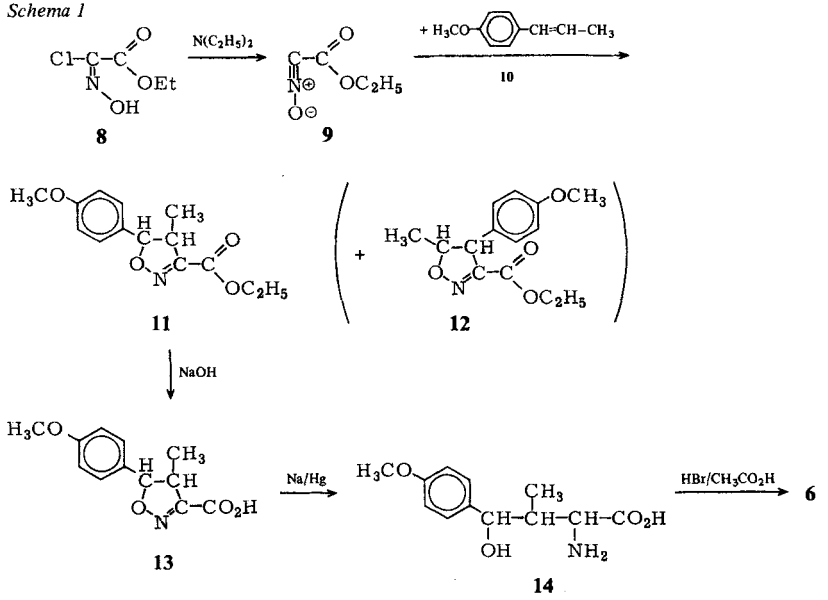



Abbildung 1. $^1$H-NMR-Spektrum (270 MHz) von Nikkomycin B (**7**) in $CD_3OD/D_2O$

**Synthese von 2-Amino-4-hydroxy-4-(*p*-hydroxyphenyl)-3-methylbuttersäure (6)**

In Schema 1 ist ein Syntheseweg beschrieben, wie er von *Drefahl* und *Hörhold*[7] für ähnliche Verbindungen vorgeschlagen wurde. Bei der Behandlung von Chlor(hydroxyimino)essigsäure-ethylester (**8**) mit Triethylamin erhält man Ethoxycarbonylmethannitriloxid (**9**). Verbindung **9** läßt sich an Anethol (**10**) in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition zu den Isoxazolinderivaten **11** und **12** addieren[8–11]. Das Produktgemisch besteht zu 93% aus **11** und zu 7% aus **12**. Alkalische Hydrolyse dieses Gemisches liefert nach dreimaligem Umkristallisieren reine 5-(*p*-Methoxyphenyl)-4-methyl-3-isoxazolincarbonsäure (**13**). Das Produkt **13** tritt als Enantiomerenpaar auf, das nach Veresterung mit (+)-3-Methyl-2-butanol[12] in Form der diastereomeren Ester gaschromatographisch getrennt werden kann. Im $^1$H-NMR-Spektrum von **13** ist keine Signalaufspaltung zu erkennen, womit das Vorliegen diastereomerer Verbindungen auszuschließen ist. Durch reduktive Ringspaltung mit Natriumamalgam und Essigsäure erhält man ein Gemisch von mindestens drei Diastereomeren der 2-Amino-4-(*p*-methoxyphenyl)-3-methylbuttersäure (**14**), wie man aus der dreifachen Signalaufspaltung im $^1$H-NMR-Spektrum leicht erkennen kann. Theoretisch sind bei nicht stereospezifischer Hydrierung an C-3 vier Stereoisomere möglich. Wie *Jäger* und Mitarbeiter[13] nachgewiesen haben, ist jedoch bei Gegenwart eines Asymmetriezentrums im Isoxazolin bei der Reduktion mit einer optischen Induktion zu rechnen. Die Abspaltung der Methyletherfunktion gelingt durch einstündiges Erhitzen von **14** in HBr/Eisessig (1 : 1). Man erhält ein Diastereomerengemisch von **6**, das nach Veresterung mit HCl/$CH_3OH$ und Trifluoracetylierung dieselben Produkte **2**–**5** liefert wie das Naturprodukt **7**. Die GC/MS-Analyse zeigt, daß das natürliche Diastereomere auch im synthetischen Gemisch als Hauptkomponente vorliegt.

*Schema 1*



Die Untersuchungen wurden im Rahmen des *Sonderforschungsbereichs 76* und durch eine Sachbeihilfe der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* in dankenswerter Weise gefördert.

## Experimenteller Teil

Die Massenspektren wurden mit einem Gerät Varian MAT 311 A mit Kapillar-GC-Kopplung unter EI-Bedingungen (70 eV)- oder CI-Bedingungen (Isobutan) aufgenommen. Die Hochauflösungsmessungen wurden bei Auflösung 10000 mit dem gleichen Gerät durchgeführt. Für die $^1$H-NMR-Messungen verwendete man ein Gerät Bruker WH 270 (270 MHz); als interner Standard diente Tetramethylsilan. – Die Gaschromatographie wurden mit 25-m-Glaskapillaren, belegt mit Silicongummi SE 30, durchgeführt.

*Isolierung von Nikkomycin B* (**7**): Das klare Kulturfiltrat (20 l) von *Streptomyces tendae* wurde auf eine mit Dowex 50 WX 4 (50 – 100 mesh, $Na^+$-Form) gefüllte Säule aufgetragen (Bettvolumen 3 l). Dann wurde solange mit $H_2O$ eluiert (Fließgeschwindigkeit 7 l/h), bis das Waschwasser farblos war. Das Nikkomycingemisch wurde danach mit 0.05 N $NH_3$-Lösung eluiert. Aus dem biologisch aktiven Eluat entfernte man das $NH_3$ i. Vak. und stellte mit konz. Ameisensäure pH 5.5 ein. Das so behandelte Eluat wurde auf eine mit Amberlite IRC-84 ($Na^+$-Form) gefüllte Säule (Bettvolumen 2 l) aufgetragen. Die Säule wurde mit der 3fachen Menge des Auftragvolumens Wasser gewaschen (Fließgeschwindigkeit 5 l/h). Die Nikkomycine X und Z blieben am IRC-84 gebunden, während Nikkomycin B und niedermolekulare Verunreinigungen ausgewaschen wurden. Das Waschwasser wurde auf eine mit Dowex 50 WX 4 ($Na^+$-Form, 50 – 100 mesh) gefüllte Säule aufgetragen (Bettvolumen 700 ml). Nikkomycin B wurde zusammen mit einem Nucleosidgemisch aus Nikkomycin X und Z mit 0.03 N $NH_3$-Lösung eluiert (Fließgeschwindigkeit 3 l/h). Nach Entfernen des $NH_3$ i. Vak. und Einengen des Eluats wurde dieses über eine Biogel-P2-Säule (50 – 100 mesh, Bettvolumen 1 l) chromatographiert (Fließgeschwindigkeit 150 ml/h). Nikkomycin B (**7**) wurde nach 6 h eluiert und fiel nach dem Lyophilisieren als annähernd farblose Produkt an; Ausb. 120 mg.

*Hydrolyse von Nikkomycin B und Bildung von Derivaten der Hydrolyseprodukte:* 5 mg Nikkomycin B (**7**) wurden in 0.5 ml 1 N Trifluoressigsäure 1 h bei 100 °C im Trockenschrank erhitzt. Danach wurde die Probe i. Vak. eingedampft (Rotationsverdampfer). Das Hydrolysat von 1 mg Nikkomycin B oder 1 mg **7** wurde im Schraubdeckelgläschen 1 h mit 1.5 N HCl in $CH_3OH$ bei 20 °C stehengelassen. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom nahm man die Probe in 0.2 ml $CH_2Cl_2$ und 0.05 ml Hexafluoracetanhydrid auf und ließ 1 h bei 20 °C stehen. Nach Entfernung der restlichen Reagenzlösung im Stickstoffstrom wurde in 0.05 ml $CH_2Cl_2$ aufgenommen. Mit dieser Lösung nahm man die GC/MS-Untersuchungen vor.

*Synthese von 2-Amino-4-hydroxy-4-(p-hydroxyphenyl)-3-methylbuttersäure* (**6**)

1) *5-(p-Methoxyphenyl)-4-methyl-3-isoxazolincarbonsäure-ethylester* (**11**) *und Isomeres* **12**: Zu einer Lösung von 2.96 g (0.02 mol) Anethol und 3.03 g (0.02 mol) Chlor(hydroxyimino)essigsäure-ethylester[8] in 100 ml wasserfreiem Ether wurden unter Eiskühlung und Rühren innerhalb von 4 h 10 ml wasserfreies Triethylamin, gelöst in 50 ml Ether, getropft. Nach 18stdg. Rühren bei Raumtemp. wurde vom Triethylammoniumchlorid abfiltriert, das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert und der Rückstand i. Vak. destilliert. Hierbei gingen zuerst Anethol, dann ein Gemisch aus Anethol, **11** und **12** sowie schließlich bei 150 °C/0.8 Torr **11** und **12** über. Man erhielt 2.64 g (49%) hellgelbes Öl, das nach der gaschromatographischen Analyse zu 93% aus **11** und zu 7% aus **12** bestand. – MS (70 eV): *m/e* = 263 (26%, $M^+$), 148 (100%, $C_{10}H_{12}O$). – $^1$H-NMR ($CDCl_3$): $\delta$ = 1.41 (m; 6H, $CH_3$), 3.48 (m; 1H, $CH_3CH$), 3.82 (s; 3H, $OCH_3$), 4.37 (q; 2H, $OCH_2$), 5.2 (d; 1H, CH – O), 6.9 (d; 2 Aromaten-H), 7.24 (d; 2 Aromaten-H).

$C_{14}H_{17}NO_4$ (263.2) Ber. C 63.87 H 6.51 N 5.32 Gef. C 63.47 H 6.35 N 5.39

2) *5-(p-Methoxyphenyl)-4-methyl-3-isoxazolincarbonsäure* (**13**): Zu einer Lösung von 500 mg (1.9 mmol) **11**/**12** (voranstehend) in 10 ml Methanol wurde bei 0 °C etwas mehr als die äquivalente Menge 0.1 N NaOH gegeben und anschließend 2 h bei 0 °C gerührt. Nach Ansäuern mit 2 N HCl wurde mit Ether ausgeschüttelt, die Etherphase 2mal mit $H_2O$ gewaschen, über $MgSO_4$, getrocknet und der Abdampfungsrückstand 3mal aus Ether/Petrolether (60 – 70 °C) umkristallisiert. Ausb. 390 mg (87%); Schmp. 117 – 118 °C. – MS (70 eV): *m/e* = 235 (4%, $M^+$), 148 (14%, $C_{10}H_{12}O$), 137 (100%, $C_8H_9O_2$), 135 (81%, $C_8H_7O_2$). – $^1$H-NMR ($CDCl_3$): δ = 1.29 (d; 3H, $CH_3$), 3.39 (m; 1H, $CHCH_3$), 3.78 (s; 3H, $OCH_3$), 5.24 (d; 1H, CH), 7.01 (d; 2 Aromaten-H), 7.35 (d; 2 Aromaten-H).

$C_{12}H_{13}NO_4$ (235.2) Ber. C 61.41 H 5.56 N 4.83 Gef. C 61.43 H 5.55 N 4.69

3) *2-Amino-4-hydroxy-4-(p-methoxyphenyl)-3-methylbuttersäure* (**14**): Zu einer Lösung von 235 mg (1 mmol) **13** in 10 ml Ethanol und 3 ml 20proz. Essigsäure wurden innerhalb von 2 h 10 g 3proz. Natriumamalgam in kleinen Portionen gegeben, wobei man mehrmals umschüttelte. Bereits während der Reaktion begann sich **14** abzuscheiden. Nach Beendigung der Reaktion wurde vom Quecksilber abgegossen und dieses mehrmals mit heißem Wasser gespült. Das Lösungsmittel wurde i. Vak. abdestilliert und der Rückstand aus $H_2O$ umkristallisiert. Man erhielt 122 mg (51%) farblose Kristalle (Diastereomerengemisch ohne definierten Schmp.).

4) **6**: Für die GC/MS-Analyse wurden 5 mg **14** in 1 ml mit HBr gesättigtem Eisessig 1 h unter Rückfluß gekocht. Nach Abdestillieren des Reagenzes i. Vak. wurde das Produkt wie oben beschrieben substituiert und untersucht.

---

[1] 188. Mitteilung: *H. Achenbach, W. Kohl, B. Weber* und *G. Brillinger*, Chem. Ber., im Druck.
[2] *U. Dähn, H. Hagenmaier, H. Höhne, W. A. König, G. Wolf* und *H. Zähner*, Arch. Microbiol. **107**, 143 (1976).
[3] *H. Hagenmaier, A. Keckeisen, H. Zähner* und *W. A. König*, Liebigs Ann. Chem. **1979**, 1494
[4] *K. Isono, K. Asahi* und *S. Suzuki*, J. Am. Chem. Soc. **91**, 7410 (1969).
[5] *W. Dehler*, Dissertation Univ. Tübingen 1979.
[6] *K. Kruse*, Diplomarbeit Univ. Hamburg 1976.
[7] *G. Drefahl* und *H. H. Hörhold*, Chem. Ber. **97**, 159 (1964).
[8] *G. S. Skinner*, J. Am. Chem. Soc. **46**, 731 (1924).
[9] *A. Quilico, G. Stagno D'Alcontres* und *P. Grünanger*, Nature, **166**, 266 (1950).
[10] *R. Huisgen*, Angew. Chem. **75**, 604 (1963); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **2**, 565 (1963).
[11] *R. Huisgen*, J. Org. Chem. **41**, 403 (1976).
[12] *I. Benecke*, Diplomarbeit Univ. Hamburg 1980.
[13] *V. Jäger, V. Buß* und *W. Schwab*, Tetrahedron Lett. **1978**, 3133.

[149/79]