

## 242. Über die Biogenese des Rifamycins S<sup>1)</sup>

von Mario Brufani\*\*), Dieter Kluepfel\*), Gian Carlo Lancini\*),  
Johannes Leitich\*\*), Albert Sergeevitch Mesentsev\*\*), Vladimir Prelog\*\*),  
Fritz Peter Schmook\*\*) und Piero Sensi\*)

Forschungslaboratorium der *Lepetit SpA*, Milano\*), und  
Laboratorium für Organische Chemie der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich\*\*)

(7. VIII. 73)

**Summary.** Propionic acids labelled either with <sup>14</sup>C in positions 1, 2, or 3, or with <sup>14</sup>C in position 1 and <sup>3</sup>H in position 3 have been used as precursors in biosynthesis of rifamycins by *Streptomyces mediterranei*. The resulting distribution of radioactivity in rifamycins S – as determined by systematic degradation – shows that 23 of the 37 carbon atoms in rifamycin S originate from propionic acid. This result and the distribution pattern of radioactivity are in agreement with those obtained recently by <sup>13</sup>C-NMR. spectroscopy [7].

The S-methyl groups of methionin, labelled with <sup>14</sup>C, are incorporated in rifamycins by *Streptomyces mediterranei* only in the methoxy group.

The consequences of these findings for the biogenesis of other ansamycins, e.g. streptovaricins, are discussed. The similarities in the constitution and configuration of ansamycins and macrolides (cf. [9]) indicate that all these microbial metabolites are formed according to the same biogenetic pattern.

Als die Konstitution der Rifamycine B, O, S und SV sowie der Rifamycine L, Y, YO und YSV aufgeklärt worden war, fiel es auf, dass das Kohlenstoffgerüst der aliphatischen Brücken in diesen Verbindungen strukturell sehr ähnlich ist dem Gerüst der Makrolide vom Erythromycin-Typus; dazu gehören neben dem Erythromycin das Oleandomycin, das Pikromycin, das Narbomycin u.a.m. (vgl. [2]).

Von Woodward [3] wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Makrolide auf analoge Art aus Essigsäure und Propionsäure bzw. ihren biogenetischen Äquivalenten aufgebaut werden wie die Fettsäuren aus Essigsäure. Als Alternative wurde von Birch [4] in Betracht gezogen, dass die aus Essigsäure als Zwischenprodukte auftretenden Polyketide analog zu dem für andere aus Polyketiden entstehenden Naturstoffe nachgewiesenen Wege C-methyliert werden, wobei die Methyl-Gruppen vom Methionin übertragen werden.

Die Ergebnisse unserer Versuche sprechen eindeutig dafür, dass bei Rifamycinen dieser zweite biogenetische Weg nicht eingeschlagen wird. Rifamycin B wurde mikrobiologisch unter Zugabe von Methionin, das in der S-Methyl-Gruppe mit <sup>14</sup>C markiert war (Einbau-Rate vgl. Tab. 1), hergestellt. Durch den Abbau nach Zeisel konnte gezeigt werden, dass sich der ganze eingebaute radioaktive Kohlenstoff in der Methoxy-Gruppe des Rifamycins befindet. Dieses Resultat spricht dagegen, dass die C-Methyl-Gruppen aus Methionin stammen, was besonders für das am aromatischen Kern am C-(7) sitzende Methyl bemerkenswert ist.

Die Versuche, bei welchen 3-<sup>14</sup>C markiertes Propionat dem Nährmedium zugefügt wurde (Einbau-Raten s. Tab. 1), zeigten dagegen, dass alle C-Methyl-Gruppen des so

<sup>1)</sup> 6. Mitt. über Rifamycine, 5. Mitt.: [1].

markierten Rifamycins O mit Ausnahme des C-Methyls des Acetoxy-Restes von Propionsäure stammen.

Tabelle 1. Markierte Rifamycine, Versuche mit markiertem Propionat bzw. Methionin

| Nr. | Vorläufer                                        | $\mu\text{Ci}$ | Rifamycin: mg | $\mu\text{Ci} \times \text{mmol}^{-1}$ |
|-----|--------------------------------------------------|----------------|---------------|----------------------------------------|
| 1   | 3- $^{14}\text{C}$ -Propionat                    | 108            | B: 395        | 5,8                                    |
| 2   | 2- $^{14}\text{C}$ -Propionat                    | 200            | O: 300        | 11,8                                   |
| 3–4 | 1- $^{14}\text{C}$ -Propionat                    | 200            | O: 520        | 1,1                                    |
| 5   | 1- $^{14}\text{C}$ -Propionat                    | 500            | O: 207        | 4,2                                    |
| 6   | 1- $^{14}\text{C}$ ; C $^3\text{H}_3$ -Propionat | 1000; 1250     | O: 380        | 1,4 ( $^{14}\text{C}$ )                |
| 7   | 1- $^{14}\text{C}$ ; C $^3\text{H}_3$ -Propionat | 1000; 1050     | O: 185        | 4,1 ( $^{14}\text{C}$ )                |
| 8   | $^{14}\text{CH}_3$ -Methionin                    | 100            | B: 130        | 3,4                                    |

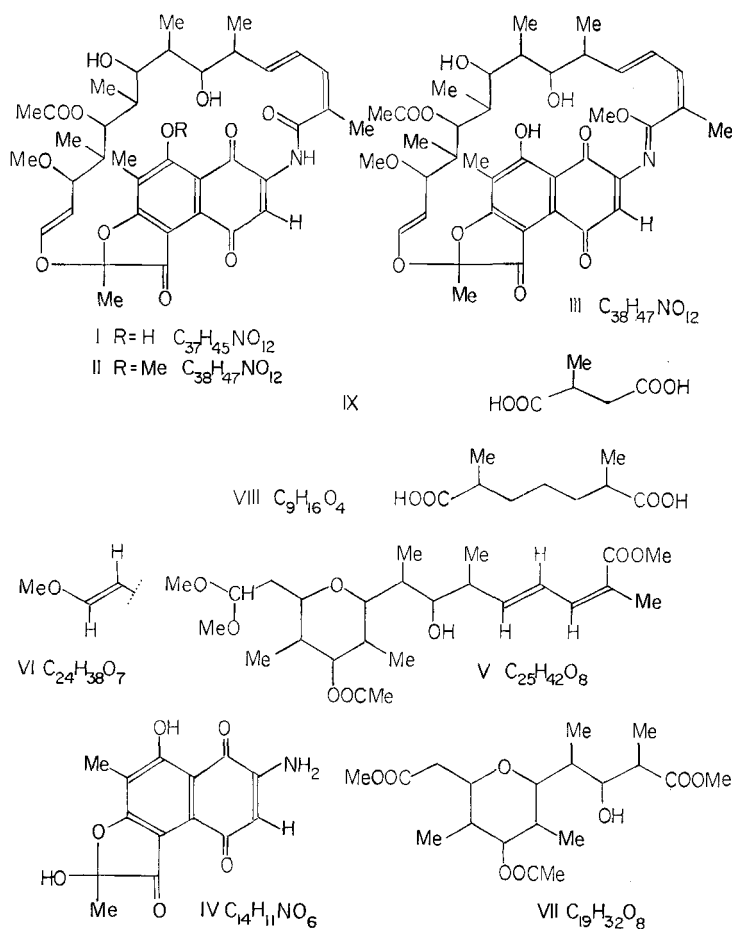
Dies konnte zuerst durch Abbau nach *Kuhn-Roth* wahrscheinlich gemacht werden. Aus einem Muster von markiertem Rifamycin O wurden 7,3 mol-Äqu. flüchtige Säuren erhalten. Wenn man annimmt, dass die nichtmarkierte Acetoxy-Gruppe beim *Kuhn-Roth*-Abbau praktisch quantitativ 1 mol-Äqu. nichtradioaktive Essigsäure liefert, so ergibt sich daraus, dass die gemessene Radioaktivität, die 85,5% derjenigen des Rifamycins betrug, 6,3 (7,3 – 1) mol-Äqu. der flüchtigen markierten Säuren entspricht. Umgerechnet auf 7 mol-Äqu., die bei quantitativem Abbau von 7 C-Methyl-Gruppen entstehen sollten, handelt es sich um 95% der Radioaktivität des Rifamycins, was darauf hinweist, dass die sieben C-Methyl-Gruppen des Rifamycins O von der Methyl-Gruppe der Propionsäure stammen.

Das Ergebnis des Abbaus nach *Kuhn-Roth* konnte durch einen eingehenderen systematischen Abbau des Rifamycins S bestätigt werden.

Für den Abbau der markierten Rifamycine wurden die in der vorhergehenden 5. Mitt. (vgl. auch [5]) beschriebenen Reaktionen (s. Schema) verwendet. Das Rifamycin S (I) wurde mit Silberoxid und Methyljodid in ein Gemisch von 8-O-Methylrifamycin S (II) und Imino-methyläther III übergeführt. Der letztere lieferte durch Behandlung mit methanolischer Salzsäure einerseits die aromatische Verbindung C $_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_6$  (IV), andererseits die stereoisomeren Dimethylacetal-methylester C $_{25}\text{H}_{42}\text{O}_8$  (V) sowie den Enoläther-methylester C $_{24}\text{H}_{38}\text{O}_7$  (VI). Aus dem in grösseren Mengen entstehenden Dimethylacetal-methylester V erhielt man durch Ozonisierung, Nachoxydation des Ozonids mit Perameisensäure und Veresterung mit Diazomethan den Hydroxy-acetoxy-dimethylester C $_{19}\text{H}_{32}\text{O}_8$  (VII).

8-O-Methylrifamycin S (II) wurde zuerst katalytisch hydriert und das Hydrierungsprodukt mit Salpetersäure oxydiert. Aus dem dabei entstandenen Säuregemisch wurden die stereoisomeren  $\alpha,\alpha'$ -Dimethylpimelinsäuren C $_9\text{H}_{16}\text{O}_4$  (VIII) und die stark racemisierte Methylbernsteinsäure C $_5\text{H}_8\text{O}_4$  (IX) abgetrennt und auf ihre Radioaktivität untersucht.

Die Ergebnisse dieses Abbaus von Rifamycin S, das mit 3- $^{14}\text{C}$ -Propionat als Vorläufer bereitet worden war (Tab. 2), stehen im Einklang mit denjenigen des Abbaus nach *Kuhn-Roth*. Sie zeigen, dass von den insgesamt sieben C-Methyl-Gruppen in der aliphatischen Brücke fünf und im aromatischen Teil zwei von den markierten Methyl-Gruppen der Propionsäure stammen.

Tabelle 2. Rifamycin S und Abbauprodukte, Versuche mit 3- $^{14}C$ -Propionat

| Nr.   | Formel                | $\sigma$ | $\sigma \times n_c$ | $^{14}C_7^*$ | C-Atome Nr.                |
|-------|-----------------------|----------|---------------------|--------------|----------------------------|
| III   | $C_{38}H_{47}NO_{12}$ | 398; 393 | 150,3               | 7,00         | 13, 14, 30, 31, 32, 33, 34 |
| IV    | $C_{14}H_{11}NO_6$    | 313; 302 | 43,1                | 2,0          | 13, 14                     |
| iso-V | $C_{25}H_{42}O_8$     | 446; 450 | 112,0               | 5,2          | 30, 31, 32, 33, 34         |
| VI    | $C_{24}H_{38}O_7$     | 439; 435 | 104,9               | 4,9          | 30, 31, 32, 33, 34         |
| VII   | $C_{19}H_{32}O_8$     | 455; 460 | 86,9                | 4,0          | 31, 32, 33, 34             |
| VIII  | $C_9H_{16}O_4$        | 502; 499 | 45,0                | 2,1          | 30, 31                     |
| IX    | $C_5H_8O_4$           | 399; 397 | 19,9                | 0,92         | 30 (oder 31)               |

$$\sigma = 10^{-2} \text{ i} \times \text{s}^{-1} \times (\text{mmol CO}_2)^{-1} \quad \sigma \times n_c = 10^{-4} \text{ i} \times \text{s}^{-1} \times (\text{mmol Substanz})^{-1}$$

Die naheliegende Schlussfolgerung, die man daraus ziehen könnte – nämlich, dass in der aliphatischen Brücke fünf Molekeln Propionsäure und im aromatischen Teil zwei Molekeln Propionsäure eingebaut werden – wird jedoch durch die Ergebnisse des Abbaus von Rifamycin S, das mit 1- $^{14}C$ -Propionat als Vorläufer hergestellt wurde,

widerlegt. Diese Ergebnisse, die in Tabelle 3 wiedergegeben sind, zeigen, dass das Verhältnis der in der aliphatischen Brücke eingebauten Carboxyl-Kohlenstoffatome zu denjenigen im aromatischen Teil 7:1 beträgt. Diesen überraschenden Befund

Tabelle 3. *Rifamycin S und Abbauprodukte, Versuche mit 1-<sup>14</sup>C-Propionat*

| Nr.     | Formel                                           | $\sigma$   | $\sigma \times n_C$ | <sup>14</sup> C <sub>8</sub> | C-Atome Nr.                   |
|---------|--------------------------------------------------|------------|---------------------|------------------------------|-------------------------------|
| III     | C <sub>38</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>12</sub> | 163 ; 164  | 62,1                | 8,00                         | 6, 15, 19, 21, 23, 25, 27, 29 |
| IV      | C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>6</sub>  | 56,1; 56,2 | 7,86                | 1,00                         | 6                             |
| VIII a) | C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>   | 203 ; 205  | 22,5                | 2,8                          | 15, 19, 21                    |

a) Als Dimethylester analysiert.

konnten wir durch Versuche mit doppelt markiertem 3-<sup>3</sup>H<sub>3</sub>; 1-<sup>14</sup>C-Propionat als Vorläufer (Tab. 4, A und B) bestätigen. Die Radioaktivitäten der Methyl-Gruppen der aliphatischen Brücke stehen zu denjenigen des aromatischen Teiles im Verhältnis 5:2, diejenigen der Kohlenstoffatome, die von der Carboxyl-Gruppe der Propionsäure stammen, dagegen in dem früher festgestellten Verhältnis 7:1.

Tabelle 4. *Rifamycin S und Abbauprodukte, Versuche mit 1-<sup>14</sup>C-(C<sup>3</sup>H<sub>3</sub>)-Propionat*

| Nr.   | Mol.-Gew. | $\tau^{14}C$ | $10^{-3} \times \tau \times \text{Mol.-Gew.}$ | <sup>14</sup> C <sub>8</sub> | C-Atome Nr.                   |
|-------|-----------|--------------|-----------------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| III   | 709,8     | 275; 276     | 195,5                                         | 8,00                         | 6, 15, 19, 21, 23, 25, 27, 29 |
| IV    | 289,2     | 84,4; 82,8   | 24,1                                          | 1,00                         | 6                             |
| iso-V | 470,6     | 347; 361     | 166,6                                         | 6,8                          | 15, 19, 21, 23, 25, 27, 29    |
| III   | 709,8     | 728          | 517                                           | 8,00                         | 6, 15, 19, 21, 23, 25, 27, 29 |
| IV    | 289,2     | 206          | 59,6                                          | 0,9                          | 6                             |
| iso-V | 470,6     | 992          | 467                                           | 7,2                          | 15, 19, 21, 23, 25, 27, 29    |

| Nr.   | Mol.-Gew. | $\tau^3H$  | $10^{-3} \times \tau \times \text{Mol.-Gew.}$ | (C <sup>3</sup> H <sub>3</sub> ) <sub>7</sub> | (C <sup>3</sup> H <sub>3</sub> ) Nr. |
|-------|-----------|------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------|
| III   | 709,8     | 88,1; 86,2 | 61,9                                          | 7,00                                          | 13, 14, 30, 31, 32, 33, 34           |
| IV    | 289,2     | 58,4; 57,4 | 16,7                                          | 1,9                                           | 13, 14                               |
| iso-V | 470,6     | 92,2; 98,3 | 44,8                                          | 5,1                                           | 30, 31, 32, 33, 34                   |
| III   | 709,8     | 315        | 224                                           | 7,00                                          | 13, 14, 30, 31, 32, 33, 34           |
| IV    | 289,2     | 195        | 56,4                                          | 1,8                                           | 13, 14                               |
| iso-V | 470,6     | 316        | 149                                           | 4,7                                           | 30, 31, 32, 33, 34                   |

$\tau = i \times s^{-1} \times (\text{mg Substanz})^{-1}$      $\tau \times \text{Mol.-Gew.} = i \times s^{-1} \times (\text{mmol Substanz})^{-1}$

Tabelle 5. *Versuche mit 2-<sup>14</sup>C-Propionat*

| Nr.   | Formel                                           | $\sigma$      | $\sigma \times n_C$ | <sup>14</sup> C <sub>8</sub> * | C-Atome Nr.                   |
|-------|--------------------------------------------------|---------------|---------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| III   | C <sub>38</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>12</sub> | 610; 607      | 231                 | 8,00                           | 7, 12, 16, 20, 22, 24, 26, 28 |
| IV    | C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>6</sub>  | 405; 407; 403 | 56,7                | 2,0                            | 7, 12                         |
| iso-V | C <sub>25</sub> H <sub>42</sub> O <sub>8</sub>   | 667           | 166,8               | 5,8                            | 16, 20, 22, 24, 26, 28        |
| VI    | C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>   | 691; 694      | 166,2               | 5,8                            | 16, 20, 22, 24, 26, 28        |
| VII   | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>   | 756; 760; 755 | 143,8               | 5,0                            | 20, 22, 24, 26, 28            |
| VIII  | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>    | 733; 729      | 65,8                | 2,3                            | 16, 20                        |
| IX    | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>     | 522; 554      | 26,9                | 0,93                           | 16 (oder 20)                  |

Aus der Versuchsreihe mit 1-<sup>14</sup>C-Propionat als Vorläufer folgt weiter, dass in demjenigen Teil der Brücke, der die Kohlenstoffatome 15 bis 21 sowie 30 und 31 umfasst, 3 Carboxyl-Kohlenstoffatome vorliegen, woraus man schliessen kann, dass das Carboxyl der aliphatischen Brücke von der Propionsäure-Molekel stammt, die zuletzt eingebaut wurde, wie dies beim Carboxyl der Makrolide der Fall ist. Schliesslich wurde noch ein Rifamycin S mit 2-<sup>14</sup>C-Propionat als Vorläufer bereitet und abgebaut. Die in Tabelle 5 wiedergegebenen Ergebnisse führen für die von der Methylen-Gruppe der Propionsäure stammenden Kohlenstoffatome in der aliphatischen Brücke bzw. im aromatischen Teil zu einem Verhältnis von 6 zu 2.

Aufgrund aller dieser Abbauversuche und plausibler Annahmen lässt sich mit einiger Zuversicht schliessen, dass die Kohlenstoffatome 13, 14, 30, 31, 32, 33 und 34 des Rifamycins von der Methyl-Gruppe der Propionsäure stammen. Die Kohlenstoffatome 7, 12, 26, 24, 22, 20 und 15 kommen sehr wahrscheinlich von der Methylen-Gruppe und die Kohlenstoffatome 25, 23, 21, 19 und 15 von der Carboxyl-Gruppe der Propionsäure her. Die Lage eines Methylen-Kohlenstoffatoms und von drei eingebauten Carboxyl-Kohlenstoffatomen liess sich dagegen nicht festlegen. Um diese Kohlenstoffatome in der Rifamycin-Molekel eindeutig zu lokalisieren, müsste man den Abbau viel weiter als bisher treiben, was mit einem grossen experimentellen Aufwand verbunden wäre.

Glücklicherweise wurde inzwischen die <sup>13</sup>C-NMR.-Spektroskopie so weit entwickelt, dass dieser Aufwand vermieden werden konnte. Aufgrund der Zuordnung der <sup>13</sup>C-Signale [6] gelang es *White et al.* [7] durch Untersuchung von Spektren der Rifamycine S, welche auf einem mit <sup>13</sup>C angereicherten Propionat und Acetat den biogenetischen Ursprung von 30 der insgesamt 37 Kohlenstoffatome im Antibioticum festzustellen. Die von früheren Ergebnissen unabhängige, in Fig. 1 wiedergegebene Zuordnung steht mit den Abbauergebnissen in vollem Einklang und erlaubt darüber hinaus die noch ausstehende Lokalisierung der drei Carboxyl- und eines Methylen-Kohlenstoffs der eingebauten Propionsäuren, was eine schöne Illustration der Überlegenheit des spektroskopischen Verfahrens darstellt. Die Versuche von *White et al.* [7] zeigen weiter, dass das sieben Kohlenstoffatome umfassende Fragment des aromatischen Teiles nicht von Essigsäure stammt. Weitere Untersuchungen mit dem plausiblen Vorläufer für diesen Teil der Molekel, der Shikimisäure, waren ebenfalls negativ; die Biogenese dieses Teiles der Rifamycine konnte demnach noch nicht aufgeklärt werden.

Aus der Fig. 1 folgt, dass ein wesentlicher Teil der Rifamycin S-Molekel aus Propionsäure und Essigsäure aufgebaut ist, nach einem Schema, das demjenigen der Fettsäure-Synthese verwandt ist. Der Aufbau der Polyketid-Kette beginnt mit den Kohlenstoffatomen 14, 7 und 6 des aromatischen Teiles und endet mit den Kohlenstoffatomen 30, 16 und 15 der aliphatischen Brücke. Darüber hinaus finden zwei weitere Vorgänge statt: a) zwischen die Kohlenstoffatome 12 und 29 wird offenbar durch einen oxydativen Vorgang ein Sauerstoffatom eingeschoben und b) eine aus Propionsäure stammende Methyl-Gruppe (34a) geht verloren.

Eine weitere Stütze für die Annahme, dass ein solches Zwischenprodukt bei der Biogenese eine Rolle spielt, findet man in der neuerdings aufgeklärten Struktur der Streptovaricine [8]. In der 4. Mitt. dieser Reihe [9] wurde auf die Ähnlichkeit der Struktur von Ansamycinen hingewiesen. Obwohl keine Versuche zur Aufklärung der Biogenese des Tolypomycins, der Streptovaricine und des Geldanamycins veröffent-

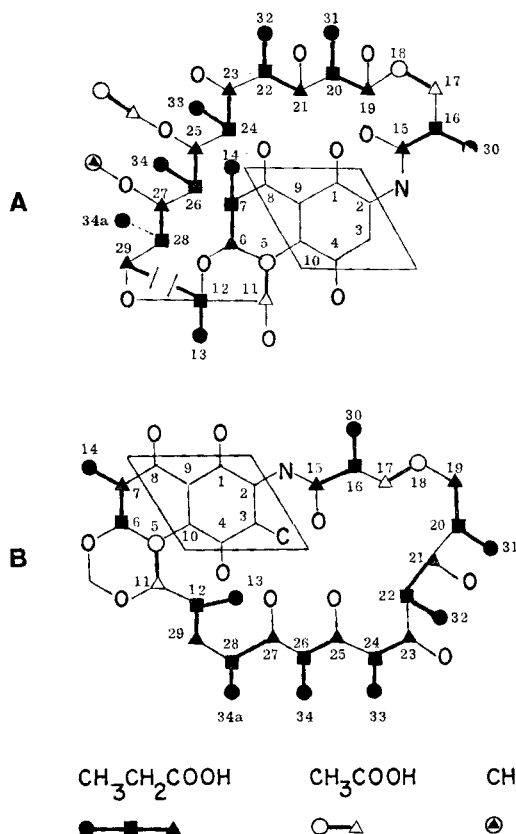


Fig. 1. A. Biogenese des Rifamycin-Gerüsts aus Propionsäure, Essigsäure und Methionin nach [7];  
 B. Hypothetische Biogenese des Streptovaricin-Gerüsts aus Propionsäure und Essigsäure

licht worden sind, kann man aufgrund der gemeinsamen Strukturmerkmale auf eine analoge Biogenese schliessen<sup>2)</sup>. Der Hauptunterschied zwischen den Ansamycinen vom Rifamycin-Tolypomycin-Typus einerseits und Streptovaricin-Typus andererseits liegt darin, dass die aus sechs Molekeln Propionsäure und zwei Molekeln Essigsäure gebildete Kohlenstoffkette bei Streptovaricinen weder durch Sauerstoffatome unterbrochen ist noch das Kohlenstoffatom 34a verloren hat. Sie besitzen also das Kohlenstoffgerüst des Zwischenproduktes, das bei der Biogenese der Rifamycine postuliert wird.

Auf die mit dem biogenetischen Schema augenfällig übereinstimmende Verteilung der sauerstoffhaltigen Funktionen und Doppelbindungen sei nur hingewiesen. Für die zusätzlichen bei gewissen Ansamycinen vorliegenden sauerstoffhaltigen Funktio-

<sup>2)</sup> Anmerkung bei der Korrektur: B. Milavetz, K. Kakinuma, K. L. Rinehart Jr., J. P. Rollis & W. J. Haak haben im Heft 17 vom 22. 8. 1973 des J. Amer. chem. Soc. 95, 5793 (1973) die Ergebnisse ihrer Untersuchungen über die Biogenese des Streptovaricins D veröffentlicht, die mit einem solchen Verlauf in bestem Einklang stehen.

nen, die nicht dem primären biosynthetischen Schritt entsprechen, gibt es in der Chemie der mikrobiellen Metabolite genügend Analogien.

Es soll noch die auffallende konfigurationelle Ähnlichkeit der aus Propionsäure und Essigsäure gebildeten Teile der Ansamycine mit den Makroliden vom Erythromycin-Typus hervorgehoben werden. *Celmer* hat in zwei ausführlichen Arbeiten [10], [11] die konfigurativen Zusammenhänge bei Makroliden behandelt. Für die Konfiguration des Kohlenstoffgerüsts hat er ein Schema abgeleitet, das in Fig. 2 wiedergegeben ist. Wenn man daneben das analoge Schema für die Rifamycine, Tolypomycine und Streptovaricine aufzeichnet, dann sieht man, dass ein wesentlicher mittlerer Teil des Ansamycin-Gerüsts die gleiche Konfiguration besitzt, wie sie von *Celmer* für Makrolide abgeleitet wurde, was kaum ein Zufall sein dürfte.

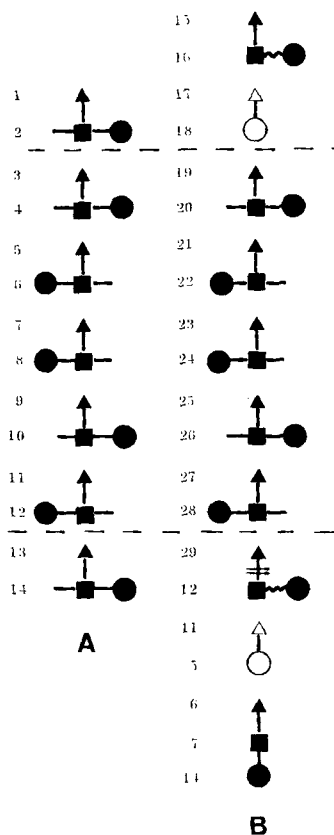


Fig. 2. Schematische Darstellung der Konfiguration der C-Methyl-Gruppen

A. Nach dem Schema von *Celmer* [11] in Makroliden.  
B. Bei Rifamycinen, Tolypomycin und Streptovaricinen.

Wenn man das Kohlenstoff-Gerüst der aliphatischen Brücke im Geldanamycin [8] mit denjenigen der anderen Ansamycine vergleicht, so kann man vermuten, dass es biogenetisch aus vier bzw. fünf Molekeln Propionsäure und drei bzw. zwei Molekeln Essigsäure aufgebaut ist. Die Kohlenstoffatome am Anfang der Kette scheinen eher denjenigen des Ringes B als denjenigen am Anfang der aliphatischen Brücke bei anderen Ansamycinen zu entsprechen.

Die Radioaktivitäten der durch den oxydativen Abbau der Rifamycine S erhaltenen Produkte wurden im Isotopenlaboratorium des Laboratoriums für Organische Chemie, ETH Zürich, unter der Leitung von PD Dr. P. Jordan bestimmt.

### Experimenteller Teil

*Herstellung der markierten Rifamycin-Präparate.* Zur Impfung wurde ein eingefrorenes vegetatives Mycel von *Streptomyces mediterranei* verwendet, das auf Nährmedium V6 (g l<sup>-1</sup> Fleischextrakt 5; Pepton 5; Hefeextrakt 5; enzymatisch hydrolysiertes Kasein 3; D-Glukose 20; Kochsalz 1,5) bereitet wurde. Zur Fermentation diente das folgende Nährmedium: g l<sup>-1</sup> Erdnussmehl 25; Sojabohnenmehl 10; D-Glukose 115; Veronal 2; Ammoniumsulfat 9,6; Calciumcarbonat 9,5; Spuren von Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub><sup>6-</sup>. Die Fermentation wurde in 500-ml-Erlenmeyer-Kolben ausgeführt, die 75 ml Nährmedium enthielten und auf einer Rotationsschüttelmaschine (300 Umdrehungen/Min.) geschüttelt wurden. Die Vorläufer wurden 48 Std. nach Impfung in steriler wässriger Lösung zugegeben, die gesamte Fermentationszeit betrug 120 Std. Die Kultur wurde nach der Fermentation bei pH 7 filtriert, der Filterkuchen gewaschen; Filtrat und Waschwasser wurden angesäuert (pH 2) und 3mal mit Äthylacetat ausgeschüttelt. Die eingeeengten Auszüge extrahierte man mit Phosphat-Puffer (pH 7,38). Die wässrigen Auszüge wurden nach dem Ansäuern wieder mit Äthylacetat extrahiert, aus dem nach Einengen auf ein kleines Volumen das Rifamycin B kristallisierte. Die Rifamycine O und S wurden aus dem letzteren nach früher angegebenen Vorschriften (vgl. [5]) gewonnen.

Über die Einbau-Raten gibt die Tab. 1 Auskunft.

*Abbau des markierten Rifamycins B nach Zeisel.* Aus 24,77 mg des in Gegenwart von <sup>14</sup>CH<sub>3</sub>-Methionin hergestellten Rifamycins B (vgl. Tab. 1) entsprechend 3723 i × s<sup>-1</sup> (spektroskopisch bestimmter Titer 97,5%) hat man nach Zeisel Methyljodid erhalten, das in Pyridin aufgefangen wurde. Nach dem Verdampfen des überschüssigen Pyridins im Vakuum blieb das kristalline Methyl-pyridinium-jodid zurück mit einer Radioaktivität von 3776 i × s<sup>-1</sup> entsprechend 101% der gemessenen Radioaktivität des eingesetzten Rifamycins B.

*Abbau des markierten Rifamycins O nach Kuhn-Roth.* 55,48 mg Rifamycin O, das mit 3-<sup>14</sup>C-Propionat als Vorläufer bereitet wurde (vgl. Tab. 1), entsprechend 1962 i × s<sup>-1</sup> (spektroskopischer Titer 97%), wurden nach Kuhn-Roth abgebaut. Nach jodometrischer Titration entstehen dabei 32 mg Essigsäure, was 7,3 Methyl-Gruppen entspricht. Die Radioaktivität dieser Essigsäure war 1670 i × s<sup>-1</sup>. Da 1 mol-Äqu. davon von der Acetyl-Gruppe stammt, die kaum markiert sein kann, entspricht die gemessene Radioaktivität 7,3 – 1 = 6,3 Methyl-Gruppen<sup>3)</sup>. Für sieben Methyl-Gruppen, die beim quantitativen Verlauf des Abbaus entstehen sollten, errechnet sich daraus 1856 i × s<sup>-1</sup> oder 95% der Radioaktivität des eingesetzten Rifamycins O.

*Oxydativer Abbau der markierten Rifamycine S.* Der in der Formelübersicht dargestellte Abbau wurde nach den im experimentellen Teil der 5. Mitt. dieser Reihe [1] angegebenen Vorschriften ausgeführt.

Die typischen Ausbeuten eines solchen Abbaus waren: 4,41 g I lieferten 2,79 g II und 0,70 g III. Aus dem letzteren wurden 114 mg IV, 84,3 mg V, 23,5 mg iso-V und 34,6 mg VI erhalten. 84,3 mg V gaben 41 mg VII. Aus 2,79 g II wurden 300 mg eines Gemisches von stereoisomeren VIII und 47 mg IX bereitet.

Die erhaltenen reinen Produkte wurden nach Kalberer & Rutschmann [13] verbrannt, und die Radioaktivität von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O wurde mit einem Tricarb Scintillation Counter bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 bis 5 zusammengestellt.

### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] W. Oppolzer & V. Prelog, *Helv.* 56, 2287 (1973).
- [2] J. W. Corcoran & M. Chick in «Biosynthesis of Antibiotics», J. F. Snell, Ed., Vol. I, Academic Press, New York, N.Y. 1966, S. 159.
- [3] R. B. Woodward, *Angew. Chem.* 68, 19 (1956); 69, 50 (1957).
- [4] A. J. Birch, *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* 14, 186, 202 (1957).

<sup>3)</sup> Über die quantitative Erfassung der O-Acetyl-Gruppen beim Kuhn-Roth-Abbau vgl. [12].

- [5] W. Oppolzer, V. Prelog & P. Sensi, *Experientia* 29, 336 (1964).
- [6] E. Martinelli, R. J. White, G. G. Gallo & P. J. Beynon, *Tetrahedron* (im Druck).
- [7] R. J. White, E. Martinelli, G. G. Gallo, G. Lancini & P. J. Beynon, *Nature* 243, 273 (1973).
- [8] K. L. Rinehart, Jr., *Accounts Chem. Res.* 5, 57 (1972).
- [9] V. Prelog & W. Oppolzer, *Helv.* 56, 2279 (1973).
- [10] W. D. Celmer in «Biogenesis of Antibiotic Substances», Z. Vaněk & Z. Hošťálek, Ed., Czechoslovak Acad. Sciences, Prag 1965, S. 99.
- [11] W. D. Celmer, *Pure Appl. Chemistry* 28, 413 (1971).
- [12] R. Kuhn & H. Roth, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 66, 1274 (1933).
- [13] F. Kalberer & J. Rutschmann, *Helv.* 44, 1956 (1961).

## 243. Zur Kenntnis von Rifamycin-S.-Reaktionen des Ansaringes

Modifikationen von Antibiotica, 8. Mitteilung [1]

von Wilhelm Kump und Hans Bickel

Departement Forschung, Division Pharma, Ciba-Geigy AG, Basel

(6. VIII. 73)

*Summary.* The reactivity of rifamycin-S with respect to acids, bases, and oxydizing or reducing agents has been studied. A number of compounds resulting from these experiments as well as derivatives of rifamycin-S resulting from acylation and ketalisation reactions are described.

Das von *Streptomyces mediterranei* produzierte Ansamycin Rifamycin-B [2] ist ein geeignetes Ausgangsmaterial für die Darstellung antibakterieller Substanzen [3] mit neuartigem Wirkungstyp [4]. Chemische Modifikationen von Rifamycin-B führten zu den Rifamycinen O [5], S [6] und SV [6] sowie zu dem klinisch bedeutenden Rifampicin [7], das wegen seiner Wirkung gegen Bakterien, Mycobakterien und Viren [8] zunehmende Beachtung findet.

Seit dem Bekanntwerden der chemischen Struktur der Rifamycine B, O, S und SV [9] beteiligten wir uns an den Arbeiten zur chemischen Modifikation von Rifamycin-S. Ziel dieser Arbeiten war die Verbesserung von Rifamycin-SV durch Darstellung von Verbindungen mit breiterem antibakteriellem Spektrum und Wirksamkeit bei oraler Applikation. Bei Derivaten mit interessanten biologischen Eigenschaften wurden zahlreiche analoge Verbindungen für eine breite biologische Prüfung dargestellt, über deren Ergebnisse teilweise berichtet worden ist [10]. In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir Versuche, die vor allem der Abklärung des allgemeinen chemischen Verhaltens von Rifamycin-S dienten. Neben Produkten der Einwirkung von Säure, Lauge, Oxydations- und Reduktionsmitteln wurden einfache funktionelle Derivate untersucht. Die antibakteriell z.T. hoch wirksamen Verbindungen, die aus Rifamycin-S mit nucleophilen Reagenzien in Additions- und Kondensationsreaktionen erhalten werden sowie photochemische Transformationsprodukte von Rifamycinderivaten sind Gegenstand der nachfolgenden Abhandlung [11].

Die Strukturen der neuen Rifamycinderivate konnten in den meisten Fällen aus spektroskopischen Befunden abgeleitet werden. Eine sehr wertvolle Hilfe boten dabei die NMR.-Spektren, in denen sich ein grosser Teil der Rifamycin-Struktur in charakteristischer Weise ausdrückt. Viele Rifamycinderivate bildeten stabile Solvate, deren elementare Zusammensetzung mikro-