

Henning Klostermeyer

## Synthese von Gramicidin S mit Hilfe der Merrifield-Methode\*)

Aus dem Deutschen Wollforschungsinstitut an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen

(Eingegangen am 8. März 1968)

■

Val-Orn(Tos)-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn(Tos)-Leu-D-Phe-Pro\*\*) wurde auf zwei verschiedenen Wegen mit der Merrifield-Technik aufgebaut. Die Ankondensation der einzelnen Aminosäurereste erfolgte bei der einen Synthese mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid, beim Parallelversuch über die *N*-Hydroxy-succinimidester der tert.-Butyloxycarbonyl-aminosäuren. Nur die erste Synthese führte zu einem genügend reinen Material, aus dem nach Cyclisierung und Schutzgruppenabspaltung reines Gramicidin S-dihydrochlorid-trihydrat isoliert werden konnte.

■

Bei der Synthese von Peptiden sind pro Amidbindung mindestens drei Reaktionsschritte erforderlich: selektive Maskierung der an der zu knüpfenden Peptidbindung unbeteiligten Funktionen, Kondensation und Freisetzung von Gruppen, die in die nächste Peptidbindung eingehen. Der Aufbau eines großen Peptides oder Proteins erfordert dementsprechend viele Reaktionsfolgen und führt zwangsläufig zu geringer Ausbeute an Endprodukt. Zudem unterscheiden sich Reaktionspartner und Reaktionsprodukt mit wachsender Kettenlänge immer weniger, die Isolierung und Charakterisierung des gewünschten Stoffes wird mit zunehmender Molekülgröße immer schwieriger. So ist es nicht verwunderlich, daß das längste bisher synthetisierte einheitliche Polypeptid, das ACTH<sup>1)</sup>, nur aus 39 Aminosäureresten, das einzige bisher synthetisierte Protein, das Insulin<sup>2)</sup>, gar nur aus zwei Polypeptidketten mit 21 und 30 Aminosäureresten besteht. Die synthetische Erschließung des Proteingebietes erfordert eine wesentliche Verbesserung der rezenten Methoden oder die Neuentwicklung leistungsfähigerer Verfahren.

\*) 67. Mittell. über Peptide; 66. Mittell.: s. H. Zahn und E. Th. J. Fölsche, „Synthese von Cystinpeptiden mit Sequenzen aus dem C-terminalen Bereich der Humaninsulin-A-Kette“, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

\*\*) Abkürzungen nach den Regeln der IUPAC-IUB-Commission on Biochem. Nomenclature, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 256 (1967).

1) R. Schwyzer und P. Sieber, Nature [London] 199, 172 (1963).

2) Übersicht bei H. Klostermeyer und R. E. Humbel, Angew. Chem. 78, 871 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 807 (1966).

Einen originellen Beitrag dazu lieferte *Merrifield*<sup>3)</sup> 1962 mit der Idee, höhermolekulare Substanzen schrittweise an polymeren Trägern aufzubauen und sie nach beendeter Synthese davon abzulösen. Wichtig ist dafür natürlich eine vollständige Umsetzung auf jeder Reaktionsstufe. Diese soll durch Anwendung großer Reagenzüberschüsse erzwungen werden. Da das Reaktionsprodukt unlöslich ist, können alle niedermolekularen Reaktionspartner durch einfaches Auswaschen ohne Verlust an Syntheseprodukt entfernt werden. Nach diesem eleganten Prinzip wurden bisher sowohl Polypeptide als auch Polynucleotide synthetisiert<sup>4)</sup>, doch gibt es auch eine ganze Reihe unveröffentlichter negativer Ergebnisse<sup>5)</sup>.

Insbesondere wurden bisher fast nur Peptide synthetisiert, deren Reinheit durch die hier recht unempfindliche Aminosäure- und Elementaranalyse sowie durch die mit relativ großen Fehlern belasteten biologischen Tests belegt wurde. Es schien sinnvoll, die neue Methode kritisch bei der Synthese eines Peptids zu erproben, das sich auch mit physikalischen Methoden sicher charakterisieren läßt. Dafür bot sich das Antibioticum Gramicidin S, ein Decapeptid der Struktur *cyclo*-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn-Leu-D-Phe-Pro.<sup>6)</sup> an. Seit der ersten, beispielhaften Synthese durch *Schwyzler* und *Sieber*<sup>7)</sup> gehören dieses Cyclopeptid und einige seiner Derivate zu den am besten charakterisierten Substanzen der Peptidchemie. Es lag also nahe, einen Vergleich zwischen dem konventionell und dem am Festkörper synthetisierten Material zu ziehen.

Als Träger diente ein Copolymerisat aus Styrol/Divinylbenzol (98/2), Korngröße 40–80  $\mu$ , das durch Behandlung mit Zinn(IV)-chlorid in Methoxychloromethan chloromethyliert wurde<sup>8)</sup>. Der Substitutionsgrad betrug 1.10 mMol Cl/g Harz. Bei dreitägiger Reaktion mit äquivalenten Mengen tert.-Butyloxycarbonyl-prolin und Triäthylamin reagierten in siedendem absolutem Äthanol 69% des Chlors (in Tetrahydrofuran nur 15 bzw. 16%). Weitere 29% des harzgebundenen Chlors reagierten bei fünftägigem Sieden in wasserfreiem Äthanol mit überschüssigem Triäthylammoniumacetat<sup>9)</sup>.

Das Harz sollte danach also neben sehr geringen Mengen Polybenzylchlorid je Gramm Startmaterial 0.76 mMol tert.-Butyloxycarbonyl-prolin und 0.32 mMol Essigsäure in Form eines Polybenzylesters enthalten. Nach Abspaltung der Aminoschutzgruppe mit Chlorwasserstoff in Eisessig<sup>9)</sup> ließen sich durch Triäthylamin aber nur 0.52 mMol/g Chlorid-Ionen eluieren; folglich hatten bei der Veresterung mit tert.-Butyloxycarbonyl-prolin mindestens 0.24 mMol/g oder 22% des vorhandenen Chlors in unerwünschter Weise reagiert.

Für den Aufbau des linearen Peptides Boc-Val-Orn(Tos)-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn(Tos)-Leu-D-Phe-Pro am Träger wurden die kristallinen Aminosäurederivate

3) *R. B. Merrifield*, *Federat. Proc.* **21**, 412 (1962).

4) Übersicht bei *T. Okuda*, *Naturwissenschaften*, im Druck.

5) Diskussionen beim 8. und 9. Europ. Peptidsymposium, 1966 (Noordwijk) und 1968 (Orsay).

6) *R. Conden*, *A. H. Gordon*, *A. J. P. Martin* und *R. L. M. Synge*, *Biochem. J.* **40**, XLIII (1946); **41**, 596 (1947).

7) *R. Schwyzler* und *P. Sieber*, *Helv. chim. Acta* **40**, 624 (1957).

8) *R. B. Merrifield*, *Biochemistry* **3**, 1385 (1964).

9) *R. B. Merrifield*, *J. Amer. chem. Soc.* **85**, 2149 (1963).

Boc-Val<sup>10</sup>), Boc-Orn(Tos)<sup>11</sup>), Boc-Leu·H<sub>2</sub>O<sup>10</sup>), Boc-D-Phe<sup>11</sup>) und Boc-Pro<sup>10</sup>) eingesetzt. Alle Verbindungen erschienen dünn-schichtchromatographisch in mehreren Systemen einheitlich, Schmelzpunkte und optische Aktivitäten entsprachen mindestens den Literaturwerten.

Zur Abspaltung der  $\alpha$ -Aminoschutzgruppe diente Chlorwasserstoff in Dioxan<sup>12</sup>). Während der ganzen Synthese blieb die Menge der freigesetzten Aminogruppen, bestimmt durch Chloridtitration nach *Volhard*, konstant  $5.15 \pm 0.15$  mMol/g eingesetzten Harzes.

Die Ankondensation der tert.-Butyloxycarbonyl-aminosäuren erfolgte mittels Dicyclohexylcarbodiimid, Reaktionsmedium war stets Methylenchlorid<sup>13</sup>). Dabei wurde die Carboxylkomponente im Überschuß eingesetzt, beim Leucin- und Valin-Derivat siebeneinhalb, bei den anderen Acylaminosäuren sechs Äquivalente; das tert.-Butyloxycarbonyl-leucin-hydrat wurde vorher entwässert. Die Reaktionszeit für die Kondensationen betrug jeweils 3 Stdn.

Es wurde mit 10.0 g des Boc-Pro-Polymeren begonnen; bei einem Titer von 0.50 mMol/g sollte das Gewicht beim Aufbau des Decapeptides auf 16.8 g steigen. Tatsächlich wurde eine Gewichtszunahme von nur 3.3 g registriert. Durch Bromwasserstoff in Trifluoressigsäure wurden dann aber 5.6 g Decapeptid-hydrobromid vom Harz abgespalten, was einer Ausbeute von 72% entspricht. Bei Behandlung mit 4*n* HBr in Eisessig ließ sich nach 1½stdg. Einwirkung bei Raumtemperatur nur noch eine geringe Menge eines braunen Öles vom Harz abziehen, der strohgelbe Rückstand wog 7.4g (alle Auswaagen nach Trocknung unter gleichen Bedingungen). Demnach ist etwa ein Fünftel des polymeren Trägers im Laufe der Synthese in Lösung gegangen oder aber das Harz ändert seine Affinität zu Lösungsmitteln sehr drastisch (das Quellungsvermögen nimmt mit wachsender Peptidbelastung stark ab).

Das Ditosyl-decapeptid-hydrobromid war dünn-schichtchromatographisch in drei Laufmitteln (Butanol-(2)/Ameisensäure/Wasser (75:13.5:11.5), Chloroform/Methanol/Essigsäure (190:10:6) und Pyridin/*n*-Heptan/tert.-Butylalkohol (3:15:3, alle v/v) einheitlich, ließ sich jedoch mit dem System Butanol-(2)/10proz. Ammoniak-Lösung (17:3, v/v) in eine Hauptkomponente und vier geringfügige Nebenprodukte auftrennen. Eine Probe des Materials wurde mit 0.2*n* Citratpuffer (pH 2.2) verrieben und der Überstand der automatischen Aminosäureanalyse<sup>14</sup>) unterworfen; an ninhydrin-positiven Substanzen wurden nur Spuren Prolin nachgewiesen (Tab. 1). Das Totalhydrolysat des Decapeptid-Derivates zeigte einen überhöhten Wert für Phenylalanin und kleine Verunreinigungen.

Zur weiteren Charakterisierung wurden 100 mg des Ditosyl-peptid-hydrobromides analog zu *Schwyzer* und *Sieber*<sup>7</sup>) durch Ionenaustauschchromatographie in das freie Ditosyl-decapeptid übergeführt. Es resultierten 80mg (entspr. 85% Ausb.) Substanz vom Schmp. 172–175° (Methanol/Wasser); für das konventionell synthetisierte Material wurde Schmp. 184–185°<sup>7</sup>) angegeben.

<sup>10</sup>) G. W. Anderson und A. C. McGregor, J. Amer. chem. Soc. **79**, 6180 (1957).

<sup>11</sup>) J. Halström und H. Klostermeyer, Liebigs Ann. Chem., im Druck.

<sup>12</sup>) J. M. Stewart und D. W. Woolley, Nature [London] **206**, 619 (1965).

<sup>13</sup>) G. R. Marshall und R. B. Merrifield, Biochemistry **4**, 2394 (1965).

<sup>14</sup>) D. H. Spackman, W. H. Stein und S. Moore, Analytic. Chem. **30**, 1190 (1958).

Tab. 1. Gramicidin S-Synthese unter Verwendung von Carbodiimid als Kondensationsmittel, Aminosäureanalysen. Alle Hydrolysate in 6*n* HCl, 24 Stdn. bei 105°. 1a = lineares Syntheserohprodukt, unhydrolysiert; 1b = dasselbe hydrolysiert; 2 = tosylierte Cyclopeptide aus der Gegenstromverteilung, Fraktionen I–IV; 3 = Endprodukte nach Abspaltung der Tosylgruppen und Gegenstromverteilung; D ist Gramicidin S; – bedeutet nicht nachweisbar, \* < 0.01; die kursiv gedruckten Werte wurden für ninhydrin-positive Substanzen in den Positionen der entsprechenden Aminosäure errechnet, sie wurden nicht als solche isoliert und identifiziert

	Asp	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Phe	$\delta$ -A-Val	Orn(Tos)	Orn	$\Sigma$
Theorie	—	—	—	1.00	—	—	1.00	—	1.00	1.00	—	1.00	—	5.00
1a	—	—	—	*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1b	—	*	*	0.96	*	*	0.96	—	1.00	1.16	—	0.98	0.09	5.15
2 I	—	—	—	0.89	—	—	0.94	—	1.00	1.03	—	0.84	0.13	4.92
2 II	—	—	—	0.98	—	—	0.90	*	1.00	1.03	—	0.89	0.11	4.91
2 III	*	—	*	0.76	*	—	0.93	*	1.00	1.05	—	0.93	0.10	4.77
2 IV	*	*	0.31	0.63	0.17	*	1.33	0.09	1.00	0.64	—	1.24	0.13	5.54
3 A	0.02	0.02	0.12	0.82	0.02	—	0.97	*	1.00	1.00	0.04	—	0.97	4.96
3 D	—	—	—	0.87	—	—	1.02	—	1.00	1.04	—	—	0.99	4.92

Die Hauptmenge des linearen Peptidmaterials wurde unter Verdünnungsbedingungen in Pyridin mit Dicyclohexylcarbodiimid/*p*-Nitro-phenol cyclisiert und nach beendeter Reaktion von nichtcyclischen Verbindungen durch Ionenaustauschchromatographie befreit<sup>7)</sup>. Diese Substanzen wurden nicht isoliert und charakterisiert.

Das Ditosyl-*cyclo*-decapeptid fiel zwar mit 62% Ausbeute in kristalliner Form an, doch schmolzen die Kristalle unterschiedlich zwischen 221 und 308° (Lit.<sup>7)</sup>: 319°) und waren auch chromatographisch uneinheitlich. Das Cyclisierungsprodukt wurde daher gegenstromverteilt, wobei sich neben einer Hauptfraktion (II) drei kleinere Nebenfractionen (I, III, IV) entwickelten. I und II unterschieden sich in der Aminosäureanalyse nicht deutlich, III und IV lieferten wesentlich schlechtere Werte und zeigten vor allen Dingen ninhydrin-positive Substanzen in Positionen von Aminosäuren, die nicht zu erwarten waren (Tab. 1). Nur Fraktion II ließ sich kristallisieren; sie entsprach 74% des eingesetzten Rohmaterials. Der Schmp. von 334–336° (Bräunung ab 318°) war höher als der Literaturwert<sup>7)</sup> (319°, Bräunung ab 305°), die Kristallpulver-Röntgenaufnahme mit der von *Schwyz* und *Sieber*<sup>7)</sup> identisch (Tab. 2).

Die Abspaltung der beiden Tosylreste erfolgte mittels Natrium in flüssigem Ammoniak, wobei 8 Äquivalente des Metalls verbraucht wurden. Nach Überführung in das Dihydrochlorid und Kristallisation betrug die Ausbeute 71%, doch schmolz das Material bei 254–259° statt bei 278–279°. Es wurde einer multiplikativen Verteilung unterworfen, dabei resultierte wie bei *Schwyz* und *Sieber* ein größerer Peak mit einer fast abgetrennten zweiten Substanz geringeren K-Wertes. Zur Charakterisierung wurde jeweils die Substanz in der Vorder- bzw. Hinterfront des Doppelpeaks isoliert (Frakt. A und D). D erwies sich als reines Gramicidin S-dihydrochlorid-trihydrat, A enthielt außer den erwarteten Aminosäuren auch wieder Substanzen in der Position anderer Aminosäuren, von denen  $\delta$ -Aminovaleriansäure als Artefakt nach der Natriumbehandlung des prolin-haltigen Peptides zu erwarten war<sup>15)</sup>.

<sup>15)</sup> J. Ramachandran, Nature [London] 206, 927 (1965).

Tab. 2. Röntgen-Pulver-Diagramme der cyclischen Peptide. Die Literaturwerte wurden mit einer Guinier-Kamera, eigene Werte mit einer Debye-Scherrer-Kamera gemessen

<i>Ditosyl-gramicidin S</i> , Netzebenenabstände in Å:												
Lit. <sup>7)</sup> :	14.0	12.5	9.4	7.8	7.0	—	5.6	5.2	—	4.7	4.5	4.15
Gef.:	13.5	12.4	9.4	7.7	6.9	6.3	5.5	5.2	4.9	4.7	4.5	4.1
Intensität:	sst	sst	st	m	m	ss	ss	st	ss	sst	ss	s
<i>Gramicidin S · 2HCl · 3H<sub>2</sub>O</i> :												
Lit. <sup>7)</sup> :	19.0	17.0	10.6	8.6	8.5	4.55	—					
Gef.:	19.3	17.4	11.0	8.8	—	4.6	3.9					
Intensität:	m	m	st	s	s	m	s					

Haupt- und Nebenprodukte fielen im Verhältnis 4:1 an; die gewünschte Verbindung wurde mit etwa 50% Ausbeute kristallin isoliert. Das Röntgen-Pulver-Diagramm (Tab. 2), die optische Drehung und der Schmelzpunkt (281–282°) stimmten mit den Literaturangaben<sup>7)</sup> überein, die Aminosäure- und Elementaranalyse waren befriedigend (Tab. 1). Und schließlich ergab sich der K-Wert bei der Gegenstromverteilung zu 0,53 gegenüber der Literaturangabe<sup>7)</sup> von 0,51.

Es steht somit außer Zweifel, daß die Peptidsynthese nach *Merrifield* mit der hier praktizierten Technik den Aufbau von Polypeptiden in relativ kurzer Zeit in guten Ausbeuten erlaubt. Andererseits ist jedoch zu bedenken, daß bei der vorliegenden Synthese trotz wesentlich längerer Reaktionszeiten und größeren Reagenzüberschusses als in der Literatur empfohlen kein 100proz. einheitliches Reaktionsprodukt erhalten wurde. Lediglich die besonderen Eigenschaften des hier synthetisierten Peptides erlaubten die Abtrennung der Nebenprodukte vom Hauptprodukt. Bei der Synthese größerer Peptide werden die Möglichkeiten dafür wesentlich geringer. Unter diesem Gesichtspunkt kann die *Merrifield*-Technik in der gegenwärtigen Ausführung schwerlich zum Aufbau einheitlicher größerer Proteine dienen.

Parallel zur oben beschriebenen Synthese von Gramicidin S unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid als Kondensationsmittel wurde versucht, das lineare Decapeptid auch mit *N*-Hydroxy-succinimidestern der tert.-Butyloxycarbonyl-aminosäuren aufzubauen. Das hatte den Vorteil, daß das jeweils im Überschuß eingesetzte Acylierungsmittel zurückgewonnen werden konnte.

*Merrifield* benutzt für die Ankondensation von tert.-Butyloxycarbonyl-asparagin und tert.-Butyloxycarbonyl-glutamin seit jeher deren *p*-Nitro-phenylester<sup>13,16)</sup>. Nun fand aber *Hörnle*<sup>17)</sup> bei dem Versuch, die Insulin-A-Kette nach der *Merrifield*-Methode unter durchgehender Verwendung von tert.-Butyloxycarbonyl-aminosäure-*p*-nitrophenylestern aufzubauen, daß mit zwei- bis dreifachem Reagenzüberschuß und 12–16stdg. Reaktionszeit in Dimethylformamid durchweg nur 94% Acylierung erfolgte. Das hieß im Falle der Insulin-A-Kette, daß das Endprodukt unter vielen unerwünschten Polypeptiden zu etwa 30% vorlag. *Beyerman* et al.<sup>18)</sup> waren bei einer Synthese von Bis-*S*-benzyl-oxytocein-9-säure anscheinend erfolgreicher, sie arbeiteten

<sup>16)</sup> A. Marglin und R. B. Merrifield, J. Amer. chem. Soc. **88**, 5051 (1966).

<sup>17)</sup> S. Hörnle, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **348**, 1355 (1967).

<sup>18)</sup> H. C. Beyerman, C. A. M. Boers-Boonekamp und H. Maassen van der Brink-Zimmermannová, Recueil Trav. chim. Pays-Bas **87**, 257 (1968).

mit den *p*-Nitro-phenyl- und *N*-Hydroxy-succinimidestern von Acylaminosäuren, aber unter Zusatz von 1.2.4-Triazol als Aminolysekatalysator<sup>19)</sup>. Dabei wurden 4–5 Äquivalente des aktivierten Esters und die gleiche Menge Triazol 17–64 Stdn. mit der harzgebundenen Aminkomponente in Dimethylformamid bei Raumtemperatur umgesetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ohne Katalysator mit tert.-Butyloxycarbonylaminosäure-[*N*-hydroxy-succinimidestern] in Methylenchlorid als Lösungsmittel gearbeitet. Von der Esterkomponente wurden jeweils vier Äquivalente eingesetzt, die Reaktionszeiten waren 48–120 Stdn. Nach jedem Kupplungsschritt wurden dem gewaschenen Harz Proben entnommen und nach Totalhydrolyse der Aminosäureanalyse unterworfen (Tab. 3). Dabei zeigte es sich, daß der Umsatz mit wachsender Kettenlänge sehr rasch abnimmt. Nach Ablösung des „Decapeptides“ vom polymeren Träger lag ein komplexes Substanzgemisch vor, die Auswaage betrug nur 2.15 g gegenüber 5.59 g beim Carbodiimidverfahren (s. o.).

Tab. 3. Merrifield-Synthese mit *N*-Hydroxy-succinimidestern, Aminosäureanalysen. Hydrolyse der harzgebundenen Peptide in 12 *n* HCl/Dioxan (1 : 1, v/v), 24 Stdn. bei 105°, des abgelösten Materials in 6 *n* HCl, 24 Stdn. bei 105°. — Die kursiv gedruckten Werte wurden auf Grund der vorhergehenden Analysenwerte als konstant übernommen

Val	Orn + Orn(Tos)	Leu	Phe	Pro	Val	Orn + Orn(Tos)	Leu	Phe	Pro
								—	—
							1.01	1.20	1.00
						1.49 1.08	0.75	0.82	1.00
					1.68	0.41 0.33	0.80	0.84	1.00
				0.24	0.68	0.41 0.30	0.80	0.84	1.00
			0.60	0.77	0.61	0.45 0.38	0.80	0.84	1.00
		0.69	0.60	0.53	0.83	0.43 0.35	0.80	0.84	1.00
	0.00 0.10	0.51	0.60	0.73	0.62	0.40 0.33	0.80	0.84	1.00
0.07	0.22 0.27	0.59	0.60	0.85	0.62	0.40 0.33	0.80	0.84	1.00
Nach Ablösung vom Harz:									
0.11	0.16 0.20	0.41	0.60	0.44	0.62	0.40 0.33	0.80	0.84	1.00

Trotzdem wurde versucht, aus diesem Gemisch durch Cyclisierung, nachfolgende Ionenaustauschchromatographie, Gegenstromverteilung und Kristallisation Ditosylgramicidin S zu isolieren. Die Ausbeute waren 220 mg eines Materials, das nicht mit der gewünschten Verbindung identisch war. Bemerkenswert ist der Befund, daß bei der zweiten Versuchsreihe der Aminosäure-Analysator keine unerwarteten ninhydrinpositiven Substanzen anzeigte.

<sup>19)</sup> H. C. Beyerman und W. Maassen van der Brink, Proc. chem. Soc. [London] 1963, 266.

Herrn Prof. Dr. H. Zahn danke ich für die großzügige Förderung dieser Arbeit, Fräulein M. Z. von Zombafalva für tätige Mitarbeit und Herrn Dr. M. Spei für die Anfertigung der Röntgenaufnahmen. Herrn Prof. Dr. R. Schwyzer danke ich sehr herzlich für eine Probe des von ihm synthetisierten Gramicidins. Dem Gesamtverband der Textilindustrie in der Bundesrepublik Deutschland, der Arbeitsgemeinschaft Industrieller Forschungsvereinigungen und dem Bundesminister für Wirtschaft danke ich für die Förderung des Forschungsvorhabens Nr. 1318. Für materielle Unterstützung sei weiterhin dem Landesamt für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen und dem Verband der Chemischen Industrie gedankt.

## Beschreibung der Versuche

Alle Lösungsmittel waren absolut wasserfrei und destilliert.

### A. Synthese unter Verwendung von Carbodiimid

1. Aufbau v. Boc-Val-Orn(Tos)-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn(Tos)-Leu-D-Phe-Pro-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-Polymer: 10.0 g Boc-Pro-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-Polymer mit einer Beladung von 5.0 mMol Aminosäure wurden im Reaktionsgefäß nach Kusch<sup>20)</sup> folgenden Operationen unterworfen:

a) Abspaltung der Boc-Gruppe durch 80 ccm 4 n HCl/Dioxan in 10 Min., Auswaschen mit 3 mal je 100 ccm Dioxan und 3 mal je 100 ccm CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, jeweils 10 Min.

b) Freisetzen der Aminogruppe mit 5 ccm Triäthylamin in 100 ccm CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 30 Min., Nachwaschen mit 4 mal je 100 ccm CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, jeweils 10 Min. In aliquoten Teilen der vereinigten Filtrate dieses Arbeitsganges wurde der Chloridgehalt titriert.

c) Die jeweiligen Boc-Aminosäuren setzte man mit 100 ccm CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zu, gab nach 10 Min. die äquiv. Menge einer 1 m Lösung von Dicyclohexylcarbodiimid in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zu und ließ 180 Min. reagieren. Dann wurde mit 3 mal 100 ccm CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 3 mal 100 ccm Methanol, 2 mal 100 ccm Eisessig und 100 ccm Dioxan, jeweils für 10 Min., nachgewaschen.

Für die Kupplungen wurden jeweils folgende Mengen Aminosäure-Derivat eingesetzt: 8.1 g Boc-D-Phe (zweimal), 9.5 g Boc-Leu-H<sub>2</sub>O (entwässert, zweimal), 11.7 g Boc-Orn(Tos) (zweimal), 8.2 g Boc-Val (zweimal) und 8.2 g Boc-Pro.

2. HBr·Val-Orn(Tos)-Leu-D-Phe-Pro-Val-Orn(Tos)-Leu-D-Phe-Pro, Abspaltung vom Träger: Das Harz suspendierte man in der für die Synthese des Peptides benutzten Apparatur in 100 ccm Trifluoressigsäure und ließ durch die Fritte 100 Min. lang sorgfältig gereinigten Bromwasserstoff perlen. Dann wurde abgesaugt und dreimal mit je 20 ccm Trifluoressigsäure für jeweils 3 Min. unter Durchleiten von Stickstoff nachextrahiert. Die vereinigten Filtrate wurden am Rotationsverdampfer i. Vak. eingengt, der Rückstand mit Äther verrieben, abfiltriert, mit Äther gewaschen und i. Vak. getrocknet; 5.59 g Auswaage.

Die Harzrückstände wurden noch 90 Min. mit 4 n HBr/Eisessig behandelt und mit Eisessig nachgewaschen. Aus den Filtraten wurde durch Zugabe von Äther/Petroläther eine sehr geringe Menge eines braunen Öls gefällt, das unter Äther nicht fest wurde.

3. Ditosyl-gramicidin S-dihydrat: In einem 4-l-Dreihalskolben wurden 3.25 l frisch über KOH dest. Pyridin vorgelegt, 20.0 g (97 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid und 10.0 g (72 mMol) p-Nitro-phenol zugefügt und kräftig gerührt. Im Verlaufe von 4 Tagen wurde eine Lösung von 5.20 g (3.36 mMol) Decapeptid-hydrobromid und 0.6 ccm (4.3 mMol) Triäthylamin in 750 ccm Pyridin zutropft, noch zwei Tage gerührt, dann 25 ccm 50 proz. Essigsäure zugegeben und nach 4 Stdn. am Rotationsverdampfer unterhalb 40° eingengt. Der Rückstand wurde mit Petroläther und 3 mal je 200 ccm Äther heiß extrahiert, mit 75 ccm Pyridin er-

<sup>20)</sup> P. Kusch, Kolloid-Z. 208, 138 (1966).

wärmt, abgekühlt und filtriert sowie mit je 50 ccm Pyridin und Aceton nachgewaschen. Der Rückstand (Dicyclohexylharnstoff) wog 19.95 g. Das Filtrat wurde eingengt, der feste Rückstand wog nach Extraktion mit siedendem Äther 5.35 g. Das bräunliche Pulver wurde unter Erhitzen in 1.5 l Methanol/Isopropylalkohol/Wasser (1:1:1) gelöst und mit je 25 g Dowex 1 X-2 (OH-Form) und Dowex 50 WX-2 (H-Form) (beide mit dem Lösungsmittelgemisch äquilibriert) 2 Stdn. gerührt. Dabei entfärbte sich die Lösung völlig. Nach Einengen i. Vak. (starkes Schäumen!) und Gefriertrocknung resultierten 3.00 g Peptidmaterial mit uneinheitlichem Schmp. Es wurde durch Gegenstromverteilung über 250 Stufen im System  $\text{CCl}_4/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HOH}$  (20:17:3, v/v)<sup>7)</sup> in vier Fraktionen zerlegt, wobei allerdings nur Fraktion II einen symmetrischen Peak entwickelte. Die Fraktionen wurden den Röhrchen 1–34 (I, 0.36 g), 35–84 (II), 85–155 (III, 0.22 g) und 156–200 (IV, 0.10 g) entnommen. Lediglich Fraktion II kristallisierte aus Äthanol/Wasser oder Aceton/Wasser; die Kristalle klebten etwas aneinander und wurden daher noch mit kaltem Benzol gewaschen, Ausb. 2.22 g farblose Blättchen. Der K-Wert für II wurde aus der Verteilungskurve zu 0.32 errechnet, der Literaturwert<sup>7)</sup> ist 0.37.

4. *Gramicidin-S-dihydrochlorid-trihydrat*: 1000 mg reines Ditosylat (Fraktion 3/II) wurden 24 Stdn. bei 40° i. Vak. über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet (Gewichtsverlust 10 mg) und unter Rühren in 900 ccm frisch über Natrium dest. flüss. Ammoniak suspendiert. Durch Eintauchen einer mit Natrium gefüllten kalibrierten Kapillare wurde reduziert. Die Reaktion nahm etwa 25 Min. in Anspruch, da das Natrium nur langsam in Lösung ging. Die Suspension war zunächst leicht gelbstichig, wurde dann farblos, gegen Ende der Reaktion zitronengelb, bei Natrium-Überschuß grünlich. Die schwache Grünfärbung wurde 45 Sek. aufrechterhalten, dann wurden 1.5 g Ammoniumchlorid zugesetzt. Insgesamt waren  $130 \pm 5$  mg Natrium verbraucht worden. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur eingedunstet, mit *n* HCl aufgenommen, der Rückstand abfiltriert, in Äthanol gelöst und mit viel *n* HCl gefällt. Nach Abfiltrieren und Trocknen an der Luft resultierten 581 mg. Die Kristalle wurden im System  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/0.01$  *n* HCl (10:7:3, v/v) über 250 Stufen gegenstromverteilt. Dabei entwickelten sich zwei unvollständig getrennte Peaks mit den K-Werten 0.53 und 0.32, Flächenverhältnis 4:1. Das Material in der Vorder- und Hinterflanke des Doppelpeaks wurde getrennt isoliert und analysiert. Während das farblose Hauptprodukt gut kristallisierte, fiel das Nebenprodukt als amorphes gelbes Pulver aus. Insgesamt wurden 497 mg Material isoliert.

*Gramicidin S-dihydrochlorid-trihydrat*: 404 mg farblose Kristalle aus Äthanol/*n* HCl, Schmp. 281–282° (Kapillare) (Lit.<sup>7)</sup>: 277–278°),  $[\alpha]_D$ :  $-283 \pm 5^\circ$  (*c* = 0.44 in 70proz. Äthanol v/v) (Lit.<sup>7)</sup>:  $-289 \pm 10^\circ$ ).

$\text{C}_{60}\text{H}_{92}\text{N}_{12}\text{O}_{10} \cdot 2\text{HCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (1268.5) Ber. C 56.82 H 7.95 N 13.25

Gef. C 56.92 H 8.24 N 13.45

## B. Synthese mit *N*-Hydroxy-succinimidestern

1. *Reaktionen am Träger*: Es wurde wiederum mit 10.0 g desselben Polymeren wie bei A. 1. begonnen und folgende Operationen vorgenommen (vgl. A. 1.):

a) 80 ccm *n* HCl/Eisessig, 30 Min.; 3 mal Eisessig, 3 mal Methanol, 3 mal  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , jeweils 50 ccm und 10 Min.

b) 5 ccm Triäthylamin in 100 ccm  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 30 Min.; 4 mal je 50 ccm  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  für jeweils 10 Min.

c) 4 Äquivalente *Boc-Aminosäure-[N-hydroxy-succinimidester]* in 50 ccm  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , Reaktionszeit s. unten; 3 mal je 100 ccm  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  und 3 mal je 100 ccm Methanol, jeweils für 10 Min., die Filtrate dieses Arbeitsganges wurden eingengt, die Rückstände aus Isopropylalkohol umkristallisiert.

d) 10 Min. waschen mit 50 ccm Eisessig.

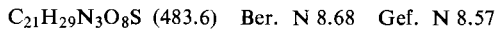


Eingesetzt wurden jeweils 20.0 mMol der aktivierten Ester, zurückgewonnen wurden (in Klammern die Kondensationszeiten): 8.8 bzw. 13.3 mMol Boc-D-Phe (3 Tage), 14.2 bzw. 13.3 mMol Boc-Leu · H<sub>2</sub>O (2 bzw. 3 Tage), 18.0 bzw. 14.2 mMol Boc-Orn(Tos) (3 Tage), 10.9 bzw. 11.9 mMol Boc-Val (3 bzw. 5 Tage) und 12.0 mMol Boc-Pro (3 Tage).

2. Die Abspaltung des Syntheseproduktes vom Träger, die Cyclisierung und Aufarbeitung erfolgten wie bei A. 2. und A. 3.

*tert.-Butyloxycarbonyl-D-phenylalanin-[N-hydroxy-succinimidester]*: 26.5 g (0.1 Mol) *Boc-D-Phe*<sup>11)</sup> und 12.6 g (0.11 Mol) *N-Hydroxy-succinimid* wurden in 100 ccm Tetrahydrofuran bei 0° mit 20.6 g (0.1 Mol) *Dicyclohexylcarbodiimid* umgesetzt. Anderntags wurde vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und i. Vak. eingeengt, wobei der Rückstand kristallisierte. Er kam aus Isopropylalkohol mit Schmp. 149–151°,  $[\alpha]_D^{25}$ : +20.7° (*c* = 2, in Dioxan) (Lit.<sup>21)</sup> für die L-Form: Schmp. 152–153°,  $[\alpha]_D^{20}$ : –20.7°, Ausb. 35.7 g (98%).

*tert.-Butyloxycarbonyl-tosyl-L-ornithin-[N-hydroxy-succinimidester]*: 33.0 g (85 mMol) *Boc-Orn(Tos)*<sup>11)</sup> und 9.8 g (85 mMol) *N-Hydroxy-succinimid* wurden in Tetrahydrofuran bei 0° mit 17.6 g (85 mMol) *Dicyclohexylcarbodiimid* zur Reaktion gebracht. Nach 24 Stdn. wurde der Dicyclohexylharnstoff abgetrennt, die Lösung eingeengt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und jeweils schwach alkalisch, schwach sauer und neutral gewaschen, dann über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Beim Einengen der Lösung entstand ein Öl, das unter Petroläther bei 0° kristallisierte. Aus Isopropylalkohol Schmp. 152–154°,  $[\alpha]_D^{20}$ : –15.8° (*c* = 1, in Essigester), Ausb. 37.0 g (90%).



<sup>21)</sup> E. Wünsch und F. Drees, Chem. Ber. **100**, 816 (1967).