

173. Ein synthetisches Analoges des Gramicidins S:

c-(Val-Lys-Leu-Phe-Pro)₂, (L-L-L-D-L)₂6. Mitteilung über homodet cyclische Polypeptide¹⁾von **R. Schwyzer** und **P. Sieber**

(21. VII. 58)

Die Synthese des Gramicidins S²⁾, das als homodet cyclisches Dekapeptid mit der Aminosäuresequenz c-(Val-Orn-Leu-Phe-Pro)₂, (L-L-L-D-L)₂, zu formulieren ist, hat den Weg zur Herstellung «synthetischer Antibiotika» der Peptidreihe, welche in der Natur nicht zu erwarten sind, eröffnet. Eine auffallende strukturelle Eigenschaft des Gramicidins S ist sein Gehalt an den beiden «seltenen» Aminosäuren L-Ornithin und D-Phenylalanin, welche in Proteinen nicht vorkommen und deren Anwesenheit vielleicht die antibiotischen Eigenschaften beeinflusst³⁾. Wir haben deshalb ein c-Dekapeptid synthetisiert, welches sonst gleich gebaut ist wie Gramicidin S, aber anstelle des L-Ornithins die häufigere Aminosäure L-Lysin enthält. Es zeigte sich, dass die Verbindung ebenfalls stark antibiotisch wirksam ist.

Die Synthese erfolgte auf ähnlichem Wege wie diejenige des Gramicidins S. Carbobenzoxyl-L-valin (I)⁴⁾ wurde mit N^ε-Toluolsulfonyl-L-lysin-methylester (II) mittels Phosphoroxychlorid und Triäthylamin⁵⁾ zum Dipeptidderivat Carbobenzoxyl-L-valyl-(N^ε-toluolsulfonyl)-L-lysin-methylester (III)⁶⁾ umgesetzt. Die schön kristallisierte Verbindung III ergab mit Hydrazinhydrat in Äthanol in langsamer Reaktion das ebenfalls kristallisierte Hydrazid IV. Das Azid V wurde in der üblichen Weise hergestellt und mit dem Tripeptidester L-Leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin-methylester (VI)³⁾ zum Pentapeptidderivat Carbobenzoxyl-L-valyl-L-(N^ε-toluolsulfonyl)-lysyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin-methylester (VII) umgesetzt, welcher in zwei Kristallmodifikationen (Smp. 142–143° und Smp. 208–208,5°; [α]_D = –48° in Eisessig) erhalten werden konnte. Katalytische Hydrierung entfernte den Carbobenzoxylester; das entstandene Hydrochlorid des Pentapeptidmethylesters VIII wurde zu IX trityliert. Verseifung von IX lieferte Trityl-L-valyl-L-(N^ε-toluolsulfonyl)-lysyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin (X):

¹⁾ Als 1. bis 5. Mitteilungen über homodet cyclische Polypeptide sollen folgende Arbeiten gelten: R. SCHWYZER, B. ISELIN, W. RITTEL & P. SIEBER, *Helv.* **39**, 872 (1956); R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Angew. Chem.* **68**, 518 (1956); *Chimia* **10**, 265 (1956); *Helv.* **40**, 624 (1957); R. SCHWYZER, P. SIEBER & B. GORUP, *Chimia* **12**, 90 (1958).

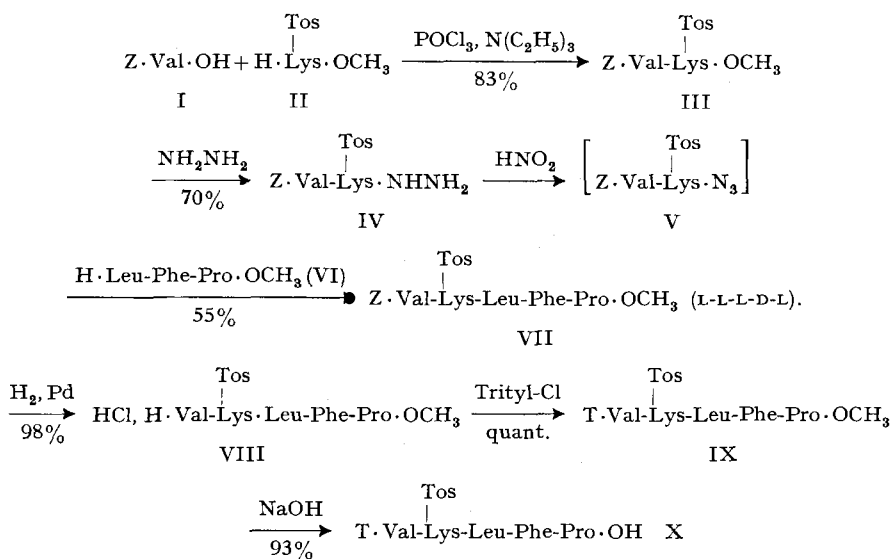
²⁾ R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Angew. Chem.* **68**, 518 (1956); *Helv.* **40**, 624 (1957).

³⁾ J. I. HARRIS & T. S. WORK, *Nature* **161**, 804 (1948); *Biochem. J.* **46**, 196, 582 (1950).

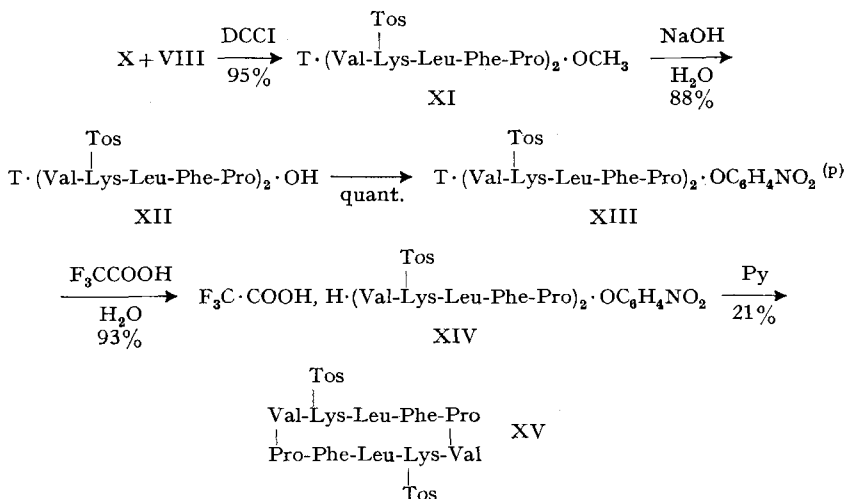
⁴⁾ R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.* **42**, 99 (1948).

⁵⁾ TH. WIELAND & B. HEINKE, *Liebigs Ann. Chem.* **599**, 70 (1956).

⁶⁾ Der Carbobenzoxylester (C₆H₅CH₂OCO-) wird in den abgekürzten Formeln (vgl. Lit. ¹⁾) mit Z wiedergegeben. Tos bedeutet p-Toluolsulfonyl- und T Triphenylmethyl-.



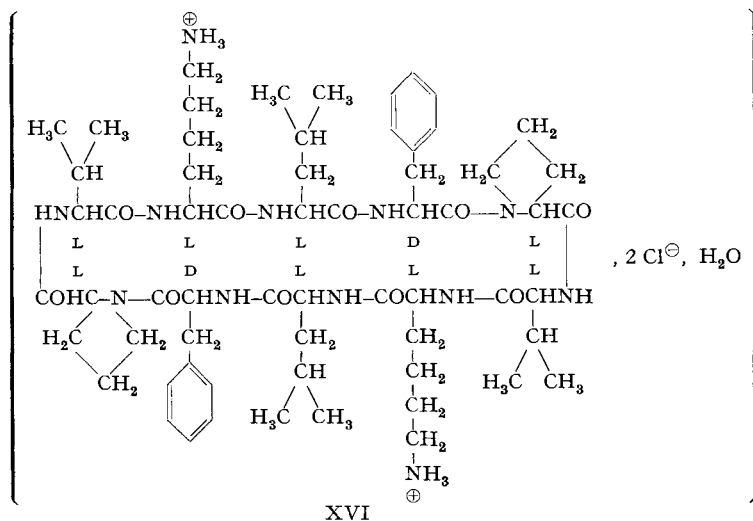
Dieses Pentapeptidderivat (X) wurde nun mit dem Pentapeptid-methyl-ester (aus VIII) nach SHEEHAN unter dem Einfluss von Dicyclohexyl-carbo-diimid⁷⁾ (DCCI) zum Dekapeptidderivat Trityl-L-valyl-L-(N ϵ -toluolsulfonyl)-lysyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolyl-L-valyl-L-(N ϵ -toluolsulfonyl)-lysyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin-methylester (XI) vereinigt. Verseifung ergab das Trityl-ditosyl-dekapeptid XII, welches über die p-Nitrophenylester XIII und XIV zu cyclo-L-Valyl-L-(N ϵ -toluolsulfonyl)-lysyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolyl-L-valyl-L-(N ϵ -toluolsulfonyl)-lysyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolyl (XV) cyclisiert wurde:



⁷⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 (1955).

Reines cyclo-(Val-Tos·Lys-Leu-Phe-Pro)₂ (XV) wurde durch multiplikative Verteilung und Kristallisation aus Methanol-Wasser als farblose Prismen erhalten, welche nach dem Trocknen über P₂O₅ bei 110° noch ½ Mol Kristallwasser enthalten (Ditosyl-Gramicidin S behält 2 Mole Wasser²⁾).

Reduktion mit Natrium in flüssigem Ammoniak⁸⁾ entfernte die beiden Toluolsulfonylreste. Durch Kristallisation aus Methanol-verd. HCl und multiplikative Verteilung wurde das Dihydrochlorid-monohydrat des cyclo-L-Valyl-L-lysyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolyl-L-valyl-L-lysyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolyls (XVI) erhalten. Die Verbindung, ein bishomo-Gramicidin S, zeigte an einer grössern Anzahl von GRAM-positiven und -negativen Organismen ähnliche antibiotische Eigenschaften wie das Gramicidin S⁹⁾.



Experimenteller Teil¹⁰⁾

N^ε-p-Toluolsulfonyl-L-lysin-methylester-hydrochlorid: 23 g N^ε-Toluolsulfonyl-L-lysin¹¹⁾ wurden in 550 ml abs. Methanol gelöst und diese Lösung unter Rühren und Kühlen in Eiskochsalz mit HCl gesättigt. Nach einstündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde das Methanol im Vakuum verdampft. Der ganze Prozess wurde nochmals wiederholt. Der erhaltene rohe Ester wurde aus abs. Äthanol + Äther umkristallisiert; 26 g (97%), Smp. 135°.

C₁₄H₂₃O₄N₂SCl Ber. N 7,98 S 9,14% Gef. N 7,96 S 9,12%

Carbobenzoxy-L-valyl-N^ε-tosyl-L-lysin-methylester: Zu einem Gemisch von 1 g Carbobenzoxy-valin⁴⁾, 1,4 g N^ε-Tosyl-lysin-methylester-hydrochlorid, 2,2 ml Triäthylamin und 20 ml Tetrahydro-furan wurde unter Rühren bei -5° in ca. 1 Std. 0,74 ml Phosphoroxychlorid in 3 ml Tetrahydro-furan getropft. Anschliessend wurde noch 2 Std. unter Eiskühlung gerührt, dann das überschüssige Phosphoroxychlorid mit wenig Wasser zerstört

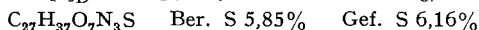
⁸⁾ Vgl. V. DU VIGNEAUD & O. K. BEHRENS, J. biol. Chemistry, **117**, 27 (1937).

⁹⁾ Die biologische Prüfung der Verbindung verdanken wir den Herren Dres. GROSS und NEIPP von unserer biologischen Abteilung.

¹⁰⁾ Analysenpräparate wurden 2 Std. bei 100°/10⁻² Torr getrocknet.

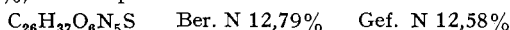
¹¹⁾ R. ROESKE, F. H. C. STEWART, R. J. STEDMAN & V. DU VIGNEAUD, J. Amer. chem. Soc. **78**, 5884 (1956).

und das Tetrahydro-furan im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde in Essigester und Wasser gelöst und die Essigesterlösung noch mit 2-n. Salzsäure und Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Nach dem Trocknen der Essigesterlösung über Natriumsulfat wurde zur Trockne verdampft und der Rückstand aus Aceton-Äther umkristallisiert. 1,81 g (83%), Smp. 130°. $[\alpha]_D^{18}$: $-8^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,958$ in Eisessig).



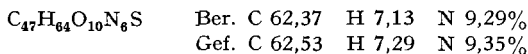
Dasselbe Produkt wurde aus Carbobenzoxy-valin-p-nitrophenylester und N^ε-Tosyl-lysin-methylester-hydrochlorid in einer Ausbeute von 67% erhalten.

Carbobenzoxy-L-valyl-L-(N^ε-tosyl)-lysin-hydrazid: 10 g Carbobenzoxy-L-valyl-L-(N^ε-tosyl)-lysin-methylester wurden mit 100 ml abs. Äthanol und 2,6 ml Hydrazinhydrat 40 Std. unter Rückfluss gekocht. Der Methylester ging dabei in Lösung, und nach kurzer Zeit begann das Hydrazid auszufallen. Dieses wurde abgenutscht und mit Äther gewaschen. Man erhielt 7 g (70%) vom Smp. 209°.

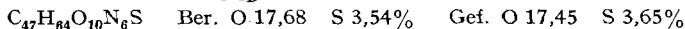


Aus der Mutterlauge wurden nach Versetzen mit Wasser noch 19% unveränderter Methylester zurückerhalten.

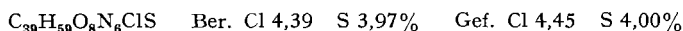
Z·Val-Tos·Lys-Leu-Phe-Pro·OMe (L-L-L-D-L): Aus 1,56 g HCl·H·Leu-Phe-Pro·OMe³) wurde mit Hilfe von Natriummethylat das freie Peptid hergestellt und dieses in Essigester gelöst. Andererseits wurden 2 g Z·Val-Tos·Lys·NHNH₂ in einem Gemisch von 24 ml Eisessig, 36 ml 1-n. Salzsäure und 36 ml Wasser gelöst. Diese Lösung wurde auf -10° abgekühlt und auf einmal mit einer konz. Lösung von 300 mg Natriumnitrit versetzt. Das ausgefallene Azid wurde sofort abgenutscht, 3mal mit Eiswasser gewaschen, dann in Essigester bei -10° gelöst, über Natriumsulfat getrocknet und in die obige Essigesterlösung des Tripeptids hineinfiltrierte. Das Gemisch wurde 7 Tage bei 0° stehengelassen. Nach 1–2 Tagen begann das Pentapeptid in weissen Nadelchen zu kristallisieren. Diese wurden abgenutscht und mit Äther gewaschen; 1,81 g (55%), Smp. 208–208,5°. $[\alpha]_D^{23}$: -47 ; $-48^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 1,056$ in Eisessig).



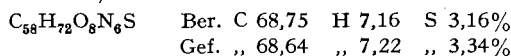
Die Essigester-Mutterlauge wurde mit 2-n. Salzsäure und Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und nach dem Trocknen vollständig eingedampft. Der Rückstand ergab nach dem Umkristallisieren aus Äthanol-Wasser noch 500 mg Pentapeptid (15%). Dessen Smp. lag trotz mehrmaligem Umkristallisieren bei nur 142–143°. Es zeigte sich, dass verschiedene Modifikationen vorlagen, denn das tiefschmelzende Produkt schmolz nach Umkristallisation und Impfen mit hochschmelzendem auch bei 206°. Die Analyse stimmte auch vom tiefschmelzenden Produkt. $[\alpha]_D^{23}$: -48 ; $-49^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 1,146$ in Eisessig).



HCl·H·Val-Tos·Lys-Leu-Phe-Pro·OMe (L-L-L-D-L): 3,6 g Z·Val-Tos·Lys-Leu-Phe-Pro·OMe wurden in 40 ml Eisessig und 8 ml 1-n. Salzsäure gelöst und in Gegenwart von 300 mg 10-proz. Palladium-Kohle hydriert. Nach 3 Std. wurde der Katalysator abgenutscht, das Filtrat vollständig zur Trockne verdampft und der Rückstand noch dreimal mit abs. Äthanol abgedampft; 3,15 g (98%). Zur Analyse wurde aus abs. Äthanol-Äther umgefällt; Smp. 140°.



T·Val-Tos·Lys-Leu-Phe-Pro·OMe (L-L-L-D-L): 2,93 g HCl·H·Val-Tos·Lys-Leu-Phe-Pro·OMe wurden in 11 ml abs. Chloroform und 1,47 ml Triäthylamin gelöst, bei 0° mit 1,47 g Triphenylchloromethan versetzt und 6 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Chloroform wurde dann i. V. vollständig verdampft und der Rückstand mehrmals mit Äther-Petroläther 1:2 und 1:1 und zuletzt mit Wasser verrieben. Das Produkt wurde aus Essigester-Äther-Petroläther umgefällt; 3,5 g (95%), Smp. 111°. $[\alpha]_D^{24}$: -27 ; $-28^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 0,9795$ in Methanol).



$T \cdot (Val\text{-}Tos\text{-}Lys\text{-}Leu\text{-}Phe\text{-}Pro \cdot OH) (L\text{-}L\text{-}D\text{-}L)_2$: 3,83 g $T \cdot Val\text{-}Tos\text{-}Lys\text{-}Leu\text{-}Phe\text{-}Pro \cdot OMe$ wurden in 65 ml Methanol gelöst, mit 7,7 ml 1-n. NaOH versetzt und 2 Std. auf 36° erwärmt. Das Methanol wurde im Vakuum eingedampft, bis sich eine Trübung bildete. Diese alkalische Lösung wurde bei 0° mit überschüssiger Zitronensäure-Lösung versetzt, die ausgefallene Säure abgenutscht und gewaschen; 3,5 g (93%). Zur Analyse wurde das Produkt aus Benzol-Äther-Petroläther umgefällt, Smp. 138°. $[\alpha]_D^{25}$: -34; -36° ± 3° (c = 1,4 in Methanol).

$C_{57}H_{70}O_5N_6S$	Ber. O 12,81	S 3,21	OCH_3 0%
	Gef. ,, 12,83	,, 2,95%	,, Spuren

$T \cdot (Val\text{-}Tos\text{-}Lys\text{-}Leu\text{-}Phe\text{-}Pro)_2 \cdot OMe (L\text{-}L\text{-}D\text{-}L)_2$: 1 g HCl, $H \cdot Val\text{-}Tos\text{-}Lys\text{-}Leu\text{-}Phe\text{-}Pro \cdot OMe$ wurde in 15 ml abs. Essigester suspendiert und mit 2 ml Triäthylamin versetzt, wobei sich sofort Triäthylamin-hydrochlorid ausschied. Dieses wurde abgenutscht, das Filtrat zur Trockne verdampft und der Rückstand in Acetonitril gelöst. Zu dieser Lösung gab man 1 g $T \cdot Val\text{-}Tos\text{-}Lys\text{-}Leu\text{-}Phe\text{-}Pro \cdot OH$ und 240 mg Dicyclohexyl-carbodiimid und liess 1 Tag bei Zimmertemperatur stehen. Die gebildete geringe Fällung wurde abgenutscht, das Filtrat zur Trockne verdampft, der Rückstand in Essigester gelöst und mit eiskalter, verdünnter Salzsäure ausgeschüttelt. Die Essigesterlösung wurde nach dem Trocknen vollständig eingedampft. Der Rückstand (2,2 g) wurde an 22 g Aluminiumoxyd, Aktivität III, chromatographiert. Mit 110 ml Chloroform und 110 ml Chloroform-Essigester 1:1 wurden 1,67 g Trityl-dekapeptid-methylester eluiert (95%). Zur Analyse wurde aus Benzol-Petroläther umgefällt, Smp. 117°. $[\alpha]_D^{25}$: -48; -49° ± 4° (c = 0,855 in Methanol).

$C_{96}H_{126}O_{15}N_{12}S_2$	Ber. C 65,80	H 7,25	S 3,66	$(O)CH_3$ 0,86%
	Gef. ,, 65,85	,, 7,50	,, 3,60	,, 1,05%

$T \cdot (Val\text{-}Tos\text{-}Lys\text{-}Leu\text{-}Phe\text{-}Pro)_2 \cdot OH (L\text{-}L\text{-}D\text{-}L)_2$: 500 mg Trityl-dekapeptid-methylester wurden in 15 ml Dioxan und 2 ml Methanol gelöst, mit 5,7 ml 0,5-n. NaOH versetzt und 1¾ Std. auf 37° erwärmt. Die Lösung wurde i. V. bis zur starken Trübung eingeengt und dann auf eiskalte, überschüssige Zitronensäure-Lösung gegossen. Die Fällung wurde abgenutscht und gewaschen. Erhalten wurden 435 mg Trityl-dekapeptid (88%). Das Produkt wurde aus Essigester-Petroläther umgefällt, Smp. 137-138°. $[\alpha]_D^{25}$: -61; -62° ± 4° (c = 1,119 in Methanol).

$C_{95}H_{124}O_{15}N_{12}S_2$	Ber. C 65,64	H 7,19	$(O)CH_3$ 0%
	Gef. ,, 65,89	,, 7,37	,, 0%

$T \cdot (Val\text{-}Tos\text{-}Lys\text{-}Leu\text{-}Phe\text{-}Pro)_2 \cdot OC_6H_4NO_2 (L\text{-}L\text{-}D\text{-}L)_2$: 490 mg Trityl-dekapeptid, gelöst in 1,5 ml Pyridin, und 450 mg Di-(p-nitrophenyl)-sulfid wurden 24 Std. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Gemisch wurde bei 0° mit überschüssiger Zitronensäure-Lösung versetzt, 30 Min. stehengelassen, dann mit Essigester extrahiert und diese Lösung mit Zitronensäure-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat wurde das Lösungsmittel vollständig abgedampft und der Rückstand solange mit Äther-Petroläther 1:2 und 1:1 verrieben, bis er fest war: 535 mg (102%); dieses Produkt wurde direkt weiterverarbeitet.

$CF_3COOH, H \cdot (Val\text{-}Tos\text{-}Lys\text{-}Leu\text{-}Phe\text{-}Pro)_2 \cdot OC_6H_4NO_2 (L\text{-}L\text{-}D\text{-}L)_2$: 530 mg Trityl-dekapeptid-p-nitrophenylester, gelöst in 10 ml Trifluoressigsäure, wurden bei -5 bis -10° langsam mit 10 ml Wasser versetzt. Nach etwa 15 Min. wurde das Gemisch in Aceton-Trockeneis gefroren und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde beim Verreiben mit Äther-Petroläther 1:2, 1:1 und Äther sofort fest; 460 mg (93%).

$Cyclo\text{-}(Val\text{-}Tos\text{-}Lys\text{-}Leu\text{-}Phe\text{-}Pro)_2 (L\text{-}L\text{-}D\text{-}L)_2$: 460 mg $CF_3COOH, H \cdot (Val\text{-}Tos\text{-}Lys\text{-}Leu\text{-}Phe\text{-}Pro)_2 \cdot OC_6H_4NO_2$ wurden in 9,2 ml Dimethylformamid gelöst, mit 10 Tropfen Eisessig versetzt und diese Lösung innerhalb 4 Std. unter Rühren bei 55° in 92 ml Pyridin eingetroppt. Anschliessend wurde noch 2 Std. bei der gleichen Temperatur gerührt, dann das Lösungsmittel i. V. zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde in 100 ml Methanol-Isopropanol-Wasser (1:1:1, v/v) gelöst, durch einen gemischten stark sauren und stark basischen Ionenaustauscher (MERCK I und III) filtriert und mit 400 ml des gleichen Gemisches nachgewaschen. Das Filtrat wurde im Vakuum zur Trockne verdampft und der Rückstand aus Methanol-Wasser kristallisiert: 138 mg Rohprodukt (34%). Diese Substanz

wurde einer 48stufigen Verteilung zwischen Tetrachlorkohlenstoff-Methanol-Wasser (10:9:1, v/v) unterworfen; reine Fraktionen: 85,5 mg (21%), $K = 0,68$. Aus Methanol-Wasser kristallisierte das cyclo-Dekapeptid in weissen Prismen, Smp. 266–269° (u. Zers.). Getrocknet 3 Std. bei 110° und 10^{-2} Torr über P_2O_5 . $[\alpha]_D^{22} = -226^\circ \pm 4^\circ$ ($c = 1$ in Eisessig).

$C_{76}H_{108}O_{15}N_{12}S_2$, $\frac{1}{2} H_2O$ Ber. O 15,60 N 11,3% Gef. O 15,40 N 11,06%

*Cyclo-(Val-Lys-Leu-Phe-Pro)*₂, 2HCl, H₂O (L-L-L-D-L)₂: 100 mg cyclo-(Val-Tos·Lys-Leu-Phe-Pro)₂ wurden in 100 ml flüssigem, über Na destilliertem Ammoniak suspendiert und mit Natrium bis zur bleibenden Blaufärbung versetzt. Verbrauch ca. 120 mg. Das Gemisch wurde zur Zerstörung des Natriums und Überführung in das Hydrochlorid mit 600 mg Ammoniumchlorid versetzt, das Ammoniak verdampfen gelassen und der Rückstand bei 30–40° evakuiert. Der Rückstand wurde mit wenig 1-n. HCl verrieben, die feste Fällung abgenutscht und mit 1-n. HCl gewaschen. Feine Kristallnadeln aus Methanol-2-n. HCl; $K = 1,05$ bei der Verteilung im System Chloroform-Methanol-0,01-n. HCl (10:7:3, v/v) über 30 Stufen (Verhalten wie eine reine Verbindung). Trocknen 4 Std./100°/10⁻² Torr über P_2O_5 .

$C_{62}H_{98}O_{10}N_{12}Cl_2$, 1 H₂O Ber. C 59,08 H 8,00 O 13,96 N 13,34 Cl 5,63%
Gef. „ 59,40 „ 7,96 „ 13,98 „ 13,08 „ 5,77%

Die Mikroanalysen wurden unter der Leitung von Herrn Dr. H. GYSEL ausgeführt.

SUMMARY

The synthesis of a *bis-homo*-gramicidin S, *cyclo*-(Val-Lys-Leu-Phe-Pro)₂, 2HCl, H₂O (L-L-L-D-L)₂ is described. The product differs from gramicidin S in that the two residues of L-ornithine are replaced by residues of L-lysine. This change implies no significant loss of antibacterial properties. The antibiotic activity of gramicidine S is thus not due to the presence of the uncommon amino acid L-ornithine.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

174. Über ein bicyclisches Lacton aus Citryliden-essigsäure

von P. de Tribolet¹⁾, G. Gamboni²⁾ und H. Schinz

(18. VII. 58)

A. Einleitung

Citryliden-essigsäure (III) ist in der Literatur mehrmals erwähnt. Sie wurde durch Kondensation von Citral (I) mit Malonsäure bzw. Monoäthylmalonat³⁾ oder mit Monohalogenessigsäureestern nach REFORMATZKY⁴⁾ sowie durch Oxydation von Pseudojonon⁵⁾ hergestellt.

¹⁾ Vgl. Diss. von P. DE TRIBOLET, ETH Zürich, 1955.

²⁾ Vgl. Diss. von G. GAMBONI, ETH Zürich, 1956.

³⁾ A. VERLEY, Bull. Soc. chim. France [3] **21**, 414 (1899); J. VON BRAUN & W. RUDOLPH, Ber. deutsch. chem. Ges. **67**, 269 (1934).

⁴⁾ L. TÉTRY, Bull. Soc. chim. France [3] **27**, 598 (1902); E. CHERBULIEZ & A. HEGAR, Helv. **15**, 191 (1932); E. E. ROYALS, J. Amer. chem. Soc. **69**, 841 (1947).