

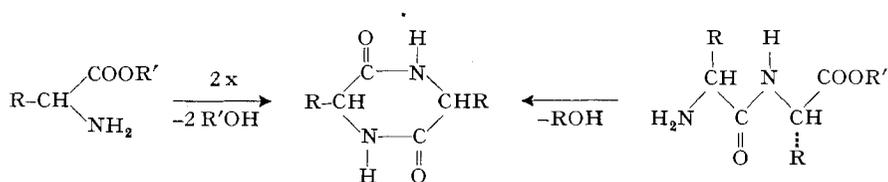
## 230. Verdoppelungsreaktionen beim Ringschluss von Peptiden. I. Synthese von Gramicidin S und von bis-homo-Gramicidin S aus den Pentapeptid-Einheiten

7. Mitteilung über homodet cyclische Polypeptide<sup>1)</sup>

von R. Schwyzer und P. Sieber

(5. IX. 58)

Bekanntlich führen alle Versuche,  $\alpha$ -Aminosäuren zu  $\alpha$ -Lactamen zu cyclisieren, zu einer Vereinigung zweier Molekeln unter Ringschluss zu Dioxopiperazinen<sup>2)</sup>. Der sterisch ungünstigere Reaktionsweg wird damit verlassen, und es werden nur die sterisch günstigeren Produkte erhalten. Dipeptidester cyclisieren sich in normaler Weise ebenfalls zu Dioxopiperazinen:



Dabei wird die in (kristallisierten) Dipeptiden normalerweise vorliegende *trans*-Peptidbindung<sup>3)</sup> zur *cis*-Peptidbindung (im Dioxopiperazinkristall<sup>4)</sup>) isomerisiert.

Bei Synthesen homodet cyclischer Polypeptide<sup>5)</sup> wurde bei Versuchen zur Herstellung von cyclo-Triglycyl<sup>6)</sup> eine ähnliche Verdoppelungsreaktion festgestellt, indem als einziges Produkt cyclo-Hexaglycyl isoliert werden konnte (die Reaktion ist in gewissem Sinne analog der Bildung von Pentaglycyl-glycin-methylester<sup>7)</sup> aus Diglycyl-glycin-methylester). Diese Reaktionsweise schien – da Synthesen anderer cyclischer Tripeptide von BOISSONNAS<sup>8)</sup>,

<sup>1)</sup> 6. Mitt. Helv. **41**, 1582 (1958).

<sup>2)</sup> TH. CURTIUS, Ber. deutsch. chem. Ges. **16**, 755 (1883).

<sup>3)</sup> S.-I. MIZUSHIMA & T. SHIMANOCHI, J. Amer. chem. Soc. **74**, 5550 (1952).

<sup>4)</sup> R. B. COREY, J. Amer. chem. Soc. **60**, 1598 (1938).

<sup>5)</sup> Die Literatur ist zusammengestellt bei a) R. SCHWYZER, B. ISELIN, W. RITTEL & P. SIEBER, Helv. **39**, 872 (1956) und b) R. SCHWYZER, Synthesis of Cyclic Polypeptides in «Amino Acids and Peptides with Antimetabolic and Cytotoxic Properties (a CIBA Foundation Symposium)», J. & A. Churchill Ltd., London 1958 (im Druck).

<sup>6)</sup> J. C. SHEEHAN & W. L. RICHARDSON, J. Amer. chem. Soc. **76**, 6329 (1954); J. C. SHEEHAN, M. GOODMAN & W. L. RICHARDSON, *ibid.* **77**, 6391 (1955); C. H. BAMFORD & F. J. WEYMOUTH, *ibid.* **77**, 6368 (1955).

<sup>7)</sup> E. FISCHER, Ber. deutsch. chem. Ges. **39**, 471 (1906); P. S. REES, D. P. TONG & C. F. YOUNG, J. chem. Soc. **1954**, 662; Diskussion der Analogie bei R. SCHWYZER, B. ISELIN, W. RITTEL & P. SIEBER, Helv. **39**, 872 (1956).

<sup>8)</sup> R. A. BOISSONNAS & I. SCHUMANN, Helv. **35**, 2229 (1952).

FRUTON<sup>9)</sup>, BROCKMANN<sup>10)</sup> und SMITH<sup>11)</sup> gemeldet wurden – auf dieses Beispiel beschränkt zu sein, bis wir fanden, dass bei Versuchen, c-Glycyl-glycyl-DL-phenylalanyl<sup>9)</sup> und c-Glycyl-glycyl-L-leucyl (die Synthese des Antipoden wurde von BOISSONNAS gemeldet) über aktivierte Ester herzustellen, ebenfalls Verdoppelung zu cyclischen Hexapeptiden erfolgt<sup>12)</sup>.

Wie wir neuerdings nachkontrolliert haben, liefert die Cyclisierung von aktivierten Estern des Triglycyl-glycins eindeutig cyclo-Tetraglycyl<sup>5a)</sup>. Dagegen fanden wir überraschenderweise, dass bei Versuchen zur Herstellung der dem Gramicidin S<sup>13)</sup> und dem bis-homo-Gramicidin S<sup>1)</sup> entsprechenden cyclo-Pentapeptide (cyclo-L-Valyl-L-ornithyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolyl und cyclo-L-Valyl-L-lysyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolyl) über aktivierte Ester der offenkettigen Pentapeptide stets eine cyclisierende Verdoppelung eintritt und die cyclo-Dekapeptide (Gramicidin S und bis-homo-Gramicidin S) entstehen<sup>5b)12a)14)</sup>. Darüber soll hier berichtet werden.

Hexapeptide wiederum lassen sich normal zu cyclo-Hexapeptiden cyclisieren, wie an den Beispielen des cyclo-Glycyl-DL-valyl-glycyl-glycyl-DL-valyl-glycins<sup>15)</sup>, Glycyl-glycyl-DL-phenylalanyl-glycyl-glycyl-DL-phenylalanins<sup>12)</sup> und Glycyl-L-leucyl-glycyl-glycyl-L-leucyl-glycins<sup>12)</sup> gezeigt werden konnte.

Bevor weitere Beispiele und eingehendere Untersuchungen vorliegen, ist es noch zu früh, Gründe für die Erscheinung der Verdoppelung bei der Cyclisierung anzugeben. Immerhin seien folgende Punkte festgehalten:

I. Die Tendenz zur Verdoppelungsreaktion scheint bei Peptidderivaten mit ungerader Anzahl von Aminosäureresten besonders gross zu sein. Die Endprodukte (und Übergangszustände) mit zweimal einer ungeraden Anzahl [ $2(2n + 1)$ ,  $n =$  positive ganze Zahl] von Aminosäureresten lassen sich in Konstellationen anordnen, welche der Konformation der «plissierten Schicht entgegengesetzt laufender Polypeptidketten» (antiparallel pleated sheet structure) von PAULING & COREY<sup>16)</sup> gleichen. Eine solche Struktur wurde für kristallisiertes Gramicidin S auf röntgenanalytischem Wege bewiesen<sup>17)</sup>. Es scheint durchaus möglich, dass solche besondere Konstellationen die Verdoppelungsreaktionen begünstigen.

II. Das Vorhandensein von D-Phenylalanin und von L-Prolin dürfte die Ausbildung der für Gramicidin S gefundenen Konstellation (und einer ähn-

<sup>9)</sup> M. WINITZ & J. S. FRUTON, J. Amer. chem. Soc. **75**, 3041 (1953).

<sup>10)</sup> H. BROCKMANN, H. TUMMES & F.-A. v. METZSCH, Naturwissenschaften **41**, 37 (1954).

<sup>11)</sup> P. W. G. SMITH, J. chem. Soc. **1957**, 3985.

<sup>12)</sup> a) R. SCHWYZER, P. SIEBER & B. GORUP, Chimia **12**, 90 (1958) sowie <sup>5b)</sup>. b) R. SCHWYZER & P. SIEBER, Helv. **41**, 2190 (1958); R. SCHWYZER & B. GORUP, Helv. **41**, 2199 (1958). Wie Prof. G. W. KENNER persönlich mitteilte, hat auch er bei Derivaten des Glycyl-L-leucyl-glycins cyclisierende Verdoppelung beobachtet (G. W. KENNER, P. J. THOMSON & J. M. TURNER, J. chem. Soc., im Druck).

<sup>13)</sup> R. SCHWYZER & P. SIEBER, Helv. **40**, 624 (1957).

<sup>14)</sup> R. SCHWYZER, Chimia **12**, 53 (1958).

<sup>15)</sup> TH. WIELAND & K. W. OHLY, Liebigs Ann. Chem. **605**, 179 (1957).

<sup>16)</sup> L. PAULING & R. B. COREY, Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) **39**, 247 (1953).

<sup>17)</sup> G. M. J. SCHMIDT, D. C. HODGKIN & B. M. OUGHTON, Biochem. J. **65**, 744 (1957).

lichen im Übergangszustand der Reaktion von zwei Molekeln Pentapeptid-derivat) erleichtern und damit ebenfalls die Verdoppelung begünstigen<sup>18)</sup>.

III. Ringschlüsse zu cyclischen Tripeptiden dürften durch ungünstige sterische Verhältnisse solcher Makrocyclen (9gliedrige Ringe mit *cis*-Peptidbindungen, sterische Behinderung der «axialen» Wasserstoffatome<sup>18)</sup>) gegenüber solchen zu cyclo-Hexapeptiden (18gliedrige Ringe, *trans*-Peptidbindungen, besondere Konstellationsmöglichkeiten, s. o.) benachteiligt sein<sup>19)</sup>.

Trityl-L-valyl-L-(N<sup>δ</sup>-tosyl)-ornithyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin<sup>13)</sup> und Trityl-L-valyl-L-(N<sup>ε</sup>-tosyl)-lysyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin<sup>1)</sup> wurden mittels Di-(p-nitrophenyl)-sulfid<sup>20)</sup> in ihre p-Nitrophenyl-ester übergeführt. Die Abspaltung der Tritylreste, die Cyclisierung in warmem Pyridin und die Aufarbeitung der cyclischen Reaktionsprodukte erfolgte wie bei den Dekapeptid-Derivaten<sup>13, 15)</sup>. Kristallform, Smp., spezifische Drehung, multiplikative Verteilung und DEBYE-SCHERRER-Diagramme bewiesen die Identität der erhaltenen cyclischen Peptide mit den Ditosylderivaten der cyclo-Dekapeptide Gramacidin S<sup>13)</sup> und bis-homo-Gramacidin S<sup>1)</sup>.

### Experimenteller Teil

*Trityl-Val-Tos-Lys-Leu-Phe-Pro-OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>* (*p*) (L-L-L-D-L): 1,16 g Trityl-Val-Tos-Lys-Leu-Phe-Pro-OH<sup>1)</sup> in 3 ml Pyridin wurden mit 1,9 g Di-(p-nitrophenyl)-sulfid versetzt und ca. 1 Tag bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Gemisch wurde dann mit überschüssiger Citronensäure-Lösung versetzt und 1 Std. bei 0° stehengelassen. Die Fällung wurde in Essigester gelöst, diese Lösung mit Citronensäure-Lösung gewaschen und das Lösungsmittel nach dem Trocknen verdampft. Der Rückstand wurde gut mit Äther-Petroläther 1:2, 1:1 und 2:1 verrieben, wobei er fest wurde. Die Ausbeute betrug 1,21 g (93% d. Th.). Die spektroskopische Gehaltsbestimmung (vgl. <sup>13)</sup>) ergab eine Reinheit von 96,5% (gemessen in einer Lösung von Äthanol+1-n. NaOH 1:1).

*CF<sub>3</sub>COOH, H-Val-Tos-Lys-Leu-Phe-Pro-OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>p* (L-L-L-D-L): 2,33 g Trityl-Val-Tos-Lys-Leu-Phe-Pro-OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>, gelöst in 46 ml Trifluoressigsäure, wurden bei -5 bis -10° langsam mit 46 ml Wasser versetzt. Dabei fiel Triphenylcarbinol aus. Das Gemisch wurde noch 15 Min. bei 0° stehengelassen, dann mittels Aceton-Trockeneis gefroren und im Hochvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde mit Äther-Petroläther 1:2, 1:1 und Äther verrieben, wobei er sofort fest wurde. Ausbeute: 2,03 g (98%).

*Cyclo-(Val-Tos-Lys-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>* (L-L-L-D-L)<sub>2</sub>: 420 mg CF<sub>3</sub>COOH, H-Val-Tos-Lys-Leu-Phe-Pro-OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>, gelöst in 8 ml Dimethylformamid unter Zusatz von 10 Tropfen Eisessig, wurden unter Rühren bei 55° innert 5 Std. in 84 ml Pyridin eingetroppt. Es wurde noch 2 Std. weitergerührt, dann die Lösungsmittel im Vakuum vollständig verdampft und der Rückstand in 150 ml Methanol-Isopropanol-Wasser 1:1:1 gelöst. Diese Lösung wurde, wie bei <sup>1)</sup> beschrieben, durch Ionenaustauscher filtriert und mit 200 ml Lösungsmittel ausgewaschen. Der Rückstand, nach dem Verdampfen des Lösungsmittels, gab nach Umkristallisieren aus Methanol-Wasser 70 mg Rohprodukt. Aus der Mutterlauge konnten nach Chromatographie an Aluminiumoxyd, Elution mit Chloroform und Umkristallisieren aus Methanol-Wasser noch 15 mg Substanz gewonnen werden. Ausbeute roh: 27%. Dieses Produkt wurde über 30 Stufen zwischen Tetrachlorkohlenstoff-Methanol-

<sup>18)</sup> L. PAULING & R. B. COREY, Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) **38**, 86 (1952); J. T. EDWARD, Research **85**, 38 (1955); G. W. KENNER & J. M. TURNER, Chemistry and Ind. **1955**, 602.

<sup>19)</sup> Im Lichte dieser Befunde muss man sich fragen, ob überhaupt eines der bisher beschriebenen «cyclo-Tripeptide» diese Struktur besitzt; sie sollte sich besonders im IR-Spektrum durch Fehlen der Amid-II-Banden erkennen lassen: vgl. R. HUISGEN, H. BRADE, H. WALZ & I. GLOGGER, Chem. Ber. **90**, 1437 (1957).

<sup>20)</sup> B. ISELIN, W. RITTEL, P. SIEBER & R. SCHWYZER, Helv. **40**, 373 (1957).

Wasser 10:9:1 verteilt,  $K = 0,65$ . Die reinen Fraktionen wogen 70 mg (22%) Smp.  $263^\circ$  (Zers.),  $[\alpha]_D^{25} = -225^\circ, -227^\circ \pm 4^\circ$  ( $c = 0,622$  in Eisessig). Trocknen 3 Std.,  $110^\circ$ ,  $10^{-2}$  Torr.

$C_{76}H_{108}O_{14}N_{12}S_2, H_2O$  Ber. C 61,02 H 7,37 S 4,29%  
Gef. „ 60,88 „ 7,46 „ 4,24%

*Trityl-Val-Tos-Orn-Leu-Phe-Pro-OC\_6H\_4NO\_2(p)* (L-L-L-D-L): 450 mg Trityl-L-valyl-L-(N<sup>δ</sup>-tosyl)-ornithyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-prolin<sup>13</sup>) wurden in 1 ml Pyridin mit 300 mg Di-(p-nitrophenyl)-sulfid bei Zimmertemperatur aufbewahrt (ca. 3 Tage). Die Lösung wurde genau gleich wie oben für das entsprechende Lysin-Derivat angegeben aufgearbeitet. Die Ausbeute betrug 450 mg amorphe Verbindung mit einem (spektroskopisch bestimmten) Gehalt (vgl. <sup>13</sup>) von 79% Nitrophenylester.

*Cyclo-(Val-Tos-Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O*: 435 mg des oben beschriebenen, rohen Trityl-Val-Tos-Orn-Leu-Phe-Pro-OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>NO<sub>2</sub>(p) wurden auf übliche Weise mit Trifluoressigsäure-Wasser<sup>13</sup>) von Tritylrest befreit und in das Trifluoressigsäure-Wasser übergeführt. Dieses (340 mg) wurde in 6 ml Dimethylformamid gelöst und im Lauf von  $3\frac{3}{4}$  Std. in 77 ml Pyridin ( $55^\circ$ ) unter Rühren eingetropf. Nach weiteren 2 Std. wurden die Lösungsmittel i. V. verdampft und der Rückstand wie für die Cyclisierung des Dekapeptides beschrieben<sup>13</sup>) aufgearbeitet. Durch Kristallisation aus Methanol-Wasser wurden 88 mg cyclo-(Val-Tos-Orn-Leu-Phe-Pro)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O erhalten: Smp.  $318^\circ$  (Zers.);  $[\alpha]_D^{23} = -191^\circ, -189^\circ \pm 10^\circ$  ( $c = 1$  in Eisessig); DEBYE-SCHERRER-Diagramm vgl. Fig. 1.

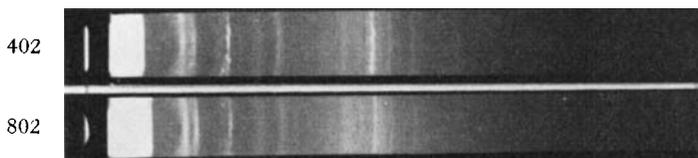


Fig. 1

DEBYE-SCHERRER-Diagramme von Ditosylgramicidin S aus Dekapeptid (402) und aus Pentapeptid (802). Aufnahme mit GUINIER-Kamera,  $\varnothing 214$  mm, Cu-K<sub>α</sub>-Strahlung

Die Analysen wurden in unsern mikroanalytischen Laboratorien unter der Leitung von Dr. H. GYSEL ausgeführt. Die RÖNTGEN-Diagramme verdanken wir Herrn P. D. Dr. H. LABHARDT aus unserem Physikalaboratorium.

#### SUMMARY

Attempts to cyclize the p-nitrophenyl esters of the pentapeptides L-valyl-L-(N<sup>δ</sup>-tosyl)-ornithyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-proline and L-valyl-L-(N<sup>ε</sup>-tosyl)-lysyl-L-leucyl-D-phenylalanyl-L-proline lead to a condensation and cyclization reaction of 2 molecules each of activated esters. The cyclic products are identical with those obtained from the corresponding derivatives of the linear decapeptides.

This kind of doubling reaction during cyclization seems to play a greater rôle in the synthesis of homodetic cyclo-polypeptides than anticipated. The phenomenon might be expected to occur especially well with peptides containing an odd number of amino acid residues.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,  
Pharmazeutische Abteilung