

Naturproduktes) hervorgeht. Dies führt zum Schluss, dass im natürlichen Polymyxin B₁ kein Ring aus 8 Aminosäuren vorhanden ist. Es ist jedoch sehr interessant, dass zwischen den Strukturen 8 α und 8 γ kein wesentlicher Unterschied in der biologischen Aktivität gegen *Brucella bronchiseptica in vitro* festgestellt wurde. In beiden Fällen beläuft sich die Aktivität auf ca. 15% des Naturproduktes.

Analog zu unserer Synthese des Produktes 8 γ ⁴⁾ wurde auch hier zuerst das vollständig geschützte, verzweigte Decapeptid 8 α aufgebaut (Fig. 1, XV).

Dieses konnte aus den beiden Pentapeptiden Ipel-1-5 und 1'-5' zusammengesetzt werden, von denen das letztere Gegenstand unserer 1. Mitteilung²⁾ war. Die Synthese des Pentapeptids Ipel-1-5 geht aus dem Reaktionsschema in Fig. 2⁵⁾ hervor.

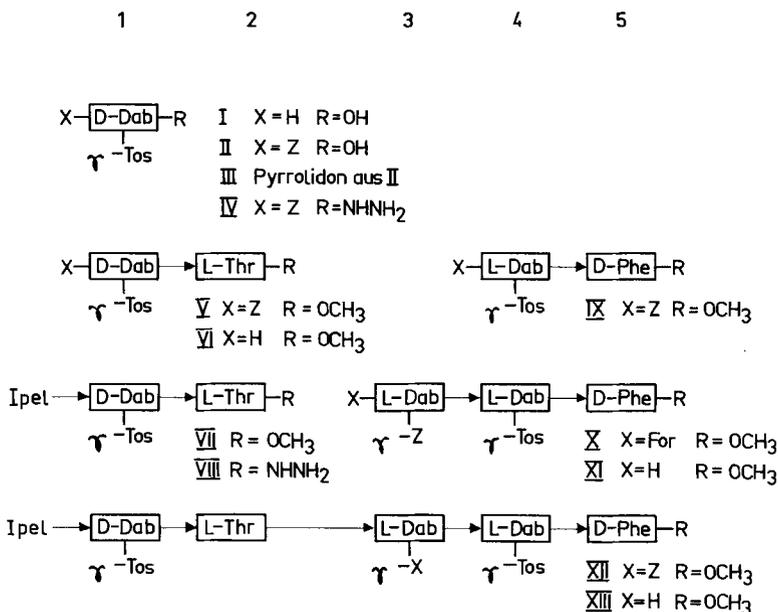


Fig. 2. Synthese des Pentapeptids Ipel-1-5

Das Dipeptid N^z-Z-N^z-Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester (V) wird entweder durch Azidkupplung aus IV oder durch Öffnung des Pyrrolidons III mit L-Threonin-methylester erhalten. Entfernung der N^z-Carbobenzyloxygruppe durch katalytische Hydrierung und Einführung der Isopelargonsäure nach der Säurechloridmethode liefert den Dipeptidester VII, welcher über das Hydrazid und Azid mit dem Tripeptid XI zum Pentapeptid XII verknüpft wird. Die Synthese des Tripeptids X erfolgt über das Dipeptid IX, welches durch Azidkupplung aus N^z-Z-N^z-Tos-L- α , γ -diaminobuttersäure-hydrazid und D-Phenylalanin-methylester erhalten wird. Decarbobenzylierung von IX mit HBr/Eisessig und Einführung der N^z-For-N^z-Z-L- α , γ -diaminobuttersäure nach dem Dicyclohexyl-carbodiimid-Ver-

4) K. VOGLER, P. LANZ, W. LERGIER & R. O. STUDER, *Helv.* 43, 574 (1960); siehe auch K. VOGLER, J. WÜRSCH, R. O. STUDER & P. LANZ, *Chimia* 14, 379 (1960).

5) Über die Abkürzungen vgl. 1. Mitteilung²⁾, Fussnote 9 (Dab = α , γ -Diaminobuttersäure, Ipel = Isopelargonsäure, (+)-6-Methyloctansäure).

fahren liefert X. Die zur Einführung der Seitenkette VIII notwendige α -Amino-Gruppe wird aus X durch Deformylierung in Dimethylformamid mit methanolischer Salzsäure erhalten. Das Pentapeptid XII wird durch katalytische Hydrierung von der N⁷-Carbobenzyloxygruppe in Stellung 3 befreit und mit dem Pentapeptid²⁾ 1'-5' (Fig. 1) entweder nach der Azid- oder Dicyclohexyl-carbodiimid-Methode zum geschützten, verzweigten Decapeptid XV kondensiert. Dieses wird durch Umfällen

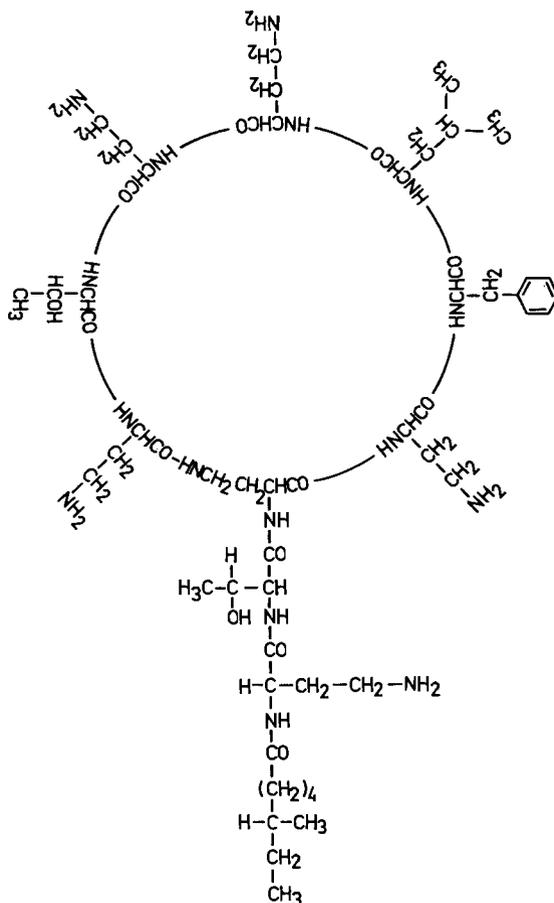


Fig. 3. Das cyclische Decapeptid 8 α

aus Dimethylformamid/Methanol als farbloses Pulver, welches sich bei 244–245° zersetzt, erhalten. Es ist in den meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich, mit Ausnahme von Dimethylformamid, Dimethylsulfoxyd, Eisessig und wasserfreier Trifluoressigsäure. XV wurde neben der Mikroanalyse auch noch durch UV.-Messung charakterisiert. Es wies bei 256 m μ ein ϵ von 1692 auf, während der berechnete Wert aus 3 Z-, 2 Tos- und einem Phenylalanin-Rest für ein Molgewicht von 1774,3 1712 beträgt⁴⁾ (Abweichung 1,3%).

Das geschützte Decapeptid XV (Fig. 1) wird darauf in wasserfreier Trifluoressigsäure gelöst und mit trockener methanolischer Salzsäure zu XVI deformyliert¹⁾. Das

Decapeptid fällt dabei schon nach kurzer Zeit aus, doch genügt die Methode zur vollständigen Freilegung der Aminogruppe in 1'-Stellung, was mit Hilfe der quantitativen Ninhydrinreaktion⁶⁾ bestätigt werden konnte. Es kann allerdings vorkommen, dass die Aminogruppe nicht in einem Arbeitsgang vollständig freigelegt wird. In diesem Fall ist die Reaktion zu wiederholen. Es scheint, dass die Deformylierung mit HCl/Methanol und Dimethylformamid als Lösungsvermittler, wie in einer späteren Mitteilung dargelegt wird, bessere Resultate ergibt. Anschliessend wird die Estergruppe in Dimethylsulfoxyd mit NaOH bei Zimmertemperatur verseift und die Freilegung der Carboxylgruppe unter Bildung von XVII durch Mikrotitration nachgewiesen. Die Cyclisierung von XVII erfolgt in einer stark verdünnten Dimethylformamid/Dioxan-Lösung mit einer 300fachen Menge an Dicyclohexylcarbodiimid¹⁾.

Das nach verschiedentlichem Umfällen erhaltene rohe Cyclisierungsprodukt wurde direkt mit Na in flüssigem NH₃⁷⁾ von den restlichen Schutzgruppen befreit und durch Gegenstromverteilung im System n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (40:10:5:45) gereinigt. Die dabei erhaltene, schon fast reine Substanz wurde mit Hilfe von chromatographischen Verfahren weitergereinigt und konnte in Form eines farblosen Lyophilisates als Pentahydrochlorid isoliert werden.

Der Syntheseweg, das verschiedene chromatographische Verhalten gegenüber dem offenen Decapeptid, die durch quantitative Ninhydrinbestimmung und Chloranalyse bestimmten 5 Aminogruppen und die Abwesenheit von DNP-Leucin nach Dinitrophenylierung und Totalhydrolyse bestätigen die cyclische Struktur 8 α (Fig. 3) des Endproduktes.

Experimenteller Teil⁸⁾

1. *N γ -Tos-D- α , γ -diaminobuttersäure (I)*. *N γ -Tos-D- α , γ -diaminobuttersäure* wird entsprechend der Vorschrift von PODUŠKA & RUDINGER⁹⁾ für das L-Isomere erhalten durch Tosylierung des Cu-Komplexes. Smp. 220–221°, $[\alpha]_D^{21} = -20,8^\circ$ ($c = 6$ in 6N HCl).

C₁₁H₁₆O₄N₂S (272,3) Ber. C 48,52 H 5,92 N 10,29% Gef. C 48,29 H 5,65 N 10,30%

2. *N α -Z-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobuttersäure (II)*. Die *N α -Z-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobuttersäure* wird durch Carbobenzylierung der *N γ -Tos-D- α , γ -diaminobuttersäure* erhalten entsprechend der Vorschrift für die *N α -Z-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobuttersäure*⁹⁾. Smp. 118–119°, $[\alpha]_D^{21,5} = +14,0^\circ$.

C₁₉H₂₂O₆N₂S (406,4) Ber. C 56,15 H 5,46 S 7,88% Gef. C 56,19 H 5,51 S 7,93%

3. *1-Tos-D-3-carbobenzyamino-pyrrolidon-(2) (III)*. Dieses wird wie das entsprechende L-Pyrrolidon dargestellt¹⁰⁾. Smp. 180–181°, $[\alpha]_D^{21} = -6,75^\circ$.

C₁₉H₂₀O₅N₂S (389,37) Ber. C 58,76 H 5,17 N 7,21% Gef. C 58,93 H 5,10 N 7,38%

4. *N α -Z-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobuttersäurehydrasid (IV)*. Das Hydrasid wird dargestellt durch Ringöffnung des Pyrrolidons mit Hydrazin nach der Methode von PODUŠKA & RUDINGER⁹⁾ für die L-Verbindung. Smp. 139–139,5°, $[\alpha]_D^{22} = +5,0^\circ$ ($c = 4$ in Eisessig).

C₁₉H₂₄O₅N₄S (420,4) Ber. C 54,28 H 5,75 N 13,33% Gef. C 54,15 H 5,72 N 13,50%

⁶⁾ Vgl. exper. Teil.

⁷⁾ V. DU VIGNEAUD & O. K. BEHRENS, J. biol. Chemistry 117, 27 (1937).

⁸⁾ Die Smp. wurden auf einem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Die Drehungen wurden, wenn nichts anderes angegeben, in Dimethylformamid bei $c = 2$ bestimmt. Fehlergrenze $\pm 2^\circ$. Die Analysenmuster wurden 18 Std. über P₂O₅ bei 0,01 Torr und, wenn nichts besonderes angegeben, bei 110° getrocknet.

⁹⁾ K. PODUŠKA & J. RUDINGER, Coll. Czech. Chem. Commun. 24, 3449 (1959).

5. *N α -Z-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester (V)*. – a) *Durch Azidkupplung*¹⁰⁾: 21 g (0,05 Mol) *N α -Z-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobuttersäurehydrazid (IV)* werden in 200 ml 60-proz. Essigsäure und 36,6 ml 3*N* HCl (0,11 Mol) gelöst, mit 200 ml Äther überschichtet und auf -10° gekühlt. 3,56 g (0,051 Mol) Natriumnitrit in 10 ml Wasser werden portionenweise zugeben und anschliessend wird noch 5 Min. bei -10° gerührt. Die ätherische Azidlösung wird 3mal mit kalter, gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und zu einer vorgekühlten Lösung von 7,2 g (0,055 Mol) *L*-Threonin-methylester²⁾ in 100 ml Dioxan-Äther (1:1) filtriert. Nach Zugabe von 30 ml Eisessig wird die Reaktionslösung über Nacht im Eiskasten aufbewahrt und darauf zur Trockne eingedampft. Der sirupartige Rückstand wird in Essigester aufgenommen und der Reihe nach mit Wasser, 5-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser, 1*N* HCl und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und zur Trockne verdampft. Aus Essigester/Äther wird ein kristallisiertes Produkt erhalten. Ausbeute 17 g (65%), Smp. 157–158°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +4,25^{\circ}$. Zur Analyse wurde nochmals aus Essigester/Äther umkristallisiert. Smp. 157–158°, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +4,25^{\circ}$.

$\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{O}_8\text{N}_3\text{S}$ (521,57) Ber. C 55,26 H 5,99 N 8,05% Gef. C 55,53 H 5,81 N 8,35%

b) *Durch Öffnung des Pyrrolidonringes*⁹⁾: 3,8 g (0,01 Mol) *1-Tos-D-3-carbobenzoxycarboxyaminopyrrolidon-(2) (III)* werden mit 2,7 g (0,02 Mol) *L*-Threonin-methylester und 3,6 ml Nitromethan 1 Std. auf 100° unter Rückfluss erhitzt, wobei eine klare Lösung entsteht. Nach dem Abkühlen wird mit Essigester verdünnt und mit Wasser, 5-proz. Natriumhydrogencarbonat, Wasser, 1*N* HCl und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und zur Trockne verdampft. Die Kristallisation erfolgt aus Essigester/Äther. Ausbeute 3,2 g (30% bezogen auf *L*-Threonin-methylester). Smp. 148–150°. Durch nochmalige Umkristallisation steigt der Smp. auf 155–156°.

6. *N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester-hydrochlorid (VI)*. 40 g (0,077 Mol) des Dipeptidesters V werden in 500 ml Methanol und 12,8 ml (0,077 Mol) 6*N* HCl gelöst und mit 5-proz. Pd-Kohle hydriert. Nach der Hydrierung wird vom Katalysator abfiltriert, mit Methanol nachgewaschen und das Filtrat bei 40° im Vakuum eingedampft. Das Produkt wird aus Methanol/Äther umgefällt. Ausbeute 30 g (92%), $[\alpha]_{\text{D}}^{21,5} = -29,3^{\circ}$, ϵ bei 257 $m\mu = 463$ (52,15 mg%, Feinsprit), ϵ ber. = 452. Das Analysenmuster wurde aus Dioxan kristallin mit 1 Mol Lösungsmittel erhalten. Smp. 122–123°.

$\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{N}_3\text{ClS}$, $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ Ber. C 46,90 H 6,69 N 8,21 Cl 6,92%
(512,02) Gef. „ 46,95 „ 6,49 „ 8,20 „ 7,02%

7. *N α -Isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester (VII)*. 4,6 ml Iso-pelargonsäure¹¹⁾ (0,025 Mol) werden in 160 ml abs. Äther gelöst und mit 16 ml Thionylchlorid (0,31 Mol) 1 Std. unter Rückfluss erwärmt. Darauf wird zur Trockne verdampft. Der sirupartige Rückstand wird in 40 ml Dioxan gelöst und zu einer gekühlten Lösung von 9,6 g (0,023 Mol) *N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester-hydrochlorid (VI)* in 80 ml Dioxan und 6,28 ml (0,046 Mol) Triäthylamin gegeben. Die Reaktionsmischung wird 5 Std. bei Zimmer-temperatur geschüttelt; darauf wird das Dioxan durch Essigester ersetzt. Die Essigesterlösung wird mit Wasser, 1*N* NH_3 , Wasser, 1*N* HCl und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Die aus Essigester/Äther kristallisierende Substanz wird aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 8,2 g (62%), Smp. 133–134°, $[\alpha]_{\text{D}}^{22,5} = +28,7^{\circ}$.

$\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$ (527,65) Ber. C 56,90 H 7,83 N 7,96% Gef. C 57,25 H 7,57 N 7,93%

8. *N α -Isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-hydrazid (VIII)*. 1 g Dipeptid-ester VII wird in 5 ml Methanol gelöst und mit 0,5 ml Hydrazinhydrat versetzt. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Dann wird das entstandene Gel mit Wasser verrieben, filtriert und mit viel Wasser gewaschen. Das Hydrazid wird aus Methanol/Wasser umgefällt. Ausbeute 0,8 g (80%), Smp. 184–185°, $[\alpha]_{\text{D}}^{21} = +17,15^{\circ}$.

$\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{O}_6\text{N}_5\text{S}$ (527,66) Ber. C 54,62 H 7,83 N 13,27% Gef. C 54,76 H 7,61 N 13,43%

9. *N α -Z-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (IX)*. 38 g (0,09 Mol) *N α -Z-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobuttersäurehydrazid* werden in 396 ml 60-proz. Essigsäure und 31 ml 6*N* HCl gelöst, mit 500 ml Äther versetzt und auf -10° gekühlt. Langsam werden 6,9 g (0,1 Mol) Natriumnitrit in 30 ml Wasser zugegeben, worauf die Reaktionsmischung noch 5 Min. auf -10°

¹⁰⁾ K. PODUŠKA & J. RUDINGER, Coll. Czech. Chem. Commun. 22, 1283 (1957).

¹¹⁾ K. VOGLER & L. H. CHOPARD-DIT-JEAN, Helv. 43, 280 (1960).

gehalten wird. Die ätherische Azidlösung wird mit kalter, gesättigter Kochsalzlösung 3mal gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und zu einer auf -10° gekühlten Lösung von 19,4 g (0,108 Mol) D-Phenylalanin-methylester⁴⁾ in 100 ml Dioxan/Äther (1:1) filtriert. Nach Zugabe von 45 ml Eisessig wird die Lösung über Nacht im Eiskasten aufbewahrt. Nach dem Eindampfen wird der ölige Rückstand in Essigester aufgenommen, mit Wasser, 5-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser, 1N HCl und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Die Kristallisation erfolgt unter Petroläther. Das Dipeptid wird aus Essigester/Äther/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute 32,8 g (64%). Zur Analyse wird nochmals aus Essigester/Äther/Petroläther umkristallisiert. Smp. 158–159°, $[\alpha]_D^{21} = +8,7^\circ$ ($c = 3$ in DMF).

$\text{C}_{29}\text{H}_{33}\text{O}_7\text{N}_3\text{S}$ (567,64) Ber. C 61,36 H 5,86 N 7,40% Gef. C 61,29 H 5,57 N 7,37%

10. *N α -For-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (X)*. 30 g (0,053 Mol) Dipeptidester IX werden mit 50 ml HBr/Eisessig 1 Std. bei Raumtemperatur geschüttelt. Darauf wird das Hydrobromid mit Äther ausgefällt, die überstehende Lösung abgesaugt und durch frischen Äther ersetzt. Dieser Waschprozess wird noch 4mal wiederholt. Darauf wird der restliche Äther im Wasserstrahlvakuum entfernt, der Rückstand in 100 ml Eiswasser gelöst, das pH mit konz. NH_3 auf 10–11 gestellt und der freie Dipeptidester mit Essigester extrahiert. Die Essigesterlösung wird 2mal mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Ausbeute 21,2 g (92%) Öl.

Dieses Öl wird direkt mit *N α -For-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure* in Dimethylformamid mit Hilfe von Dicyclohexyl-carbodiimid zum Tripeptid X gekuppelt⁴⁾.

11. *N γ -Z-L- α , γ -Diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (XI) als Hydrochlorid*. 3 g (0,0043 Mol) Tripeptid X werden in 30 ml Dimethylformamid gelöst, in Eis gekühlt und mit 60 ml 4N HCl/Methanol versetzt. Die Lösung wird 24 Std. bei Raumtemperatur aufbewahrt und darauf bei 40° zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird mit Eiswasser versetzt und die Substanz mit Essigester extrahiert. Die Essigesterlösung wird 2mal mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird noch 1mal mit 20 ml 4N HCl/Methanol verdampft, darauf noch 2mal in Methanol gelöst und wieder eingedampft. Die Substanz wird aus Essigester/Äther gefällt. Ausbeute 2,4 g (75%). $[\alpha]_D^{21,5} = +15,3^\circ$.

$\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{O}_8\text{N}_5\text{ClS}$ (704,2) Ber. C 56,28 H 6,01 Cl 5,03% Gef. C 56,57 H 5,85 Cl 4,74%

12. *N α -Isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (XII)*. 5,27 g (0,01 Mol) Dipeptidhydrazid VIII werden in 100 ml 60-proz. Essigsäure und 7 ml (0,021 Mol) 3N HCl gelöst und mit 200 ml Äther überschichtet. Die auf -10° gekühlte Lösung wird portionenweise mit 0,76 g (0,011 Mol) Natriumnitrit in 5 ml Wasser versetzt und 5 Min. bei -10° gerührt. Nach Abtrennung der ätherischen Azidlösung wird diese mit kalter 5-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung und kaltem Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und zu einer vorgekühlten Lösung von 7,04 g (0,01 Mol) XI in 30 ml Dimethylformamid und 1,38 ml (0,01 Mol) Triäthylamin gegeben. Die Reaktionsmischung wird über Nacht im Eiskasten aufbewahrt, darauf vom Äther befreit und mit Wasser versetzt. Die erstarrte Masse wird abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das Pentapeptid wird aus Eisessig/Wasser umgefällt. Ausbeute 7,7 g (66%). Smp. 226–227°. $[\alpha]_D^{23,5} = +3,0^\circ$.

$\text{C}_{57}\text{H}_{78}\text{O}_{14}\text{N}_8\text{S}_2$ (1163,38) Ber. C 58,84 H 6,75 N 9,63% Gef. C 58,75 H 6,66 N 9,52%

13. *N α -Isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (XIII), als Hydrochlorid*. 1 g Pentapeptid XII wird in 40 ml Eisessig und 5 ml Wasser gelöst und über Pd-Kohle hydriert. Nach Beendigung der Hydrierung wird vom Katalysator abfiltriert und das reduzierte Pentapeptid durch Ausrühren in eiskalte 1N HCl gefällt, filtriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Es wird nochmals aus Methanol/1N HCl umgefällt. Ausbeute 0,7 g (80%), Smp. 226–227°, ϵ bei 257 $m\mu = 1130$ (19,7 mg%, Feinsprit), ϵ ber. = 1091, $[\alpha]_D^{23,5} = +2,05^\circ$.

$\text{C}_{49}\text{H}_{73}\text{O}_{12}\text{N}_8\text{ClS}_2$ (1065,71) Ber. C 55,22 H 6,90 Cl 3,32% Gef. C 54,96 H 6,78 Cl 3,21%

14. *For-L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäurehydrazid (XIV)*. 4,9 g (0,005 Mol) For-L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester²⁾ werden in 20 ml

Dimethylformamid gelöst, mit 2,5 ml (0,05 Mol) Hydrazinhydrat versetzt und über Nacht bei 20° aufbewahrt. Das Hydrazid wird mit Eiswasser gefällt, nach der Erstarrung filtriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Es wird nochmals aus Dimethylformamid/Wasser umgefällt, filtriert, mit Wasser und Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 4,1 g (85%). Smp. 230–231°, $[\alpha]_D^{21} = -26^\circ$.

$C_{47}H_{84}O_{13}N_{10}$ (977,06) Ber. C 57,77 H 6,60 N 14,33% Gef. C 57,44 H 6,71 N 14,43%

15. *N α -Isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -[For-L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (XV).* – a) Mit Dicyclohexylcarbodiimid: 2,12 g (0,002 Mol) XIII werden in 5 ml Dimethylformamid gelöst und mit 0,28 ml (0,002 Mol) Triäthylamin versetzt. Darauf wird eine Lösung von 1,92 g (0,002 Mol) For-L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure²⁾ in Dimethylformamid zugegeben, auf –10° gekühlt und 0,62 g (0,003 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wird 24 Std. im Eiskasten aufbewahrt, darauf mit 1 ml Eisessig versetzt und 1 Std. bei Raumtemperatur belassen. Nach Filtration wird mit 150 ml Äthanol versetzt und 4 Std. in Eis aufbewahrt, worauf der gelartige Niederschlag filtriert und mit Alkohol und Äther gewaschen wird. Das Decapeptid wird noch einmal aus Dimethylformamid/Methanol umgefällt. Ausbeute 0,9 g (23%). Smp. 244–245°. $[\alpha]_D^{20,5} = -11,2^\circ$; ϵ bei 257 $\mu = 1692$ (99,1 mg %, Eisessig), ϵ ber. = 1712⁴⁾.

$C_{96}H_{132}O_{25}N_{16}S_2$ Ber. C 58,39 H 6,73 N 11,35 S 3,24%
(1974,26) Gef. „ 58,11 „ 6,58 „ 10,98 „ 3,31%

b) *Durch Azidkupplung:* 1,95 g (0,002 Mol) For-L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäurehydrazid (XIV) werden in 60 ml 60-proz. Essigsäure und 1,4 ml (0,0042 Mol) 3N HCl gelöst, auf –10° gekühlt und mit 138 mg (0,002 Mol) Natriumnitrit in 5 ml Wasser versetzt. Nach 10 Min. Rühren bei –10° wird das Azid mit Eiswasser ausgefällt, abfiltriert, mit Eiswasser, kalter 5-proz. Natriumhydrogencarbonatlösung und Eiswasser gewaschen und scharf abgepresst. Darauf wird es in eine Lösung von 2,06 g (0,002 Mol) Pentapeptidesterbase in 20 ml Dimethylformamid und 0,12 ml Eisessig eingetragen und die Mischung in der Kälte bis zur vollständigen Lösung geschüttelt. Das Reaktionsprodukt wird darauf über Nacht im Eiskasten aufbewahrt. Das entstandene Gel wird mit ca. 100 ml Äthanol versetzt, 1 Std. in Eis gekühlt und darauf filtriert, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Nach nochmaliger Umfällung aus Dimethylformamid/Alkohol erhält man 1,65 g XV (42%). Smp. 245–246°. ϵ bei 257 $\mu = 1661$ (101 mg %, Eisessig), ϵ ber. = 1712⁴⁾, $[\alpha]_D^{25} = -10,3^\circ$.

16. *N α -Isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -[L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (XVI) (durch Deformylierung von XV).* 0,9 g Formyl-decapeptid-methylester XV werden in 20 ml wasserfreier Trifluoressigsäure gelöst, bei 0° im Abstand von 10 Min. 2mal mit je 10 ml, 14 Tage bei 20° aufbewahrter 4N methanolischer Salzsäure versetzt und diese Mischung 20 Std. bei 20° geschüttelt. Hierbei bildet sich schon nach kurzer Zeit ein Niederschlag. Die Mischung wird bei 25° im Wasserstrahlvakuum vom Lösungsmittel befreit und mehrmals mit frischem Methanol abgedampft. Der weisse Trockenrückstand wird in 20 ml Dimethylformamid gelöst, filtriert, bei 0° mit Triäthylamin auf ein pH von 9 eingestellt und in 500 ml eiskalte 1N Natriumchloridlösung ausgerührt. Nach 15 Min. wird die Fällung abgenutscht, mit viel Wasser gewaschen und bei 50° im Wasserstrahl- und Hochvakuum getrocknet. Ausbeute 0,6 g. Der Ninhydrinwert entspricht 1,13 NH₂-Gruppen. Wenn der Wert der Ninhydrinbestimmung zu tief ausfällt, muss die Deformylierung wiederholt werden.

17. *N α -Isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -[L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin (XVII) (durch Verseifung der Estergruppe von XVI).* 4,2 g (0,0022 Mol) Decapeptidester XVI werden in 40 ml Dimethylsulfoxyd gelöst, mit 4 ml (0,004 Mol) 1N Natronlauge versetzt und 20 Std. unter Verschluss bei 20° stehengelassen. Darauf wird mit Eisessig auf pH 6 eingestellt und durch Einrühren in 1 l 1-proz. Natriumchloridlösung gefällt. Der Niederschlag wird abgenutscht, mit Wasser und Äther gewaschen und getrocknet. Die Substanz wird noch einmal aus Dimethylformamid mit 1-proz. Natrium-

chloridlösung gefällt, filtriert, mit Wasser und Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 3,7 g. Aus der Mikrotitration werden 1,0 COOH-Gruppen errechnet. Smp. 219–220°.

18. *Cyclisierung von XVII*. 3,7 g (1,9 mMol) Decapeptid XVII werden in 4,1 l Dimethylformamid und 18,5 l Dioxan gelöst und mit einer Lösung von 148 g Dicyclohexyl-carbodiimid¹⁾ in 600 ml Dimethylformamid versetzt. Diese Lösung wird 72 Std. bei 20° aufbewahrt. Darauf wird mit 155 ml 50-proz. Essigsäure versetzt, das Dioxan im Wasserstrahlvakuum bei 40° entfernt und anschliessend im Hochvakuum auf 500 ml konzentriert. Vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff wird abgenutscht und das Filtrat zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in 200 ml Dimethylformamid gelöst, von einer weiteren Menge Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und erneut im Hochvakuum bei 40° zur Trockne verdampft. Dieser Prozess wird nochmals wiederholt. Darauf wird in 100 ml Dimethylformamid gelöst und mit 1 l Äther/Petroläther 2:1 gefällt, filtriert, mit Äther gewaschen, wiederum in 50 ml Dimethylformamid gelöst, von einer Spur Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und neuerdings mit Äther ausgefällt, filtriert, mit Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 2,6 g (Rohprodukt).

19. *Entfernung der Schutzgruppen*. 2,6 g Rohprodukt aus der Cyclisierung werden in 500 ml flüssigem Ammoniak mit 0,65 g Natrium reduziert⁷⁾ (bis zu einer 20 Min. bestehenden Blaufärbung); die blaue Farbe wird durch Ammoniumchlorid zerstört, das Ammoniak verdampft und der Rückstand 30 Min. bei 25° im Wasserstrahlvakuum entgast. Der Rückstand wird in 50 ml Eiswasser gelöst, bei 0° mit 6N HCl auf pH 6 eingestellt, filtriert und das Filtrat lyophilisiert. Es verbleiben 5 g Rohprodukt mit einer Aktivität von 113 E/mg gegen *Brucella bronchiseptica* ATCC 4617¹²⁾.

20. *Reinigung des Cyclisierungsproduktes*. – a) *Durch Gegenstromverteilung*: Das Rohprodukt (5 g entsprechend ca. 565 000 Einheiten) wurde einer multiplikativen Verteilung über 178 Stufen im System n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (40:10:5:45) unterworfen; dabei wurden die Hauptmengen Salz und offenes Decapeptid abgetrennt (vgl. Fig. 4).

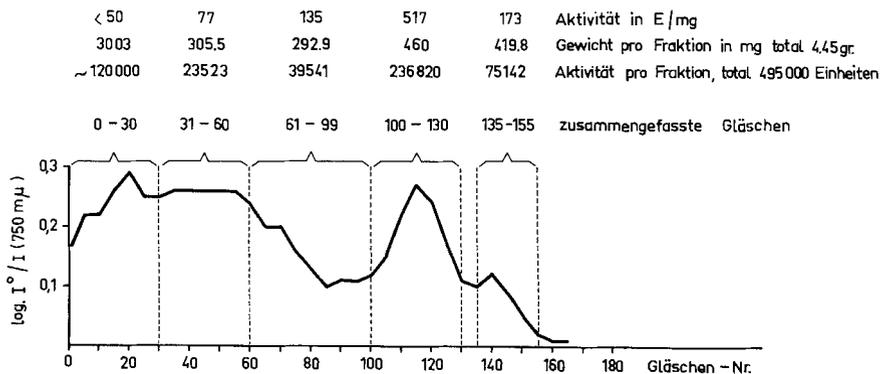


Fig. 4. *Gegenstrom-Verteilung des Cyclisierungs-Rohproduktes* System n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (40:10:5:45); 178 Stufen 5 g oder 565 000 Einheiten

Die Verteilungskurve erhielten wir durch Umsetzen von je 0,2 ml unterer Phase mit FOLIN-DENIS-Reagens und Bestimmung der optischen Dichten bei 750 m μ ¹⁴⁾. Die Verteilung wurde zudem papierchromatographisch kontrolliert (Laufmittel siehe unten). Die vereinigten Gläscheninhalte 100–130 wurden im Hochvakuum bei 20° konzentriert und anschliessend lyophilisiert.

¹²⁾ Die Bestimmungen der mikrobiologischen Aktivität wurden in unserer mikrobiologischen Abteilung – unter der Leitung von Prof. B. FUST und Dr. ERIKA BÖHNI – im Plattentest mit *Brucella bronchiseptica* ATCC 4617¹³⁾ gegen USP-Polymyxin-Standard *in vitro* (7850 E/mg) durchgeführt.

¹³⁾ R. G. BENEDICT & F. H. STODOLA, Ann. New York Acad. Sciences 51, 866 (1949).

¹⁴⁾ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & ROSE J. RANDALL, J. biol. Chemistry 193, 265 (1951).

Nach 2maligem Lyophilisieren erhält man 460 mg eines farblosen, lockeren Pulvers mit einer Aktivität von 517 E/mg gegen *Brucella bronchiseptica* ATTC 4617.

b) *Durch Ionenaustauschchromatographie*: Der schwach saure Kationenaustauscher Amberlite IRC-50 XE 64 gelangt in seiner H-Ionen-Form zur Verwendung. Das Peptid (240 mg) wurde als wässrige Lösung (pH 6–6,5) auf die Säule (15 × 120 mm) gebracht, diese zuerst mit Wasser, anschliessend mit 200 ml 2,5-proz. Essigsäure und darauf mit gleich viel Wasser gewaschen, das Peptid mit 0,1N HCl eluiert und sofort lyophilisiert (80 mg farbloses, lockeres Pulver).

c) *Durch Säulenchromatographie*: Verwendet wurde Cellulosepulver WHATMAN Nr. 1 «standard grade», welches durch gründliches Waschen mit Entwicklerflüssigkeit von löslichen Bestandteilen befreit wurde. Eluiert wurde mit n-Butanol, gesättigt mit 15-proz. Essigsäure, mit einem Durchfluss von 12 ml pro Std. bei einer Säulendimension von 18 × 250 mm. Die Eluate wurden mit einem Fraktionensammler (Firma HÖSLI, Bischofszell) in 1 ml-Fractionen unterteilt und laufend mittels der Ninhydrinreaktion kontrolliert; die Reinheit der positiven Fraktionen konnte durch Dünnschicht- und Papierchromatographie geprüft werden. Die ersten Ninhydrin-positiven Fraktionen enthielten die Hauptmenge des Cyclisierungsproduktes und wurden direkt lyophilisiert.

d) *Umfällen über die freie Base*: Die lyophilisierte Säulenhauptfraktion (ca. 60 mg) wurde in wenig Wasser gelöst. In die Lösung wurde unter Eis-Kochsalz-Kühlung NH_3 bis zur bleibenden Fällung eingeleitet. Nach 4 Std. Stehen unter Verschluss bei 0° wurde zentrifugiert, die Fällung 3mal mit wenig Eiswasser gewaschen, in Wasser suspendiert und lyophilisiert. Nach 2maligem Wiederholen der Gefriertrocknung wurde die Base in 0,1N HCl gelöst und als Hydrochlorid lyophilisiert (ca. 45 mg).

Die *analytische Charakterisierung* des Endproduktes ist in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

Unser totalsynthetisches Cyclisierungsprodukt 8α enthält noch etwas NaCl, was durch Vorhandensein eines Verbrennungsrückstandes und einer Differenz zwischen ionogenem und durch Verbrennung gefundenem Chlor eruiert wurde. Drehung, Chloranalyse und mikrobiologische Aktivität wurden auf das NaCl-freie und bei 100° im Hochvakuum getrocknete Produkt umgerechnet.

Analytische Charakterisierung des Endproduktes

<i>Charakterisierung</i>	<i>Cyclisierungsprodukt 8α</i>	<i>Polymyxin B_1</i>
1. Papierchromatographie	Rf = 0,54	Rf = 0,52
2. Dünnschichtchromatographie	scharf begrenzter Hauptfleck; schwach weiter wandernd als Polymyxin B_1	siehe 8α
3. Hochspannungs-Papierelktrophorese	einheitlich; Wanderstrecke ca. 10,1 cm	einheitlich; Wanderstrecke ca. 10,7 cm
4. Chloranalyse	12,48%	12,65%
5. Freie Aminogruppen nach Ninhydrin-Bestimmung	4,9 ± 10%	5,0
6. Spezifische Drehung $[\alpha]_D^{25}$	- 57,7° ± 1° (0,58, Wasser)	- 85,1° ¹⁾
7. IR.-Spektrum	identisch mit dem von B_1	identisch mit dem von 8α
8. Totalhydrolyse-Aminosäureverhältnis	Dab Thr Phe Leu 6,0 2,06 0,78 1,08	Dab Thr Phe Leu 6,0 2,0 1,0 1,0
9. Dinitrophenylierung und Hydrolyse des DNP-Peptides	kein DNP-Leu	kein DNP-Leu
10. Mikrobiologische Aktivität ¹²⁾ <i>in vitro</i>	ca. 800 E/mg	5200 E/mg

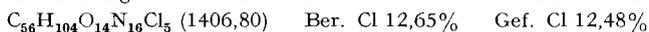
Erläuterungen zur Tabelle

1. Die Papierchromatographie wurde auf SCHLEICHER & SCHÜLL-Papier 2043b mgl, 15 Std. absteigend, bei ca. 25° im Laufmittel n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24 durchgeführt. Aufgetragen wurden in der Regel 20 µg in 2 µl. Die Entwicklung erfolgte durch Besprühen mit einer 0,5-proz. alkoholischen Ninhydrinlösung und kurzes Erhitzen auf 100°.

2. Die Herstellung der Kieselggl-Platten und die Arbeitstechnik entsprechen den Originalangaben von STAHL¹⁵⁾. Als Laufmittel diente das gleiche Gemisch wie bei der Papierchromatographie. Die Laufzeit betrug 2–3 Std.; aufgetragen wurden ca. 5 µg in 1 µl.

3. Wir benutzten den Hochspannungs-Pherographen nach WIELAND & PFLEIDERER¹⁶⁾ der Firma L. HORMUTH, Heidelberg. Arbeitsbedingungen: Papier: SCHLEICHER & SCHÜLL 2043b mgl; Elektrolyt: 2 N Essigsäure (pH ca. 2,5); Feldstärke: 65 V · cm⁻¹; Versuchsdauer: 40 Min.; Kammer-temperatur: +1 bis +3°.

4. Die Chloranalyse sowie alle übrigen Mikroanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung unter der Leitung der Herren Drs. H. WALDMANN und A. DIRSCHERL ausgeführt.



5. Zur Ermittlung der Anzahl freier Aminogruppen wurde das für Aminosäure-Bestimmungen viel gebrauchte Ninhydrin-Hydrindantin-Reagens pH 4,7 (s. z. B. R. A. BOISSONNAS¹⁷⁾) verwendet; als Vergleichssubstanzen wurden Polymyxin B₁ und Leu mitbestimmt. Dabei wurde in Übereinstimmung der Theorie beobachtet, dass Polymyxin B₁ (5 γ-NH₂-Gruppen) eine gegenüber freiem Leu 5mal stärkere Farbausbeute ergab.

6. Die Drehungsmessungen wurden zum Teil in einem photoelektrischen Polarimeter mit Thermostat, das in unserer physikochemischen Abteilung durch Dr. F. BURKHARDT entwickelt wurde, aufgenommen.

7. Die Verteilungen wurden in der automatischen 200stufigen Batterie (je 25 ml obere und untere Phase) nach von METZSCH¹⁸⁾ (Firma H. KÜHN, Göttingen) durchgeführt.

8. Die IR.-Spektren wurden von Dr. L. H. CHOPARD-DIT-JEAN in Kaliumbromid (1 mg Substanz in 300 mg KBr) mit einem Infrarotspektrophotometer Marke PERKIN-ELMER Mod. 21 aufgenommen.

9. Zur Totalhydrolyse wurden 2 mg Cyclisierungsprodukt in 1 ml 5,7N HCl gelöst (Pyrex-Bombenröhrchen) und eingefroren. Das Röhrchen wurde evakuiert, mit Stickstoff begast, zugeschmolzen und 24 Std. auf 110° erhitzt. Nach Entfernung der Salzsäure löste man das Hydrolysat in 0,1 ml Wasser und trug 5–10 µl 2,5 cm breit auf die Startlinie eines Chromatographie-Papieres auf, ebenso entsprechende Mengen einer Vergleichslösung, enthaltend Dab/Thr/Phe/Leu im Molverhältnis 6:2:1:1. Chromatographiert wurde über Nacht im Laufmittel n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1. Die Auswertung erfolgte nach Entwickeln mit Ninhydrin-Kupfer-Reagens durch direktes Photometrieren der gefärbten Banden im Densitometer¹⁹⁾.

10. 2 µMol Cyclisierungsprodukt wurden nach SANGER²⁰⁾ dinitrophenyliert und das DNP-Peptid in 5,7N HCl totalhydrolysiert. Die extrahierten DNP-Aminosäuren wurden durch Dünnschichtchromatographie in n-Butanol, gesättigt mit 0,1-proz. Ammoniak, mit Hilfe krist. Reinpräparate von DNP-Leu und γ-DNP-Dab identifiziert.

SUMMARY

The cyclic decapeptide 8α, another of the four possible structures deduced for the natural polymyxin B₁ by the usual degradation methods, has been synthesized. It appears not to be identical with polymyxin B₁ in view of its reduced antibacterial activity *in vitro*.

Chemische Forschungsabteilung der
F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel

¹⁵⁾ E. STAHL, Arbeitsvorschrift für Dünnschichtchromatographie, herausgegeben von der Firma C. DESAGA, GmbH, Heidelberg.

¹⁶⁾ TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* 67, 257 (1955).

¹⁷⁾ R. A. BOISSONNAS, *Helv.* 33, 1975 (1950).

¹⁸⁾ F. A. v. METZSCH, *Chemie-Ing. Techn.* 25, 66 (1953).

¹⁹⁾ K. RÖWE, E. FERBER & H. FISCHER, *Z. physiol. Chem.* 313, 174 (1958).

²⁰⁾ F. SANGER, *Biochem. J.* 39, 507 (1945).