

316. Synthesen in der Polymyxin-Reihe

8. Mitteilung¹⁾

Synthese des hochaktiven cyclischen Decapeptides 7 γ und sein Vergleich mit natürlichem Polymyxin B₁

von K. Vogler, R. O. Studer, P. Lanz, W. Lergier, E. Böhni und B. Fust

(5. X. 63)

Auch in der Peptid-Chemie gilt der Grundsatz, dass die Struktur eines Naturproduktes erst dann gesichert ist, wenn diese durch Synthese bewiesen wurde. Diese Tatsache gilt nicht nur für Bradykinin²⁾ und die Enniatine³⁾, sondern auch in der Polymyxin-Reihe, da hier die Struktur-Ermittlung durch chemischen Abbau von Polymyxin B₁ nur bis zu einer Stufe von vier möglichen Isomeren⁴⁾ vorange-trieben werden konnte. Die Synthese stellt somit bei diesem Problem ein wesent-liches Element der Struktur-Ermittlung dar.

Wir haben deshalb vor einigen Jahren die Struktur-Aufklärung des Polymyxins B₁ synthetisch in Angriff genommen, da uns die experimentellen Fortschritte der Peptid-Synthese dazu genügend weit entwickelt erschienen. Diese Bemühungen haben uns allerdings länger aufgehalten, als ursprünglich vorgesehen war, indem es sich als nötig erwies, alle vier möglichen isomeren cyclo-Decapeptide, die wir nach Anzahl der Aminosäuren im Ring und nach Art der Verknüpfung der Seitenkette (α - oder γ -Stellung des Diaminobuttersäurerestes an der Verzweigungsstelle) mit 8 α , 8 γ , 7 α und 7 γ bezeichnet haben⁵⁾, synthetisch zu gewinnen. Es fanden sich während der Arbeit auch keine Anhaltspunkte, die erlaubt hätten, die Struktur des Naturproduktes nach der Synthese des ersten oder zweiten Isomeren zu erraten.

Unsere synthetischen Bemühungen ergaben nun das unerwartete Ergebnis, dass sich keines der vier Syntheseprodukte, obwohl z. T. *in vitro* und *in vivo* mikrobiolo-gisch sehr aktiv, mit natürlichem Polymyxin B₁ identifizieren liess.

1) 7. Mitteilung: R. O. STUDER, W. LERGIER & K. VOGLER, *Helv.* **46**, 612 (1963); Dab = α, γ -Diaminobuttersäure, Ipel = Isopelargonsäure, Tos = Tosyl, Z = Benzyloxycarbonyl.

2) D. F. ELLIOTT, G. P. LEWIS & E. HORTON, *Biochem. J.* **74**, 15 P (1959); D. F. ELLIOTT, G. P. LEWIS & E. HORTON, *Biochem. biophys. Res. Comm.* **3**, 87 (1960); R. A. BOISSONNAS, St. GUTTMANN, P. A. JAQUENOUD, H. KONZETT & E. STÜRMER, *Experientia* **16**, 326 (1960); R. A. BOISSONNAS, St. GUTTMANN & P. A. JAQUENOUD, *Helv.* **43**, 1349 (1960).

3) M. M. SHEMYAKIN, Yu. A. OVCHINNIKOW, A. A. KIRYUSHKIN & V. T. IVANOV, *Tetrahedron Letters* **1962**, 301, No. 7; Pl. A. PLATTNER, K. VOGLER, R. O. STUDER, P. QUITT & W. KELLER-SCHIERLEIN, *Helv.* **46**, 927 (1963); P. QUITT, R. O. STUDER & K. VOGLER, *Helv.* **46** 1715 (1963).

4) W. HAUSMANN, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 3663 (1956); G. BIZERTE & M. DAUTREVAUX, *Bull. Soc. Chim. biol.* **39**, 795 (1957).

5) K. VOGLER, R. O. STUDER, W. LERGIER & P. LANZ, *Helv.* **43**, 1751 (1960).

1. Synthese des Cyclopeptides 7 γ

Nachfolgend soll der Aufbau des Cyclopeptides 7 γ X (Fig. 3) im Detail erläutert werden in Anlehnung an die Beschreibung der cyclischen Decapeptide 8 γ ⁵⁾, 8 α ⁶⁾ und 7 α ⁷⁾.

X konnte auf zwei leicht abgeänderten Wegen aus den Bruchstücken I, II und V erhalten werden, indem nach dem Aufbauschema (Fig. 1) gewisse Schutzgruppen in V ausgetauscht wurden. In beiden Verfahren wird vorerst dasselbe Hexapeptid III (1'-2'-3'-5-6-7) aus dem Tripeptid mit der Isopelargonsäure (1'-2'-3') I⁸⁾ und dem geschützten Tripeptidester II⁹⁾ mittels der Azid-Methode synthetisiert. Dieses wird in 5 α -Stellung zum Zwischenprodukt IV deformyliert und damit in eine kondensier-

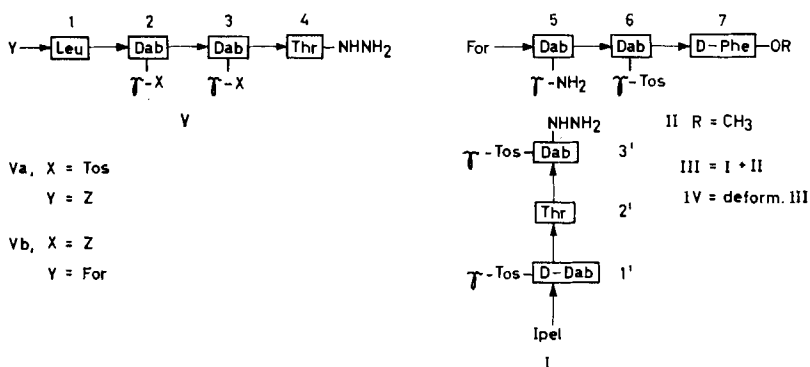


Fig. 1. Aufbauschema des offenen Decapeptids 7 γ

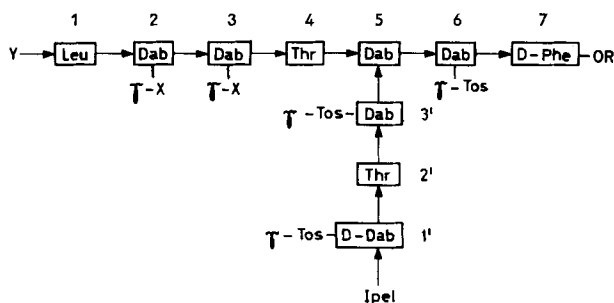


Fig. 2. Struktur des offenen Decapeptids 7 γ

⁶⁾ R. O. STUDER, K. VOGLER & W. LERGIER, *Helv.* 44, 131 (1961).

⁷⁾ R. O. STUDER, W. LERGIER & K. VOGLER, *Helv.* 46, 612 (1963).

⁸⁾ R. O. STUDER & K. VOGLER, *Helv.* 45, 819 (1962).

⁹⁾ K. VOGLER, P. LANZ, W. LERGIER & R. O. STUDER, *Helv.* 43, 574 (1960).

bare Form übergeführt, die mit Hilfe des Tetrapeptides Va zum offenen, geschützten Decapeptid VIa (Fig. 2) verlängert werden kann. Va haben wir aus dem bereits beschriebenen entsprechenden Ester⁸⁾ mittels Hydrazinhydrat erhalten. Durch katalytische Hydrierung von VIa wird in Stellung 1 der Benzyloxycarbonylrest selektiv entfernt und die alkalische Verseifung der Estergruppe in VIIa (Bildung

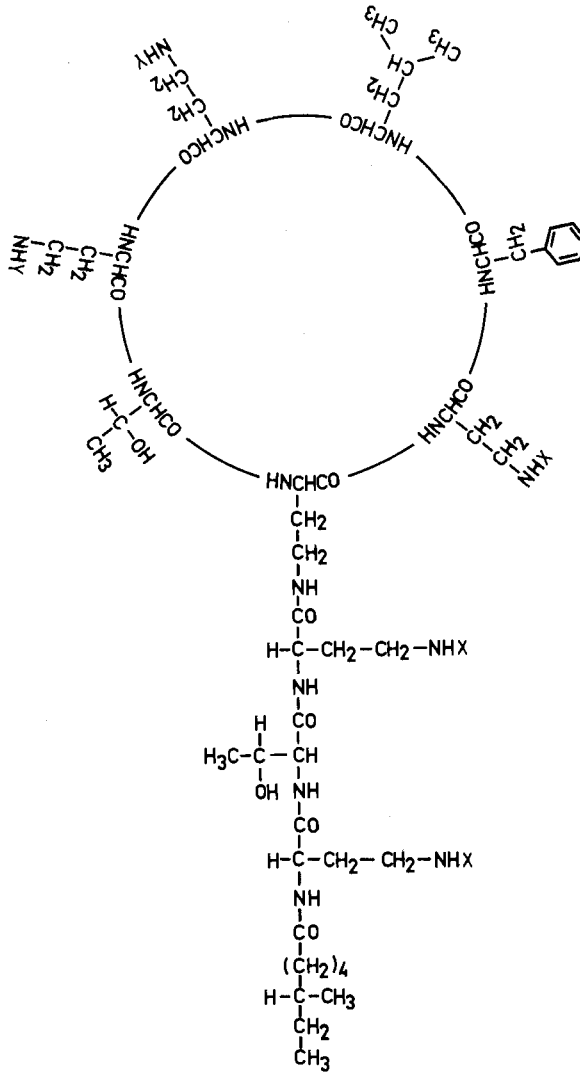


Fig. 3. Geschütztes cyclisches Decapeptid IXa
 X = Tos, Y = Tos
 Geschütztes cyclisches Decapeptid IXb
 X = Tos, Y = Z
 Cyclisches Decapeptid 7γ (X)
 X = Y = H

von VIIIa) legt auch das andere Kettenende für die Cyclisierung frei, die vorerst mit VIIIa durchgeführt wurde.

Eine zweite Möglichkeit, zu einem an den Kettenenden 1 und 7 freien, verzweigten Decapeptid VIIIb zu gelangen, bietet das analoge Verfahren, bei dem IV statt mit Va mit Vb (Fig. 1)¹⁰⁾ ebenfalls über die Azid-Methode zu VIb (Fig. 2) gekuppelt wird. Die selektive Deformylierung zu VIIb sowie die alkalische Verseifung zu VIIIb bilden die nächsten Schritte, die wir bereits früher^{5) 6) 7)} bei Isomeren erfolgreich durchgeführt haben.

Die Cyclisierung beider Vorstufen VIIIa und VIIIb lieferte natürlich nach Entfernung der Schutzgruppen dasselbe Endprodukt X (Fig. 3), während sich die geschützten cyclo-Decapeptide IXa und IXb lediglich in den Schutzgruppen in Stellung 2 γ und 3 γ unterscheiden, wo IXa Tosylgruppen, IXb hingegen Z-Gruppen trägt. Die Cyclisierung dieser Analoga verläuft in beiden Fällen nach unserer Technik mit überschüssigem Carbodiimid⁵⁾ etwa gleich gut (Ausbeute ca. 10%), während bei der Kondensation von IV mit Vb (Fig. 1) zu VIb der gewichtige Vorteil auftritt, dass VIb wesentlich besser als VIa gereinigt werden kann. Dies hängt zum grossen Teil mit der schwereren Löslichkeit von VIb zusammen, die gegenüber dem «all-tosyl-Derivat» in organischen Lösungsmitteln gefunden wird.

Die Abspaltung der Schutzgruppen aus den Cyclisierungs-Rohprodukten gelang durch Behandlung mit Natrium in flüssigem Ammoniak, wie sie für die anderen Isomeren bereits früher beschrieben wurde. Die Reinigung dieses Rohproduktes zum analysenreinen cyclo-Decapeptid 7 γ X (Fig. 3) erfolgte durch Gegenstromverteilung über annähernd 2000 Stufen im System *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser-(40:10:5:45) und Fällung in konz. NH₃ bei 0°. X wurde als Pentahydrochlorid isoliert, um es mit dem Naturprodukt in derselben Salzform vergleichen zu können. Die Dinitrophenylierung des Endproduktes⁵⁾ ergab nach Hydrolyse nur γ -DNP- α,γ -Diaminobuttersäure und kein DNP-Leucin, was seine cyclische Natur erhärtet.

2. Charakterisierung des Endproduktes

Das synthetische cyclo-Decapeptid 7 γ (X) wurde in Anlehnung an die Charakterisierung früherer Syntheseprodukte nach dem Schema der Tab. 1 mit natürlichem Polymyxin B₁ verglichen. Da das bereits beschriebene Produkt 7 α ⁷⁾ antibakteriell ebenfalls hoch aktiv ist, wurde es nochmals miteinbezogen und wird in diesem Zusammenhang mitdiskutiert. Das Vergleichspräparat B₁ ist aus einem Gemisch von Polymyxin B₁- und B₂-Sulfat, das uns von der Firma PFIZER¹¹⁾ zur Verfügung gestellt wurde, durch Gegenstromverteilung und Fällung mit konz. NH₃ bei 0° sowie Lyophilisierung mit HCl gewonnen worden. Es zeigte die erwartete Drehung und den Chloranalysenwert und darf als besonders rein gelten, während das frühere Vergleichspräparat⁷⁾ nicht so rein war.

Wie aus den Messwerten der Tabelle hervorgeht, entsprechen die Syntheseprodukte 7 γ und 7 α dem natürlichen Polymyxin B₁ bis auf den Drehwert. Eine Differenz im $[\alpha]_D$ -Wert von ca. 20% ist wohl ein sicherer Unterschied und dürfte kaum mit

¹⁰⁾ K. VOGLER & P. LANZ, *Helv.* 43, 270 (1960).

¹¹⁾ Herrn Dr. I. A. SOLOMONS, Chemotherapeutic Research, CHAS. PFIZER & Co. INC., Croton/Conn., USA, danken wir für die Überlassung dieses Präparates.

Tabelle 1. *Analytische Charakterisierung der Endprodukte 7 α und 7 γ ¹²⁾ und Vergleich mit natürlichem Polymyxin B₁*

<i>Analysen- Charakterisierung</i>	<i>Cyclisierungsprodukt 7α</i>	<i>Cyclisierungsprodukt 7γ</i>	<i>Polymyxin B₁</i>
1. Papierchromatographie	einheitlich; Rf = 0,564	einheitlich; Rf = 0,564	einheitlich; Rf = 0,569
2. Dünnschichtchromatographie	einheitlich; Rf = 0,482	einheitlich; Rf = 0,485	einheitlich; Rf = 0,482
3. Hochspannungspapierelektrophorese	einheitlich Wanderstrecke: 11,9 cm	einheitlich Wanderstrecke: 11,9 cm	einheitlich Wanderstrecke: 11,9 cm
4. Chlorgehalt (bez. auf wasserfreie Substanz) für Pentahydrochlorid ber.: 12,79%	gef.: 12,52%, kein Rückstand	12,49%, kein Rückstand	12,88%, kein Rückstand
5. Freie Aminogruppen Ninhydrin-Bestimmung	4,9 \pm 10%	4,8 \pm 10%	5,0
6. Spz. Drehung $[\alpha]_{589}^{25}$ ($c = 0,5$; 75% Äthanol in H ₂ O) ber. auf wasserfreie Substanz	- 65,3°	- 60,0°	- 85,2°
7. Totalhydrolyse-Aminosäureverhältnis \pm 10% ber.: Dab Thr Phe Leu	gef.: Dab Thr Phe Leu 6,5 1,8 0,9 1,0	Dab Thr Phe Leu 6,5 2,1 0,9 1,0	Dab Thr Phe Leu 6,2 2,0 0,9 1,0
8. Hydrolyse des DNP-Peptides	kein DNP-Leu	kein DNP-Leu	kein DNP-Leu
9. IR.-Spektrum	identisch mit 7 γ und B ₁	identisch mit 7 α und B ₁	identisch mit 7 α und 7 γ

mangelnder Reinheit erklärt werden können. Wir müssen daraus schliessen, dass weder 7 γ noch 7 α mit natürlichem Polymyxin B₁ identisch sind. Auffallend ist das Versagen der Plattenchromatographie, etwelche Differenzen der synthetischen Produkte gegenüber dem Naturprodukt aufzuzeigen. Dies liegt durchaus nicht am verwendeten Lösungsmittel-System, denn es wurden gegen 40 Lösungsmittel-Kombinationen geprüft und bei keiner konnten Unterschiede gegenüber dem Naturprodukt festgestellt werden. Dass das IR.-Spektrum keine Differenzen aufweist, ist weniger erstaunlich, da analoge Fälle in der Peptid-Chemie seit langem bekannt sind. Auch die Elektrophorese versagt in Anbetracht der gleichen Anzahl ionisierender Gruppen und sicherlich sehr ähnlichem Verhältnis von Masse und Ladung.

Von grundlegender Bedeutung in der Diskussion des Vergleichs der synthetischen Präparate mit natürlichem Polymyxin B₁ ist die Frage, ob unsere cyclischen Decapeptide durch unsere Formelbilder wiedergegeben werden oder nicht. Um diese Frage abzuklären, haben wir folgende fünf Punkte experimentell besonders geprüft.

a) *Cyclische Struktur.* Die cyclische Struktur der Syntheseprodukte steht wohl ausser Zweifel, da wir bei allen vier cyclo-Peptiden 8 α , 8 γ , 7 α und 7 γ das Dinitrophenylierungsexperiment⁵⁾ durchführten und nur γ -DNP- α , γ -Diaminobuttersäure, nie aber andere DNP-Aminosäuren, auch kein DNP-Leucin, fanden.

¹²⁾ Für die Erläuterungen zur Tabelle vgl. 7).

b) *Die Frage der Partialracemisierung* stellt ein komplizierteres Problem dar. Bis und mit der Stufe der offenen, geschützten Decapeptide ist die Wahrscheinlichkeit einer Partialracemisierung gering, da wir praktisch überall die Azid-Methode zur Peptidkupplung einsetzten und bei der Synthese kleinerer Peptidbruchstücke andere Methoden, z. B. die gemischte Anhydrid-Methode¹³⁾ mit dem Verfahren nach CURTIUS¹⁴⁾, kontrolliert haben. Schwieriger gestaltet sich die Bestimmung des Racemisierungsgrades beim Ringschluss mit Carbodiimid. Hier ist durchaus mit der Möglichkeit einer Partialracemisierung zu rechnen¹⁵⁾.

Das Nichtvorhandensein von Partialracemisierung liesse sich z. B. beim Phenylalanin daraus erkennen, dass letzteres nach der Totalhydrolyse des Endproduktes mit D-Aminosäureoxydase vollständig abgebaut würde, wenn es optisch rein ist. Im gegenteiligen Fall bliebe dann mehr oder weniger der L-Form, je nach Racemisierungsgrad, zurück.

Diesen Versuch haben wir mit einem angereicherten Präparat von D-Aminosäureoxydase (FLUKA) durchgeführt. Dieses Präparat baut jedoch authentisches D-Phenylalanin nicht quantitativ ab. Ein solcher Befund wird mit D-Aminosäureoxydase, je nach Substrat und Qualität des Enzyms, ganz allgemein beobachtet. Für D-Phenylalanin wurden in der Literatur Abbaugrade von nur 14–46% referiert¹⁶⁾. Mit einer Enzymmenge von 0,5 mg/ μ Mol Substrat erzielten wir mit Pyrophosphat als Pufferlösung bei allen Cyclopeptiden einen Abbaugrad von ca. 85% (Tab. 2).

Tabelle 2. *Abbau des D-Phenylalanins aus den Totalhydrolysaten mit D-Aminosäureoxydase*

D-Phe-Gehalt	D-Phe authentisch	Totalhydrolysat 7α	Totalhydrolysat 7γ	Totalhydrolysat B_1
vor Inkubation	100 %	100 %	100 %	100 %
nach Inkubation	13,4%	13,5%	14,7%	15,0%
D-Phe-Oxydationsgrad	86,6%	86,5%	85,3%	85,0%

Das Resultat spricht eindeutig für die optische Reinheit von D-Phenylalanin aus dem Naturprodukt sowie aus den beiden synthetischen Präparaten. Eine Partialracemisierung wird in unsern Endprodukten nicht beobachtet. Wir müssen vielmehr annehmen, dass Diastereomere, die durch Partialracemisierung beim Ringschluss entstanden sein mögen, durch die Reinigungsoperation (Gegenstromverteilung) bei der Aufarbeitung eliminiert worden sind. Eine solche Auftrennung von Diastereomeren ist tatsächlich z. B. bei Oxytocin und D-Leu⁸-Oxytocin¹⁷⁾ beobachtet worden.

Da alle Abbaugrade von durch totale Hydrolyse erhaltenem D-Phenylalanin und von optisch reinem D-Phenylalanin übereinstimmen, ist mit diesem Resultat

¹³⁾ R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **34**, 874 (1951); TH. WIELAND & H. BERNHARD, *Liebigs Ann. Chem.* **572**, 190 (1951); J. R. VAUGHAN & R. L. OSATO, *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 3547, 5553 (1951); **74**, 676 (1952).

¹⁴⁾ TH. CURTIUS, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **35**, 3226 (1902).

¹⁵⁾ G. W. ANDERSON & F. M. CALLAHAN, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 2902 (1958).

¹⁶⁾ A. MEISTER, *Biochemistry of the Amino Acids*, Academic Press, New York 1957, p. 152; J. P. GREENSTEIN, S. M. BIRNBAUM & M. O. OTAY, *J. biol. Chemistry* **204**, 307 (1953).

¹⁷⁾ C. H. SCHNEIDER & V. DU VIGNEAUD, *J. Amer. chem. Soc.* **84**, 3005 (1962).

gerade noch eine andere Frage mitbeantwortet, nämlich diejenige nach der Partialracemisierung von D-Phenylalanin bei der üblichen Totalhydrolyse (20 Std., 6N HCl, 105°) von Polymyxin B₁ und den synthetischen Präparaten 7 γ und 7 α . Es folgt aus der Übereinstimmung der Werte der Tabelle 2, dass D-Phenylalanin durch Totalhydrolyse von Polymyxin B₁ mit 6N HCl unter den üblichen Bedingungen nicht oder zu einem sehr geringen Grad racemisiert wird.

Einen weiteren Beleg für die optische Reinheit der synth. Produkte lieferte uns das Verhalten der entsprechenden Hydrolysate gegen L-Aminosäureoxydase. Dieses Enzym muss einerseits D-Phenylalanin und 1 Mol. D- α,γ -Diaminobuttersäure unangegriffen zurücklassen, während L-Aminosäuren im allgemeinen abgebaut werden sollten. Für L-Leucin war dies ohne weiteres zu erwarten, nicht aber für L- α,γ -Diaminobuttersäure und vor allem nicht für L-Threonin¹⁸). Vorversuche ergaben einen quantitativen Abbau von je einem μ Mol von L-Leucin und von L-Phenylalanin mit 10 μ g L-Aminosäureoxydase (SIGMA Typ III) bereits nach 1 Std. 1 μ Mol L- α,γ -Diaminobuttersäure wurde mit 100 μ g des Enzyms in 24 Std. zu 20–30%, mit 1000 μ g Ferment in 24 Std. jedoch quantitativ abgebaut. L-Threonin wurde unter diesen Bedingungen nicht angegriffen.

Die Untersuchung der inkubierten Totalhydrolysate von natürlichem Polymyxin B₁ und dem synthetischen cyclo-Decapeptid 7 α durch Papierchromatographie bestätigte in allen Teilen die relative und absolute optische Reinheit des synthetischen Präparates. Zur Kontrolle wurden unter gleichen Bedingungen äquimolare Mengen L-Leucin, L-Phenylalanin, D-Phenylalanin und L- α,γ -Diaminobuttersäure sowie eine Mischung von 1 μ Mol D- α,γ -Diaminobuttersäure und 5 μ Mol L- α,γ -Diaminobuttersäure gleichzeitig inkubiert.

Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt. Die inkubierte L-Leucin-Kontrollprobe wurde quantitativ oxydiert. Desgleichen fehlte bei den inkubierten B₁- und 7 α -Hydrolysaten der Leucin-Fleck vollständig, während er bei den nicht oxydierten Hydrolysatproben in einer der äquimolaren Vergleichslösung entsprechenden Farbintensität auftrat. Der Phenylalanin-Fleck blieb in den mit L-Aminosäureoxydase behandelten B₁- und 7 α -Hydrolysaten voll erhalten, ebenso in der inkubierten D-Phenylalanin-Kontrolle, während die inkubierte L-Phenylalanin-Probe quantitativ abgebaut wurde. Bei den mit L-Aminosäureoxydase behandelten B₁- und 7 α -Hydrolysaten verblieb in der Position der α,γ -Diaminobuttersäure ein abgeschwächter Fleck, während die inkubierte L- α,γ -Diaminobuttersäure-Kontrolle vollständig abgebaut wurde. Die Farbintensität der nicht oxydierten Anteile in den Hydrolysaten entsprach derjenigen der inkubierten Vergleichsmischung, bestehend aus 1 μ Mol D- und 5 μ Mol L- α,γ -Diaminobuttersäure. Der Threonin-Fleck trat sowohl im B₁- wie im 7 α -Hydrolysat vor und nach Einwirkung der L-Aminosäureoxydase gleich stark auf¹⁸).

c) *Sekundärreaktionen, hervorgerufen durch Überschuss von Carbodiimid.* Eine weitere Komplikation könnte sich nach unserer Arbeitsweise aus der Verwendung eines riesigen Überschusses von Dicyclohexylcarbodiimid durch Sekundärreaktionen, z. B. an den OH-Gruppen des Threonins, ergeben. Dies konnte praktisch

¹⁸) J. P. GREENSTEIN & M. WINITZ, Chemistry of the Amino Acids, John Wiley & Sons, Inc., New York 1961, p. 1789.

durch folgendes Experiment ausgeschlossen werden: Handelsübliches Polymyxin-B-Sulfat wurde bei pH 8 und 0° vollständig carbobenzoxyliert, anschliessend gemäss unserer Cyclisierungsvorschrift mit einem Überschuss von Dicyclohexylcarbodiimid behandelt, letzteres nach Vorschrift zerstört, abgetrennt und das geschützte Naturprodukt mittels Na in flüssigem Ammoniak und Behandlung mit HCl wieder ins freie Antibiotikum-Hydrochlorid übergeführt. Diese Behandlung ergab ein unverändertes Naturprodukt, was mit der empfindlichsten Methode, nämlich durch Rotationsdispersion des Nickelkomplexes, geprüft wurde (vgl. Abschnitt 3, S. 2831). Dass bei der Entfernung der Schutzgruppen mit Na in flüssigem Ammoniak keine Veränderung eintritt, folgt aus demselben Versuch und ist übrigens mit gleichem Resultat bereits schon früher¹⁹⁾ durch Carbobenzoxylierung und Wiederabspaltung der Schutzgruppen aufgezeigt worden. Es wurde nicht nur keine Veränderung des Nickelkomplexes beobachtet, sondern die mikrobiologische Aktivität des Produktes vor und nach dem Versuch war im Plattentest *in vitro* dieselbe.

d) *Inaktivierung durch Gegenstromverteilung.* Eine weitere mögliche Veränderung könnten unsere Syntheseprodukte bei der Gegenstromverteilung im System *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (40:10:5:45) (wässrige Phase pH ~ 5) erlitten haben, da CRAIG²⁰⁾ ja ein saures System (wässrige Phase pH = 1) verwendete. Auch dieser Einwand konnte durch einen entsprechenden Modellversuch entkräftet werden. Handelsübliches Polymyxin-B-Sulfat wird durch dreiwöchiges Schütteln mit obigem Lösungsmittelsystem nicht denaturiert, was aus den unveränderten Rotationsdispersionskurven der Nickelkomplexe vor und nach dem Versuch folgt (vgl. Abschnitt 3, S. 2831).

e) *Kristallstruktur der Polymyxine.* Die Aufklärung der Chemie der Polymyxine war erschwert durch den Umstand, dass es bisher nicht gelang, die Salze des Naturproduktes oder der synthetischen Präparate eindeutig zu kristallisieren. Eine kristalline Base wurde zwar beschrieben²¹⁾; sie zeigte Doppelbrechung, aber weder definierte Gestalt noch definierten Schmelzpunkt. Wir haben diese Beobachtung an den Pentahydrochloriden (Lyophilisate) von Polymyxin B₁ und des cyclo-Decapeptides 7 α in ihren DEBYE-SCHERRER-Pulverdiagrammen mehr oder weniger bestätigen können. Diese Diagramme haben den Charakter von Faserdiagrammen von Hochpolymeren, und beide zeigen nur einen, aber denselben definierten Netzebenenabstand von 25,2 Å. Kürzlich ist es jedoch WILKINSON²²⁾ gelungen, Polymyxin B als Salz der Orthophosphorsäure (Pentaphosphat) zu kristallisieren. Mit Hilfe dieser Impfkristalle konnten wir nun auch Polymyxin B₁ als Pentaphosphat in wunderbar verdrihten Nadeln aus Alkohol/Wasser erhalten. Dieser Fortschritt wird den Identitätsbeweis mit einem möglichen synthetischen Produkt in Zukunft erleichtern.

Die synthetischen Produkte konnten noch nicht kristallin gefasst werden.

¹⁹⁾ Unveröffentlichte Versuche.

²⁰⁾ W. HAUSMANN & L. C. CRAIG, J. Amer. chem. Soc. 76, 4892 (1954).

²¹⁾ J. N. PORTER, R. BROSCARD, G. KRUPKA, P. LITTLE & J. S. ZELLAT, Ann. N. Y. Acad. Sci. 57, 863 (1949).

²²⁾ Privatmitteilung von Dr. S. WILKINSON von den WELLCOME RESEARCH LABORATORIES, Langley Court, Beckenham, Kent (England). Für die Impfkristalle möchten wir an dieser Stelle herzlich danken.

3. Rotationsdispersion der Nickelkomplexe des Naturproduktes und der synthetischen Präparate

Aus den Resultaten der Tabelle 1 und den geschilderten zusätzlichen Experimenten darf man nun schliessen, dass unsere Syntheseprodukte den angegebenen Formelbildern entsprechen.

Um die Diskrepanz des optischen Drehwertes bei der D-Linie zwischen 7α bzw. 7γ einerseits und dem Naturprodukt andererseits weiterzuverfolgen, drängten sich Rotationsdispersions-Messungen auf. Am reinen Antibioticum selbst konnten bis zu einer Wellenlänge von ca. $260\text{ m}\mu$ keine charakteristischen Effekte beobachtet werden. Dies in Übereinstimmung mit der Literatur²³), wo COTTON-Effekte erst bei niedrigeren Wellenlängen auftreten, die wir mit unserem Instrument nicht mehr erfassen konnten. Gut messbare Effekte traten jedoch bei den Nickelkomplexen auf.

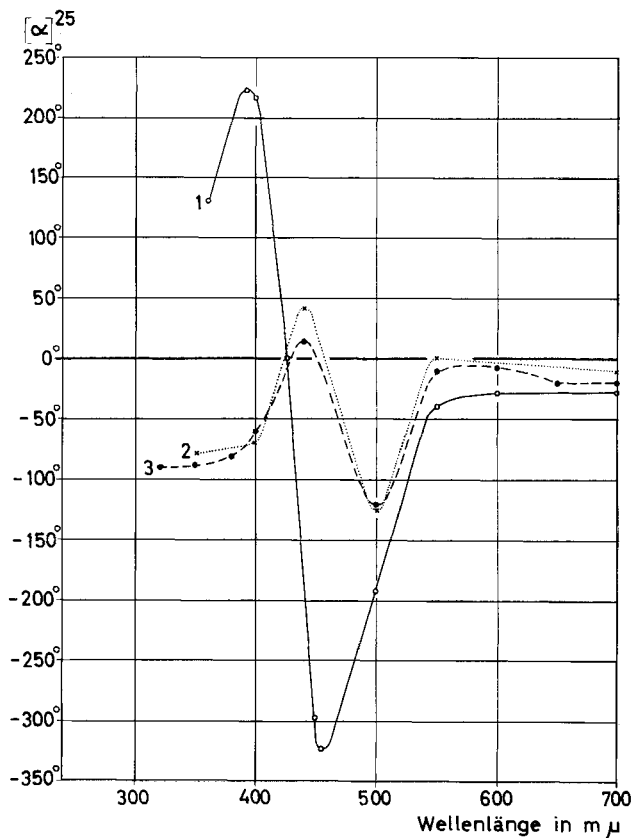


Fig. 4. Rotationsdispersionskurven des Nickelkomplexes des natürlichen Polymyxins B_1 und der synthetischen Produkte 7α und 7γ ($c = 0,10\%$, $\text{pH} = 9,3$)

- 1 Polymyxin B_1
- 2 cyclisches Decapeptid 7α
- 3 cyclisches Decapeptid 7γ

²³) E. R. BLOUT, I. SCHMIER & N. S. SIMMONDS, J. Amer. chem. Soc. 84, 3193 (1962).

Der Nickelkomplex des Handelsproduktes Polymyxin-B-Sulfat PFIZER® wurde unlängst von BRINTZINGER dargestellt. Er lässt sich gewinnen aus äquimolekularen Mengen Peptid und Nickelsulfat mit darauffolgender Einstellung des pH auf $9,3 \pm 0,1$. Es entsteht dabei eine schwach grünlich gefärbte Komplexlösung, über deren Konstitution aber nur spärliche Unterlagen vorliegen²⁴⁾.

Diese Komplexe geben negative COTTON-Effekte²⁵⁾, die insbesondere beim Naturprodukt gut ausgebildet sind. In Fig. 4 finden sich diese Kurven, aufgenommen in wässriger Lösung, und zwar von natürlichem Polymyxin-B₁-pentahydrochlorid im Vergleich mit den synthetischen cyclo-Decapeptid-pentahydrochloriden 7 α und 7 γ .

Die Unterschiede sind nicht nur quantitativer, sondern in bezug auf die Lage der Maxima im positiven und negativen Bereich und des Inflexionspunktes auch

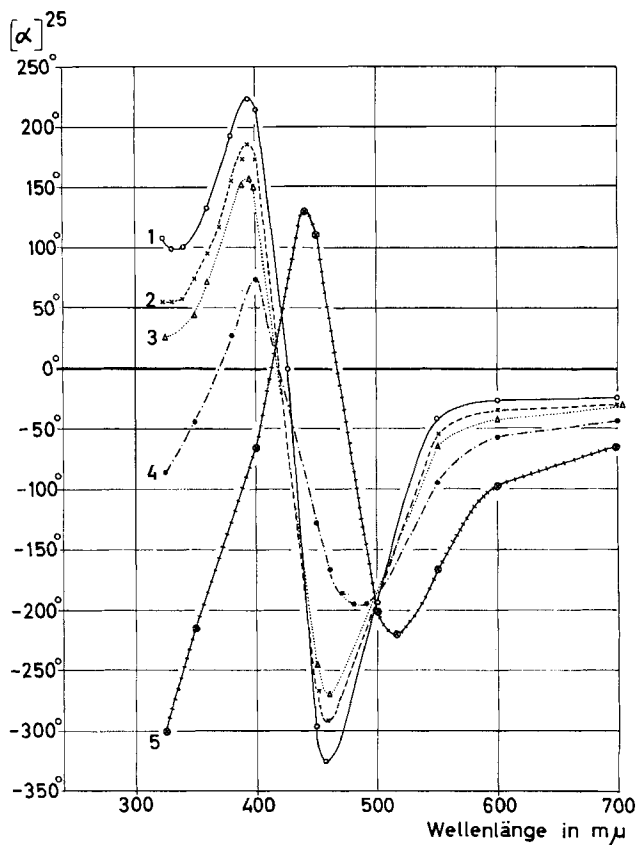


Fig. 5. Alterung von Polymyxin-B₁-Nickelkomplex in Lösung bei Raumtemperatur
($c = 0,10\%$, pH 9,3)

1 nach 2 Std.

4 nach 24 Std.

2 nach 5 Std.

5 nach 5 Tagen

3 nach 8 Std.

²⁴⁾ H. BRINTZINGER, *Helv.* 44, 744 (1961).

²⁵⁾ W. KUHN, *Naturwiss.* 26, 290 (1938).

qualitativer Art. Ein weiterer prinzipieller Unterschied zwischen B_1 und den synthetischen Produkten besteht darin, dass die Rotationsdispersionskurven der Lösungen von B_1 mit der Zeit bei Zimmertemperatur verändert werden, während dies bei den synthetischen Präparaten in der Beobachtungszeit von 5–7 Tagen nicht der Fall ist.

Fig. 5 gibt die Veränderungen wieder, die die Dispersionskurve des Nickelkomplexes von Polymyxin B_1 von 2 Std. bis 5 Tagen nach Herstellen der Lösungen erfährt. Beide Maxima werden innerhalb der ersten Tage abgeschwächt, steigen nachher wieder an und verschieben sich gleichzeitig gegen grössere Wellenlängen. Sie gehen aber nicht in die Kurven der synthetischen Präparate über (Fig. 4), sondern werden den letzteren nur ähnlich. Das Handelspräparat verhält sich prinzipiell gleichartig, wenn auch der positive Pik etwas schwächer ausgebildet ist als bei reinem Polymyxin B_1 (Polymyxin PFIZER enthält mindestens die zwei Komponenten B_1 und B_2).

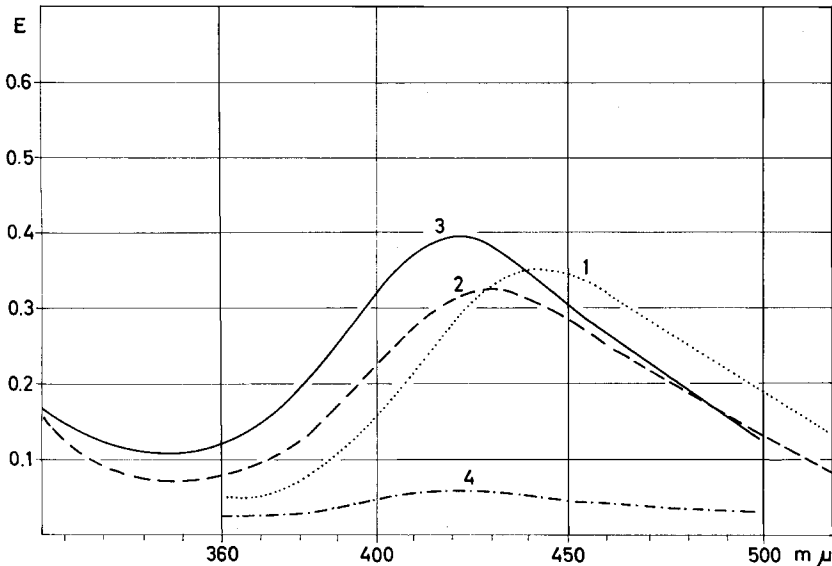


Fig. 6. UV.-Spektren der Nickelkomplexe von Polymyxin B_1 und der synthetischen Decapeptide 7α und 7γ (pH 9,3)

- | | | |
|---|--------------------------|--------------|
| 1 | B_1 , frische Lösung | $c = 0,55\%$ |
| 2 | B_1 , nach 24 Std. | $c = 0,55\%$ |
| 3 | B_1 , nach 5 Tagen | $c = 0,55\%$ |
| 4 | 7α bzw. 7γ | $c = 0,10\%$ |

Wir möchten noch hervorheben, dass diese Denaturierung des Polymyxin-Nickelkomplexes durch Lagern in wässriger Lösung bei Zimmertemperatur irreversibel ist. Das nach 7 tägiger Alterung des Nickelkomplexes über eine Sephadex-Säule zurückgewonnene (Ni-freie) Peptid ergibt nach erneuter Überführung in den Nickelkomplex von Beginn an das RD.-Spektrum des denaturierten Produktes. Plattenchromatographisch lässt sich am isolierten freien Peptid gegenüber dem nativen Produkt kein Unterschied feststellen. Dies ist nicht so verwunderlich, da ein chromato-

graphischer Unterschied zwischen Polymyxin B₁ und den synthetischen Präparaten 7 α und 7 γ ebenfalls nicht besteht.

Interessant ist das Verhalten dieser Komplexlösungen im UV.-Bereich. Während, wie erwähnt, in der Rotationsdispersion durch Lagerung eine Verschiebung der Maxima gegen grössere Wellenlängen beobachtet wird, verschiebt sich das UV.-Maximum gegen kleinere Wellenlängen, und die synthetischen Produkte verändern sich auch hier nicht (Fig. 6). Das UV.-Maximum, das gewöhnlich ungefähr im Inflexionspunkt der COTTON-Schleife liegt, wandert also durch diesen Alterungseffekt weiter von dieser Stelle weg.

Eine ähnliche Erscheinung zeigt Campher, wo der Inflexionspunkt der COTTON-Schleife deutlich ausserhalb des UV.-Maximums liegt, wie KUHN²⁶⁾ vor Jahren festgestellt hat.

Es wurde nun auch festgestellt, dass Polymyxin B₁ und Polymyxin-B-Sulfat PFIZER® in alkalischer Lösung bei pH 9,3 in freiem Zustand, also nicht in

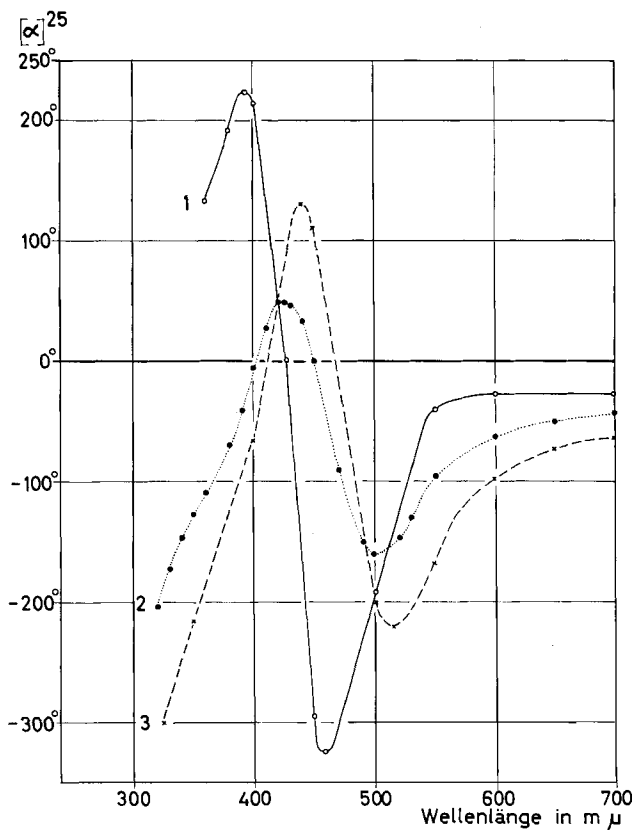


Fig. 7. Alterung von freiem Polymyxin B₁

- 1 B₁, frischer Nickelkomplex
- 2 B₁, frischer Nickelkomplex, nach 7tägiger Lagerung des freien Peptides bei pH 9,3
- 3 B₁, gealterter Nickelkomplex (5 Tage)

²⁶⁾ W. KUHN & H. K. GORE, Z. physik. Chem. (Leipzig) (B) 12, 389 (1931).

komplexer Bindung mit einem Schwermetall, sich verändern, was anschliessend durch Rotationsdispersion des Nickelkomplexes demonstriert werden kann. Nach 7 Tagen (Kurve 2, Fig. 7) findet sich bereits eine starke Veränderung, die allerdings der Veränderung des Nickelkomplexes nach 5 Tagen (Kurve 3, Fig. 7) nicht ganz entspricht. Polymyxin B PFIZER zeigt auch hier ein völlig analoges Verhalten.

Diese grosse Empfindlichkeit des Naturproduktes gegen Alkali ist ein weiterer Unterschied zu den Syntheseprodukten 7α und 7γ , die keine solche Empfindlichkeit zeigen.

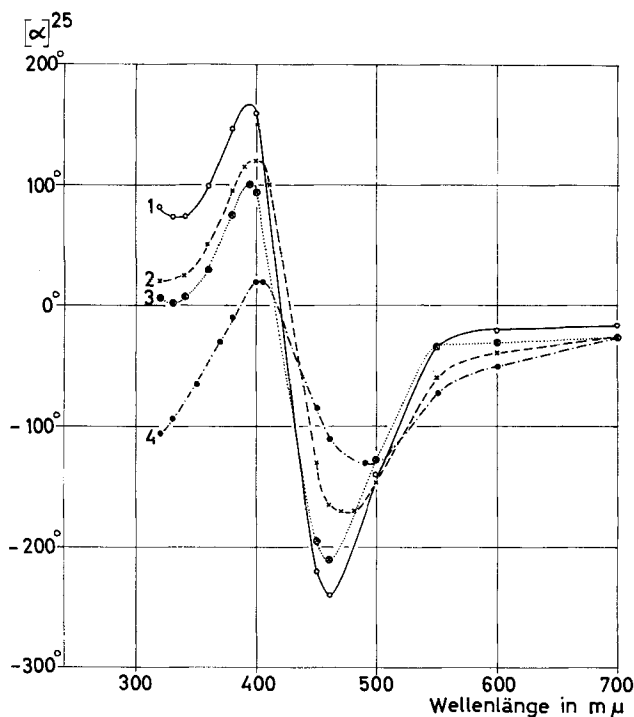


Fig. 8. Rotationsdispersionskurve des Nickelkomplexes von Polymyxin-B-Sulfat (PFIZER) mit Zusatz von Harnstoff und bei Einwirkung von Wärme

- 1 Nickelkomplex frisch hergestellt
- 2 Nickelkomplex 2 Std./60° ohne Harnstoff
- 3 Nickelkomplex mit 10% Harnstoff 25°
- 4 Nickelkomplex mit 10% Harnstoff 2 Std./60°

Von einigem Interesse war nun auch das Verhalten des Nickelkomplexes des natürlichen Antibioticums gegenüber Harnstoff, ein Agens, das seit langem zur Aufspaltung von Wasserstoffbrücken in der Protein-Chemie²⁷⁾ gebraucht wird. Nach den Kurven der Fig. 8 katalysiert Harnstoff die normale Veränderung des Nickelkomplexes beim Lagern ziemlich stark und besonders bei höheren Temperaturen. So wird z. B. bei 60° und 10% Harnstoffgehalt bereits in 2 Std. ein Zustand erreicht, der ohne Harnstoff und bei 25° erst in ca. 7 Tagen resultiert.

²⁷⁾ H. K. KING, *Science Progress* 49, 703 (1961); G. KALNITSKY, J. P. HUMMEL, H. RESNICK, J. R. CARTER, L. B. BARNETT & C. DIERKS, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 87, 543 (1959).

Aus allen diesen Versuchen ist zu entnehmen, dass die Sekundärstruktur des Nickelkomplexes unserer synthetischen Produkte von der des Nickelkomplexes des natürlichen Polymyxins B₁ erheblich abweicht. Die Abweichung erinnert an die Veränderungen, die native Ribonucleinsäure durch Einwirkung von 8M Harnstofflösung²⁸⁾ erleidet.

Dass wir bei richtiger Aminosäuresequenz eine falsche Konformation in den synthetischen Produkten vorliegen haben, ist eher unwahrscheinlich geworden, seitdem es gelungen ist, an den S-S-Brücken gespaltene Ribonuclease durch blosse Luftoxydation²⁹⁾ von selbst wieder zum nativen und hochaktiven Komplex «aufzurollen». Dies kann indessen nicht als Beweis für unsern Fall herangezogen werden, und diese Frage bleibt durchaus noch offen.

4. Mikrobiologische Charakterisierung der synthetischen Produkte gegenüber natürlichem Polymyxin B₁

Von besonderer Bedeutung war nun auch die mikrobiologische Charakterisierung unserer Syntheseprodukte relativ zum natürlichen Polymyxin B₁.

Die antibakterielle Aktivität von 7 α und 7 γ wurde gegen verschiedene Erreger *in vitro* und gegen *Coli*-Bazillen auch *in vivo* sorgfältig mit derjenigen des Naturproduktes verglichen (vgl. Tabelle 3). Für die Bestimmung der Wirksamkeit gegen *Brucella bronchiseptica* wurde der Zylindertest nach GROVE & RANDALL³⁰⁾, für *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* hingegen der nephelometrische Test nach WINTERMERE *et al.*³¹⁾ eingesetzt mit folgenden Abänderungen: Das Alter der Testorganismen betrug drei Wochen, das Inoculum je 23 Millionen Keime/5 ml Gesamtvolumen und die Inkubationsdauer 5 Std. Die synthetischen cyclo-Decapeptide und natürliches Polymyxin B₁ wurden in einem Phosphatpuffer von pH 7 gelöst. Als Bezugssubstanzen dienten sowohl das USP Standardpräparat Polymyxin B mit einer Aktivität von 7850 E/mg wie auch ein Hilfsstandard POLYMYXIN B PFIZER® mit 7000 E/mg.

Tabelle 3. Antibakterielle Aktivität der synthetischen Präparate 7 α und 7 γ gegen Polymyxin B₁ *in vitro* und *in vivo* (Standardabweichung \pm 20%)

	7 α	7 γ	B ₁	
<i>Brucella bronchiseptica</i> ATCC 4617	8898 E/mg	8250 E/mg	8096 E/mg	} <i>in vitro</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6761 E/mg	7088 E/mg	10420 E/mg	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	5081 E/mg	4861 E/mg	5033 E/mg	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 100131	1514 E/mg	1297 E/mg	8421 E/mg	
<i>Escherichia coli</i> (CD ₅₀ s. c. Maus)	2,0 mg/kg	2,7 mg/kg	0,7 mg/kg	} <i>in vivo</i> ³²⁾

²⁸⁾ N. S. SIMMONS & E. R. BLOUT, *Biophysic. J.* 1, 55 (1960).

²⁹⁾ F. H. WHITE, *J. biol. Chemistry* 235, 383 (1960).

³⁰⁾ D. C. GROVE & W. A. RANDALL, *Assay Methods of Antibiotics*, Medical Encyclopedia, New York 1955, p. 1–238.

³¹⁾ D. M. WINTERMERE, W. H. EISENBERG & A. B. KIRSHBAUM, *Antibiotics and Chemotherapy* 7, 189 (1957).

³²⁾ B. FUST & E. BÖHNI, *Schweiz. Med. Wschr.* 92, 1599 (1962).

In vitro weisen die beiden synthetischen Präparate 7α und 7γ gegen *Brucella bronchiseptica* und gegen *Escherichia coli* praktisch die gleichen Aktivitäten auf wie das Naturprodukt. Hingegen ist Polymyxin B₁ etwas aktiver gegen *Pseudomonas aeruginosa* und deutlich aktiver gegen *Klebsiella pneumoniae*.

In vivo sind 7α und 7γ gegen Infektionen mit *Escherichia coli* an der Maus hochwirksame Chemotherapeutica; B₁ übertrifft hingegen die synthetischen Produkte noch um einen Faktor von ca. 3.

Eine sichere Differenzierung von 7α und 7γ , sowohl *in vitro* wie *in vivo*, ist, entgegen unserer früheren Annahme³³⁾, nicht möglich. Dagegen stützen diese biologischen Ergebnisse unsere Messresultate der Rotationsdispersion der Nickelkomplexe und lassen auf Nicht-Identität der synthetischen Präparate mit natürlichem Polymyxin B₁ schliessen.

5. Diskussion

Gemäss den vorliegenden Resultaten und insbesondere den zusätzlichen enzymatischen Untersuchungen haben wir den Eindruck, dass unsere synthetischen Produkte den vorgeschlagenen Strukturformeln entsprechen. Nach den biologischen Ergebnissen und den Messungen der Rotationsdispersion hingegen ist keines der vier synthetischen Produkte identisch mit natürlichem Polymyxin B₁. Zudem ist das Naturprodukt sehr alkaliempfindlich im Gegensatz zu 7α und 7γ . Auf welchen Eigenschaften diese Labilität beruht, ist vorderhand unbekannt und kann auch nicht aus den bestehenden möglichen Strukturformeln abgeleitet werden. Ob in diesem Zusammenhang die Art der Bindung der beiden Threoninreste eine Rolle spielt, bleibt einer weiteren Untersuchung vorbehalten. Leider ist noch nicht festgestellt worden, ob die beiden OH-Gruppen im Naturprodukt frei vorliegen oder nicht.

Aus der Diskrepanz der geschilderten Ergebnisse drängt sich die Notwendigkeit einer Überarbeitung der Strukturanalyse des Naturproduktes auf, um so mehr, als diese durch Partialhydrolyse mit Mineralsäuren⁴⁾ ausgeführt worden ist, von der generell feststeht³⁴⁾, dass dabei Umamidierungen auftreten können. In der Polymyxinreihe selbst haben SILAEV *et al.*³⁵⁾ Umacylierungen der α, γ -Diaminobuttersäure von $\gamma \rightarrow \alpha$ in saurem Milieu nachgewiesen.

In bezug auf die beiden aktiven synthetischen Produkte ist noch zu erwähnen, dass diese unter sich weder physikalisch-chemisch noch biologisch differenziert werden konnten. Dies ist zwar unbefriedigend, kann aber zum Teil wohl dahin gedeutet werden, dass wir uns der Grenze der experimentellen Möglichkeiten der heutigen Peptidchemie schon stark genähert haben.

Wir halten es unter den gegebenen Umständen für zweckmässig, das Studium des Naturproduktes wieder aufzunehmen, bevor neue synthetische Versuche gewagt werden.

³³⁾ K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER & E. BÖHNI, *Experientia* 17, 223 (1961).

³⁴⁾ W. D. JOHN & G. T. YOUNG, *J. chem. Soc.* 1954, 2870; P. DESNUELLE & A. CASAL, *Biochim. biophysic. Acta* 2, 64 (1948); F. SANGER & H. TUPPY, *Biochem. J.* 49, 463, 481 (1951).

³⁵⁾ A. B. SILAEV, G. S. KATRUKHA & KYZ'MINA, *J. gen. Chemistry USSR (Engl. Transl.)* 31, 2900 (1961).

Experimenteller Teil³⁶⁾A. Synthese des cyclischen Decapeptids 7 γ (X)

1. *N α -Formyl-N γ -[N α -(+)-isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (III)*. 18,6 g (0,035 Mol) N α -(+)-Isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobuttersäure-hydrazid⁸⁾ (I) werden in einer Lösung von 180 ml 50-proz. Essigsäure, 25 ml 3 N HCl und 200 ml Essigester gelöst und bei -5° langsam mit einer Lösung von 2,56 g (0,037 Mol) NaNO₂ in 20 ml Wasser versetzt. Nach 10 Min. Rühren bei -5° wird die Essigesterlösung abgetrennt und je 2mal mit Eiswasser, eiskalter 5-proz. NaHCO₃-Lösung und Eiswasser gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Sie wird darauf mit einer eiskalten Lösung von 19,9 g (0,035 Mol) N α -For-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester⁹⁾ (II) in 60 ml Dimethylformamid und 40 ml Eisessig vereinigt und 24 Std. im Eiskasten aufbewahrt. Dann wird zur Trockne verdampft, in Essigester gelöst und mit 1 N HCl, Wasser, 5-proz. NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird in heissem Alkohol gelöst und im Eis stehengelassen, wobei sich eine gelartige Masse abscheidet. Sie wird abgenutscht, mit kaltem Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 16,2 g (33% d. Th.). Smp. 168–171°; $[\alpha]_D^{20} = -1,0^\circ$; ϵ bei 256 m μ = 1582³⁷⁾, br. 1543 (Feinsprit, 61 mg%).

C₆₁H₈₆O₁₆N₁₀S₃ (1311,56) Ber. C 55,86 H 6,53 N 10,68% Gef. C 56,02 H 6,31 N 10,82%

2. *N γ -[N α -(+)-isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (IV) (durch Deformylierung von III)*. 23 g Hexapeptid III werden in 1 l Methanol unter Erwärmen gelöst, rasch auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 200 ml 4 N HCl/Methanol versetzt und 24 Std. bei 20° stehengelassen. Darauf wird bei 45° zur Trockne verdampft und der sirupartige Rückstand noch 2mal mit Methanol cingedampft. Man überschichtet den Rückstand mit Wasser und Essigester, stellt unter Eiskühlung mit NH₃ alkalisch und extrahiert mit Essigester. Die Essigesterlösung wird mit Eiswasser neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und zur Trockne verdampft. Nach Verreiben des Rückstandes unter Äther nutschts man ab, wäscht mit Äther und trocknet. Ausbeute 21 g (92%); der Ninhydrinwert entspricht 0,96 NH₂-Gruppen. ϵ bei 256 m μ = 1575, br. 1543 (Feinsprit, 61 mg%).

3. *Z-L-Leucyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-hydrazid (Va)*. 4,5 g (0,005 Mol) Z-L-Leucyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester⁸⁾ werden in 150 ml Methanol gelöst, mit 2,5 ml (0,02 Mol) Hydrazinhydrat versetzt und 18 Std. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Darauf wird das Hydrazid mit Eiswasser gefällt, abgenutscht, mit viel Wasser gewaschen und getrocknet. Es wird nochmals aus Dimethylformamid/Wasser umgefällt. Ausbeute 4 g (89%). Smp. 205–206°; $[\alpha]_D^{24} = -25,4^\circ$.

C₄₀H₅₆O₁₁N₆S₂ (881,0) Ber. C 54,52 H 6,41 N 11,80% Gef. C 54,31 H 6,47 N 11,91%

4. *Z-L-Leucyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -[N α -(+)-isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (VIa)*. 13,7 g (0,015 Mol) Z-L-Leucyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-hydrazid (Va) werden unter starkem Rühren in 200 ml 50-proz. Essigsäure, 11 ml 3 N HCl und 300 ml Essigester gelöst und bei -5° mit 1,13 g (0,016 Mol) NaNO₂ in 10 ml Wasser versetzt. Nach 20 Min. Rühren bei -5° wird die Essigesterlösung abgetrennt, je 2mal mit 10-proz. NaCl-Lösung, 5-proz. NaHCO₃-Lösung und 10-proz. NaCl-Lösung eiskalt gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und mit einer eiskalten Lösung von 20 g (0,015 Mol) Hexapeptidesterbase IV in 100 ml Dimethylformamid vereinigt. Nach gutem Durchmischen wird die Lösung über Nacht im Eiskasten aufbewahrt und darauf mit 1 N HCl, Wasser, 5-proz. NaHCO₃-Lösung und Wasser neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird je 1mal aus Äthanol-Äther und Methanol/Äther

³⁶⁾ 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 $\pm 2^\circ$.

³⁷⁾ K. VOGLER, J. WÜRSCH, R. O. STUDER & P. LANZ, *Chimia* 14, 379 (1960).

umgefällt. Ausbeute 14,2 g (44%). Smp. 200–203°; $[\alpha]_D^{20} = -15,5^\circ$; ϵ bei 257 $m\mu = 2635$, ber. 2655 (Eisessig 40 mg%).

$C_{99}H_{136}O_{26}N_{16}S_5$	Ber. C 55,91	H 6,45	N 10,54	S 7,54%
(2156,51)	Gef. „ 55,85	„ 6,46	„ 10,53	„ 7,50%

5. L-Leucyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -[N α -(+)-isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester-hydrochlorid (VIIa) (durch Hydrierung von VIa). 20 g (0,0092 Mol) Decapeptid VIa werden unter Erwärmen in 250 ml Eisessig und 20 ml Wasser gelöst und bei Raumtemperatur über Pd-Kohle hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird vom Katalysator abgenutscht, das Filtrat in 2 l eiskalter 0,1N HCl ausgerührt, der Niederschlag abgenutscht, mit viel Wasser gewaschen und getrocknet. Die Substanz wird noch 1mal aus Methanol/Äther umgefällt. Ausbeute 17,3 g (91%). Der Ninhydrinwert entspricht 1,06 NH $_2$ -Gruppen.

6. L-Leucyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -[N α -(+)-isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin (VIIIa) (durch Verseifung von VIIa). 17,3 g (0,0084 Mol) Decapeptid VIIa werden in 200 ml Methanol gelöst, mit 12,6 ml 2N NaOH versetzt und 18 Std. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Darauf wird mit Eisessig sauer gestellt und in 2 l 10-proz. NaCl-Lösung ausgerührt, abgenutscht, mit viel Wasser gewaschen und getrocknet. Die Substanz wird nochmals aus Methanol/5-proz. NaCl-Lösung umgefällt, abgenutscht, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute 16 g (93%). Aus dem Ninhydrinwert werden 1,0 NH $_2$ -Gruppen und aus der Mikrotitration 0,96 COOH-Gruppen errechnet.

7. For-L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -[N α -(+)-isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (VIb). 2,22 g (0,003 Mol) For-L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -[N α -(+)-isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (VIb)¹⁰ werden in 35 ml Eisessig, 2,1 ml 3N HCl und 25 ml Wasser gelöst und bei -10° mit 216 mg (0,003 Mol) NaNO $_2$ in 5 ml Wasser versetzt. Nach 10 Min. Rühren bei -10° wird das Azid mit Eiswasser gefällt, abgenutscht, mit Eiswasser, eiskalter 5-proz. NaHCO $_3$ -Lösung und Eiswasser gewaschen und scharf abgepresst. Es wird darauf in eine auf -5° gekühlte Lösung von 3,84 g (0,003 Mol) Hexapeptidesterbase IV in 30 ml Dimethylformamid eingetragen und bis zur vollständigen Lösung bei -5° gerührt und die Lösung anschliessend 18 Std. im Eiskasten aufbewahrt. Nach Filtration wird mit 400 ml Äthanol versetzt, 1 Std. bei 0° stehengelassen, der entstandene gelartige Niederschlag abgenutscht, mit Alkohol gewaschen und getrocknet. Das Decapeptid wird aus Dimethylformamid/Äthanol umgefällt. Ausbeute 2,7 g (45%), Smp. 222–224°. $[\alpha]_D^{24} = -16,0^\circ$.

$C_{95}H_{132}O_{25}N_{16}S_3$	Ber. C 57,21	H 6,66	N 11,23	S 4,82%
(1994,3)	Gef. „ 57,39	„ 6,76	„ 11,19	„ 4,77%

8. L-Leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -[N α -(+)-isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (VIIb) (durch Deformylierung von VIb). 3 g Decapeptid VIb werden in 100 ml Dimethylformamid gelöst und mit 100 ml, 14 Tage bei 20° aufbewahrter 4N methanolischer Salzsäure versetzt. Im Abstand von 1 Std. werden noch 2mal je 100 ml 4N HCl in Methanol zugegeben und darauf die Lösung 18 Std. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das Methanol wird bei 30° unter vermindertem Druck abdestilliert, der Rückstand unter Eiskühlung mit Triäthylamin auf pH 8–9 eingestellt und in 1 l Eiswasser ausgerührt, abgenutscht, mit viel Wasser gewaschen und getrocknet. Es wird nochmals aus Dimethylformamid/1-proz. NaCl-Lösung umgefällt, abgenutscht, mit viel Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute 2,7 g (90%). Der Ninhydrinwert entspricht 1,07 NH $_2$ -Gruppen.

9. L-Leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -[N α -(+)-isopelargonyl-N γ -Tos-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin (VIIIb) (durch Verseifung von VIIb). 21 g (0,0106 Mol) deformyliertes Decapeptid VIIb werden in 320 ml Dimethylsulfoxid gelöst, mit 16,2 ml (0,016 Mol) 1N NaOH versetzt und 18 Std. bei Raumtemperatur aufbewahrt. Darauf wird das pH mit Eisessig auf ca. 6 eingestellt, die Lösung in 2 l 2-proz. NaCl-Lösung ausgerührt und

der Niederschlag abgenutscht, mit viel Wasser gewaschen und getrocknet. Die Substanz wird aus Pyridin/Wasser umgefällt. Ausbeute 19 g (90%). Smp. 208–209°. $[\alpha]_D^{24} = -17,6^\circ$. Die Mikrotitration ergibt 0,98 COOH-Gruppen.

$C_{93}H_{130}O_{24}N_{16}S_3$ (1952,2) Ber. C 57,21 H 6,71 N 11,48% Gef. C 57,26 H 6,78 N 11,67%

10. *Cyclisierung von VIII b*. 8 g (0,0041 Mol) Decapeptid VIII b werden in 10 l Dimethylformamid gelöst und unter kräftigem Rühren zu einer Lösung von 320 g (1,5 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid in 40 l Dioxan gegeben. Die Lösung wird 5 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt, darauf mit 350 ml 50-proz. Essigsäure versetzt und bei 35° auf 1 l konzentriert. Vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff wird abgenutscht und das Filtrat zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in 500 ml Dimethylformamid gelöst, von einer weiteren Menge Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und erneut bei 35° zur Trockne verdampft. Dieser Prozess wird noch 3mal wiederholt. Darauf wird in 100 ml Dimethylformamid gelöst und mit 1 l Äther/Petroläther 2:1 gefällt, filtriert, mit Äther gewaschen und getrocknet. Die anfallende Substanz wird nochmals aus Dimethylformamid/Äther umgefällt. In analoger Weise werden weitere 8 g Decapeptid VIII b und ein entsprechend kleiner dimensionierter Ansatz zu 2 g Decapeptid VIII b cyclisiert und aufgearbeitet. Aus den drei Ansätzen erhält man 14 g Rohprodukt.

Analoge Cyclisierungsversuche wurden mit etwa gleicher Ausbeute mit dem Decapeptid VIII a durchgeführt.

11. *Entfernung der Schutzgruppen*. 4 g Roh-Cyclisierungsprodukt werden in 800 ml flüssigem Ammoniak gelöst und mit Na bis zu einer 20 Min. bestehenden Blaufärbung reduziert. Darauf werden 3,2 g Ammoniumchlorid zugegeben, das Ammoniak verdampft und letzte Spuren durch Evakuieren im Wasserstrahlvakuum entfernt. Der Rückstand wird in 100 ml Eiswasser gelöst, bei 0° mit 6N HCl auf pH 6 eingestellt, filtriert und das Filtrat lyophilisiert. Auf analoge Weise werden noch zwei Ansätze à 4 g und ein Ansatz à 2 g Rohprodukt reduziert. Die Lyophilisate aller Reduktionsversuche werden in Wasser gelöst, vereinigt und nochmals lyophilisiert. Man erhält ca. 30 g Rohprodukt mit einer Aktivität von 316 E/mg gegen *Brucella bronchiseptica* ATCC 4617.

12. *Reinigung des Cyclisierungsproduktes*. – a) *Gegenstromverteilung*. Das salzhaltige Rohprodukt wurde mehreren multiplikativen Verteilungen über insgesamt 2500 Stufen im System *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (40:10:5:45) unterworfen. Die Verteilungskurven erhielten wir durch Umsetzen von je 0,2 ml unterer Phase mit FOLIN-DENIS-Reagens und Bestimmung der optischen Dichten bei 750 μ . Die Verteilungen wurden zudem dünnschichtchromatographisch und durch Erstellen von (mikrobiologischen) Aktivitätsbilanzen kontrolliert. Es resultierten 725 mg einer leicht klebrigen Hauptfraktion mit einer Aktivität von ca. 2100 E/mg gegen *Brucella bronchiseptica* ATCC 4617.

b) *Umfällen über die freie Base*. Die lyophilisierte Verteilungs-Hauptfraktion wurde in 10 ml Wasser gelöst und unter Eis-Kochsalzkühlung NH_3 bis zur bleibenden Fällung eingeleitet. Nach 2 Std. Stehen unter Verschluss bei 0° wurde zentrifugiert, die Fällung 3mal mit 5-proz. eiskaltem Ammoniak gewaschen, in Wasser suspendiert und lyophilisiert. Nach 2maligem Wiederholen der Gefrier-trocknung wurde die Base in 0,1N HCl gelöst und als Hydrochlorid lyophilisiert.

Dieser Fällungsprozess wurde noch 5mal wiederholt; am Schluss verblieben 90 mg eines farblosen Pentahydrochlorids.

Die analytische Charakterisierung dieses Endproduktes ist in der Tabelle 1 zusammengefasst.

B. Charakterisierung des Endproduktes

1. *Versuche mit D-Aminosäureoxydase*. Je 1 μ Mol Polymyxin B_1 , sowie Decapeptid 7 α und 7 γ wurden in 0,5 ml 6N HCl 20 Std. bei 105° totalhydrolysiert⁵⁾. Die Hydrolysate wurden im Vakuum über KOH zur Trockne gebracht und die Salzsäure durch mehrmaliges Lösen mit Wasser und Eindunsten entfernt.

1. *Versuchsreihe*: Die neutralen Hydrolyseprodukte wurden in 0,40 ml Phosphatpuffer pH 8,0 (nach SOBRENSEN) gelöst, mit 5 mg D-Aminosäureoxydase (FLUKA, Rohprodukt) versetzt und unter O_2 -Atmosphäre 8 Std. bei 38° inkubiert. Die optimale Enzymkonzentration musste vorgängig durch Reihenversuche ermittelt werden; eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 Std. ergab keinen Unterschied gegenüber 8 Std.

Nach abgeschlossener Inkubation wurden direkt je 10–20 μ l der Lösungen, zusammen mit einer äquimolaren Phenylalanin-Vergleichsprobe, im Laufmittel *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) papierchromatographiert. Die getrockneten Papierchromatogramme wurden mit dem Ninhydrin-Tauchreagens nach RÖWE *et al.*³⁸⁾ entwickelt, die Phe-Zonen nach Überführen in den Cu-Komplex mit abs. Methanol eluiert und im BECKMAN-Spektrophotometer bei 504 μ gemessen.

Phe gef.	B ₁ 29,2	7 α 31,7	7 γ 28,6% (\pm 10%)
Phe oxydiert	„ 70,8	„ 68,3	„ 71,4%

2. *Versuchsreihe*: Die Totalhydrolysen wurden wie beschrieben durchgeführt. Die Inkubation erfolgte jedoch in einem Pyrophosphatpuffer pH 8,4 nach BENDER & KREBS³⁹⁾; in Pyrophosphatpuffern ist ja die Aktivität, bzw. die Stabilität der D-Aminosäureoxydase besonders hoch⁴⁰⁾. Tatsächlich erzielten wir so mit 0,5 mg D-Aminosäureoxydase pro 1 μ Mol Peptid bessere Abbauresultate als mit 5 mg Enzym bei der 1. Versuchsreihe.

Nebst den drei Hydrolysaten wurde diesmal auch eine äquimolare Menge reines D-Phe mit-inkubiert. Nach der Inkubation (8 Std., 38°, O₂) wurden je 30 μ l (entsprechend \sim 12 μ g Phe) zur Chromatographie aufgetragen; auf den gleichen Papieren liefen die entsprechenden, nicht inkubierten Proben mit, auf deren Phe-Gehalt bei der Auswertung die oxydierten Proben bezogen wurden. Die Auswertung der Papierchromatogramme erfolgte wiederum photometrisch über den Ninhydrin-Cu-Komplex (vgl. Tabelle 2).

2. *Versuche mit L-Aminosäureoxydase* (Sigma, Typ III, hochgereinigtes Pulver aus *Crotalus adamanteus*-Gift). Sämtliche Inkubationsansätze wurden in folgendem Trispuffer pH 7,5 durchgeführt: Zur Herstellung der 2M-Stammlösung wurden 121,14 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (1 Mol) in 188,7 ml 4N HCl gelöst und mit Wasser auf 500 ml gebracht. 7,5 ml Stammlösung mit Wasser auf 100 ml verdünnt ergaben den gebrauchsfertigen 0,15M-Puffer von pH 7,5.

Die enzymatische Einwirkung wurde papierchromatographisch im System *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) – unter Anfärbung mit Ninhydrin – verfolgt. In diesem Laufmittel können alle Polymyxin-Aminosäuren unter sich und von der Tris-Substanz und der L-Aminosäureoxydase getrennt werden.

Ansätze mit reinen Aminosäuren: Je 1 μ Mol L-Leu, L-Phe und 5 μ Mol L-Dab in 0,30 ml Trispuffer wurden mit je 0,10 ml Trispuffer, enthaltend 10 μ g Enzym, versetzt und in einer Sauerstoffatmosphäre bei 38° inkubiert; in zwei weiteren, parallelen Versuchsreihen betrug die Zugabe von L-Aminosäureoxydase 100 bzw. 1000 μ g. Nach 1, 3, 6 und 24 Std. Inkubation wurden je 10–20 μ l entnommen und papierchromatographisch geprüft: L-Leu und L-Phe waren bereits nach 1 Std. in den Ansätzen mit der kleinsten Enzymzugabe (10 μ g) quantitativ oxydiert, während die L-Dab in der gleichen Reihe auch durch 24stündige Einwirkung überhaupt nicht angegriffen wurde. In der Versuchsserie mit der mittleren Enzymkonzentration (100 μ g) betrug die Oxydationsrate für die L-Dab nach 24 Std. ca. 20–30%, und in den Ansätzen mit 1000 μ g L-Aminosäureoxydase war auch für die L-Dab die Oxydation nach 24 Std. quantitativ. Diese Ergebnisse stimmen mit den Literaturangaben überein, wonach L-Leu und L-Phe die besten Substrate für die L-Aminosäureoxydase darstellen, während Diaminocarbonsäuren nur schwer oder nicht angegriffen werden.

Ansätze mit den Totalhydrolysaten von natürlichem Polymyxin B₁ und dem synthetischen Cyclodecapeptid 7 α : Je 1 μ Mol Polypeptid wurde unter normalen Bedingungen (6N HCl, 24 Std., 110°) hydrolysiert. Nach vollständiger Entfernung der Salzsäure wurden die Rückstände in 0,3 ml Trispuffer gelöst; nach Zugabe von 1 mg L-Aminosäureoxydase in 0,1 ml Trispuffer erfolgte die 24stündige Inkubation bei 38° in Sauerstoffatmosphäre. Zur Kontrolle wurden unter den gleichen Bedingungen äquimolare Mengen von L-Leu, L-Phe, D-Phe und L-Dab sowie eine Mischung von 1 μ Mol D-Dab und 5 μ Mol L-Dab mitinkubiert. Nach 24 Std. Einwirkung wurden direkt je 10 μ l chromatographiert. Auf den gleichen Papieren liefen ferner entsprechende Mengen der ursprünglichen, nicht oxydierten B₁- und 7 α -Hydrolysate, sowie alle Vergleichsaminosäuren in verschiedenen Konzentrationen mit.

³⁸⁾ K. RÖWE, E. FERBER & H. FISCHER, Z. physiol. Chem. 313, 174 (1958).

³⁹⁾ A. E. BENDER & H. A. KREBS, Biochem. J. 46, 210 (1950).

⁴⁰⁾ Siehe ¹⁸⁾, p. 1784.

Ergebnisse: Die inkubierte L-Leu-Kontrollprobe wurde quantitativ oxydiert; desgleichen fehlte bei den inkubierten B₁- und 7 α -Hydrolysaten der Leu-Fleck vollständig, während er bei den nicht oxydierten Hydrolysatproben in einer der äquimolaren Vergleichslösung entsprechenden Farbintensität auftrat. Der Phe-Fleck blieb in den mit L-Aminosäureoxydase behandelten B₁- und 7 α -Hydrolysaten voll erhalten; ebenso natürlich in der inkubierten D-Phe-Kontrolle, während die inkubierte L-Phe-Probe quantitativ abgebaut wurde. Diese Ergebnisse bestätigen indirekt unsere Befunde mit der D-Aminosäureoxydase. Bei den mit L-Aminosäureoxydase behandelten B₁- und 7 α -Hydrolysaten verblieb in Dab-Position ein deutlich abgeschwächter Fleck, während die inkubierte L-Dab-Kontrollprobe vollständig abgebaut wurde. Die Farbintensität der nicht oxydierten Dab-Anteile in den Hydrolysaten entsprach derjenigen der inkubierten Vergleichsmischung aus 1 μ Mol D-Dab und 5 μ Mol L-Dab.

Der Thr-Fleck trat sowohl im B₁- wie im 7 α -Hydrolysat vor und nach der Einwirkung von L-Aminosäureoxydase gleich stark auf; es ist bekannt, dass L-Thr von L-Aminosäureoxydase nicht angegriffen wird¹⁸).

3. *Einfluss des Überschusses von Carbodiimid.* Carbobenzylierung von Polymyxin-B-Sulfat (PFIZER): 300 mg Handelsprodukt wurden in 15 ml Wasser gelöst und unter Eiskühlung und Rühren innerhalb 1 Std. 1,0 ml Carbobenzylochlorid zugetropft. Während der 6stündigen Reaktionsdauer wurden noch zweimal je 0,2 ml Carbobenzylochlorid zugegeben. Der pH-Wert der Reaktion von 8,0 wurde mit 1N NaOH über das Magnetventil des Radiometer-Titrators konstant gehalten. Nach abgeschlossener Reaktion und Stehenlassen über Nacht im Kühlschrank wurde der Niederschlag abzentrifugiert, zuerst mit Eiswasser, dann mit Äther gut gewaschen und im Vakuum getrocknet; es resultierten 390 mg feinkörniges, nur in Dimethylformamid lösliches, ninhydrin-negatives Pulver.

Stabilitätstest unter Cyclisierungsbedingungen: 300 mg voll carbobenzyliertes Handelsprodukt wurden in 330 ml Dimethylformamid und 1,5 l Dioxan gelöst und mit einer Lösung von 12 g Dicyclohexylcarbodiimid in 50 ml Dimethylformamid versetzt. Nach 4 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur wurde mit 15 ml 50-proz. Essigsäure versetzt, das Dioxan im Wasserstrahlvakuum bei 40° entfernt, die Lösung im Hochvakuum auf 50 ml konzentriert, vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und das Filtrat im Hochvakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in 20 ml Dimethylformamid gelöst, von einer weiteren Menge Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und erneut im Hochvakuum bei 40° eingedampft. Dieser Prozess wurde nochmals wiederholt. Darauf wurde in 10 ml Dimethylformamid gelöst und mit 80 ml Äther/Petroläther (2:1) gefällt, filtriert, mit Äther gewaschen, in 5 ml Dimethylformamid gelöst und neuerdings mit Äther ausgefällt, filtriert, mit Äther gewaschen und getrocknet (160 mg).

Entfernung der Schutzgruppen: Die Reduktion erfolgte mit Na/NH₃ nach der bereits beschriebenen Methode (sub. A/11). Das rohe Reduktionsprodukt wurde wie üblich als Hydrochlorid lyophilisiert und zur Reinigung 2mal bei 0° mit NH₃ über die freie Base umgefällt. Das Endprodukt (50 mg Pentahydrochlorid) ergab auf dem Dünnschichtchromatogramm einen einheitlichen Polymyxin-Fleck und als Ni-Komplex ein verändertes, qualitativ und quantitativ dem des eingesetzten Handelsprodukts entsprechendes Rotationsdispersions-Spektrum.

C. Herstellung der Nickelkomplexe und Rotationsdispersions-Messung

1. *Nickelkomplexe.* Die Nickelkomplexe wurden durch Zusammengeben von äquimolaren Mengen Peptid und Nickelsulfat und Einstellen des pH mit 0,1N NaOH auf pH 9,4²⁴) hergestellt. Die Peptidkonzentration in der Endlösung betrug etwa 0,10%.

Die RD.-Spektren wurden in unserer physikalisch-chemischen Abteilung von Dr. F. BURKHARDT mit einem automatischen, selbstabgleichenden Polarimeter aufgenommen.

2. *Säulenchromatographische Rückgewinnung von Polymyxin B aus einem gealterten N-Komplex.* 20 mg Polymyxin-B-sulfat (PFIZER) wurden wie üblich in den Nickelkomplex übergeführt. Die Lösung (pH 9,4) wurde 7 Tage bei Raumtemperatur gelagert; anschliessend wurde das pH mit 0,1N HCl auf 4 eingestellt und die Lösung an einem Sephadex-G-25-Medium chromatographiert. Das Sephadex wurde vorgängig in 0,05M NaCl-Lösung suspendiert und auf der Säule (20 \times 200 mm) mit Wasser salzfrei gewaschen. Der Verlauf der Chromatographie konnte durch

Prüfung mit Ninhydrin und Rubeanwasserstoff (Platten und Tüpfelproben) kontrolliert werden. Es gelang in einem Arbeitsgang, das Peptid vom Nickel und Salz abzutrennen. Die das Polymyxin enthaltenden 1-ml-Fractionen 16–20 wurden vereinigt und lyophilisiert. Das aus dem denaturierten Ni-Komplex auf diese Weise zurückgewonnene Polymyxin B unterschied sich dünnschichtchromatographisch (*n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24) nicht von nativem Polymyxin B «PFIZER», gab jedoch bereits in frischer Lösung als Ni-Komplex ein gealtertes RD.-Spektrum (vgl. Fig. 7).

Die Mikroanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung unter der Leitung der Herren Dres. H. WALDMANN und A. DIRSCHERL ausgeführt.

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.

Die DEBYE-SCHERRER-Pulverdiagramme verdanken wir Hrn. Dr. C. VON PLANTA aus unserer physikalischen Abteilung.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über die Synthese des cyclo-Decapeptides 7γ berichtet. Als Ergebnis unserer Bemühungen zur Strukturaufklärung von Polymyxin B₁ durch Synthese wird festgestellt, dass keine der möglichen Formeln 8α , 8γ , 7α und 7γ , die durch Abbau hergeleitet wurden, mit der Struktur von Polymyxin B₁ übereinstimmen, obwohl 7α und 7γ eine bemerkenswerte antimikrobielle Aktivität *in vitro* und *in vivo* aufweisen.

Der wichtigste Unterschied der aktiven synthetischen Präparate gegenüber dem Naturprodukt liegt in der spezifischen Drehung, sowie vor allem in der Rotationsdispersion der Nickelkomplexe bei pH 9,3. Das Naturprodukt zeigt gegenüber 7α und 7γ eine bemerkenswerte irreversible Alkalilabilität sowie Unterschiede in der antimikrobiellen Aktivität.

Durch zusätzliche Versuche wird festgestellt, dass dieser Unterschied weder auf Partialracemisierung noch auf Nebenreaktionen bei der Cyclisierung, Abspaltung der Schutzgruppen durch Na und NH₃ oder Inaktivierung durch Gegenstromverteilung der synthetischen Präparate beruhen kann.

Chemische und Medizinische Forschungsabteilung der
F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AG, Basel
