

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Teil III: C. TOMLINSON, CH. CHYLEWSKI & W. SIMON, *Tetrahedron* **19**, 949 (1963).
 [2] A. V. HILL, *Proc. Roy. Soc. London A* **727**, 9 (1930).
 [3] E. J. BALDES, *J. sci. Instr.* **11**, 223 (1934).
 [4] A. P. BRADY, H. HUFF & J. W. MCBAIN, *J. physic. Colloid Chem.* **55**, 304 (1951).
 [5] I. LANGMUIR, E. Q. ADAMS & G. S. MEIKLE, *Trans. electrochem. Soc.* **24**, 53 (1914).
 [6] DOROTHEE WEGMANN, C. TOMLINSON & W. SIMON, *Microchemical Journal Symposium Series, Vol. II, Microchemical Techniques*, University Park 1961, N. D. Cheronis ed., New York, London 1962, S. 1069.
 [7] CH. CHYLEWSKI, *Diss. ETH.*, Zürich 1963.
 [8] *International Critical Tables*, Bde. 1-5, McGraw-Hill Co., New York 1925-1933; *VDI-Wärmeatlas*, VDI-Verlag, Düsseldorf 1953.
 [9] O. P. KHARABANDA, *Nomograms for Chemical Engineers*, Heywood & Co., London 1958.
 [10] R. MÜLLER & H. J. STOLTEN, *Analyt. Chemistry* **25**, 1103 (1953).
 [11] R. R. ROEPKE, *J. physic. Chemistry* **46**, 359 (1942); W. SIMON & C. TOMLINSON, *Chimia* **14**, 301 (1960).
 [12] S. BRUCKENSTEIN, *School of Chemistry, University of Minnesota, Minneapolis 14, Minn.*, Privatmitteilung.

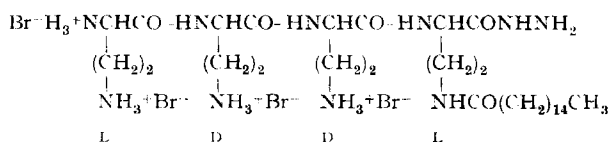
61. Fettsäurehaltige basische Peptide mit antibakterieller Wirkung

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

(11. I. 64)

I. Einleitung. - Seit einer Reihe von Jahren haben wir uns auf synthetischem Wege mit der Strukturaufklärung von Polymyxin B₁ [1]¹⁾ beschäftigt. Obwohl es bis jetzt nicht gelungen ist, die Struktur dieses Antibioticums endgültig aufzuklären [2], steht seit langem fest, dass es eine höhere Fettsäure, die (+)-6-Methyloctansäure, sowie eine Reihe von α,γ -Diaminobuttersäureresten mit freier γ -Aminogruppe enthält [3] [4]. Aus diesen Gründen können Polymyxin B₁ [4], die Polymyxine im allgemeinen [5], sowie Circulin A und B [6] in ihrer Salzform als Invertseifen aufgefasst werden. Neben ihrer cyclischen Natur und dem Gehalt an D-Aminosäuren kann ihre Wirksamkeit wohl teilweise diesem Invertseifencharakter zugeschrieben werden.

Als Weiterentwicklung auf diesem Gebiete hatten wir uns die Aufgabe gestellt, *in vivo* wirksame, einfache offenkettige Abkömmlinge dieser Substanzklasse aufzubauen [7], die technisch gut zugänglich sind und praktische Verwendung finden sollten. Ein solches Vorgehen wurde durch die Tatsache erleichtert, dass auch in der Natur antibakteriell wirksame Metaboliten aus Mikroorganismen mit offenkettiger Peptidstruktur, wie z. B. das Esperin [8] oder das Viscosin [9], aufgefunden werden



5 (Tabelle 1)

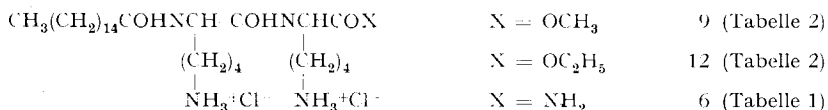
¹⁾ Die Ziffern in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, Seite 544.

konnten. Diese Stoffe enthalten indessen keine basischen Aminosäuren, wohl aber höhere Fettsäuren.

Das erste von uns in dieser Reihe hergestellte basische Acylpeptid, das Tetrapeptid 5, erwies sich *in vitro* als antibakteriell aktiv, zeigte aber keine Wirkung gegen systemische Infektionen.

Wir vereinfachten deshalb unsere Problemstellung, indem primär *in vitro* aktive Derivate gesucht werden sollten. Solche Verbindungen könnten als Konservierungsmittel geprüft werden, falls sie aus L-Bausteinen zusammengesetzt sind und demzufolge im Verdauungstrakt zu natürlichen Ausgangsmaterialien abgebaut werden. Das Tetrapeptid 5 erfüllt dieses Postulat allerdings nicht, da es neben einer D-Aminosäure auch noch eine Säurehydrazidgruppe enthält.

II. Struktur und antimikrobielle Wirkung. - An Hand von ausgewählten Vertretern analoger Verbindungsgruppen soll nun mit Hilfe von tabellarischen Zusammenstellungen der Weg aufgezeigt werden, der vom Tetrapeptid 5 zu einfachen Dipeptiden des Lysins (9, 12, 6) geführt hat, die in bezug auf Wirksamkeit *in vitro* und Zugänglichkeit in dieser Reihe ein Optimum darstellen²⁾.



Diese Analoga sind nach den für die jeweilige Betrachtung wichtigen chemischen Merkmalen in Tabellen geordnet, in denen die antibakterielle Wirksamkeit der einzelnen Vertreter angegeben ist. Dabei wird eine Reihe von GRAM-positiven und GRAM-negativen Erregern berücksichtigt; die höchste Aktivität wird willkürlich mit ++++ bezeichnet, deren Bedeutung unter III erklärt ist. Ein Minuszeichen bedeutet Inaktivität, d.h. es ist für eine absolute Wachstumshemmung aller geprüften Erreger eine Konzentration nötig, die eine von uns willkürlich festgelegte Grenze von 156 $\mu\text{g/ml}$ übersteigt.

A) *Einfluss der Kettenlänge und der Stellung des Fettsäurerestes.* Tabelle 1 erläutert den Einfluss der Peptidkettenlänge auf die antibakterielle Aktivität, und zwar zunächst mit dem Fettsäurerest in der N^ω -Stellung der carboxyl-endständigen Aminosäure. Dabei steigt die Wirkung ausgehend von der Aminosäure über das Di- zum Tripeptid bei Lysin. Gleiche Ergebnisse wurden in der hier nicht besonders aufgeführten α, γ -Diaminobuttersäure-Reihe erhalten. Am wirksamsten ist das Tetrapeptid 5, das aber gegenüber der Lysinreihe in der Wirksamkeit deutlich abfällt. Die beste Aktivität erzielten wir bei Dipeptiden mit dem Fettsäurerest in N^α -Stellung. Die Lysinabkömmlinge waren auch hier den Derivaten der α, γ -Diaminobuttersäure überlegen. Im Dipeptid 6 wurde das Wirkungsoptimum gefunden.

B) *Einfluss der Basizität.* In den folgenden Betrachtungen beschränken wir uns auf die Besprechung von Dipeptiden. Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, dass für eine gute

²⁾ Nachstehend werden folgende Abkürzungen gebraucht: Aminosäuren werden wie üblich mit den drei Buchstaben ihres Trivialnamens abgekürzt; α, γ -Dab = α, γ -Diaminobuttersäure. Die Konfiguration wird nur angegeben, wenn sie von der D- oder DL-Form ist. Keine Konfigurationsangabe bedeutet L-Form. Die Peptidbindung wird mit \rightarrow bezeichnet. DMF = Dimethylformamid, THF = Tetrahydrofuran, DCCD = Dicyclohexyl-carbodiimid, For = Formyl, Z = Benzyloxycarbonyl.

Tabelle 1. Einfluss der Peptidkettenlänge und der Stellung des Fettsäurerestes auf die antibakterielle Wirkung

Nr.	Peptid oder Aminosäurederivat	Antibakterielle Wirkung Gram-positiv Gram-negativ	Bruttoformel	% C		% H		% N		% Hal	
				Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.
<i>Palmitylrest in N^o-Stellung</i>											
1	H-(N ^o -Palm)-Lys-OH	+	-	C ₂₈ H ₄₄ O ₃ N ₂	68,70	68,61	11,53	11,36	7,28	7,28	7,56
2	H-(N ^o -Palm)-Lys-OCH ₃ ·HCl	+	(+)	C ₂₃ H ₄₇ O ₃ N ₂ Cl	63,59	63,47	10,86	10,76	6,42	6,77	
3	H-Lys→(N ^o -Palm)-Lys-OCH ₃ ·2HCl	+	+	C ₂₈ H ₆₀ O ₄ N ₄ Cl ₂							11,82 12,00
4	H-Lys-Lys→(N ^o -Palm)-Lys-OCH ₃ ·3HCl	+	+	C ₃₃ H ₇₃ O ₅ N ₆ Cl ₃							13,91 14,19
5	H-Dab→D-Dab→D-Dab→ (N ^o -Palm)-Dab-NHNH ₂ ·4HBr	+	+	C ₃₂ H ₇₀ O ₃ N ₁₀ Br ₄					14,08	14,24	32,14 32,03
<i>Palmitylrest in N^o, resp. N^o, Stellung bei Dipeptiden</i>											
6	N ^o -Palm-Lys→Lys-NH ₂ ·HCl	+	+	C ₂₈ H ₅₉ O ₃ N ₅ Cl ₂	57,54	57,13	10,17	10,13	11,97	11,84	12,12 11,90
7	H-Lys→(N ^o -Palm)-Lys-NH ₂ ·2HBr	+	+	C ₂₈ H ₅₉ O ₃ N ₅ Br _{2,3}							26,33 26,68
8	H-Lys→(N ^o -Palm)-Lys-NHNH ₂ ·3,2HBr	+	+	C ₂₈ H ₆₁ O ₃ N ₆ Br _{3,25}	42,58	42,53	7,82	8,06	10,64	10,46	32,88 32,86

Tabelle 2. Einfluss der Basizität von Acyl-dipeptiden auf die antibakterielle Wirkung

Nr.	Peptidderivat	Antibakterielle Wirkung Gram-positiv Gram-negativ	Bruttoformel	% C		% H		% N		% Hal	
				Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.
<i>Art der Aminosäure</i>											
9	N ^o -Palm-Lys→Lys-OCH ₃ ·2HCl	+	+	C ₂₈ H ₆₀ O ₄ N ₄ Cl ₂	58,07	58,29	10,08	10,22	9,34	9,35	
10	N ^o -Palm-Lys→Ser-OCH ₃ ·HCl	+	+	C ₂₈ H ₅₅ O ₅ N ₃ Cl	58,53	58,20	9,93	9,90	7,85	7,75	7,82 7,53
11	N ^o -Palm-Glu→Glu-OH	-	-	C ₂₈ H ₄₆ O ₃ N ₂	60,68	60,87	9,01	8,90	5,44	5,44	
<i>Natur der endständigen Carboxylfunktion</i>											
6	N ^o -Palm-Lys→Lys-NH ₂ ·2HCl	+	+	Vgl. Tabelle 1							
12	N ^o -Palm-Lys→Lys-OC ₂ H ₅ ·2HCl	+	+	C ₃₀ H ₆₂ O ₄ N ₄ Cl ₂	58,71	58,72	10,18	9,88			11,55 11,63
13	N ^o -Palm-Lys→Lys-OH·HCl	+	+	C ₂₈ H ₅₇ O ₄ N ₄ Cl							6,45 6,01
<i>Art der basischen Aminosäure</i>											
14	N ^o -Palm-Orn→Orn-OCH ₃ ·2HCl	+	+	C ₂₇ H ₅₆ O ₄ N ₄ Cl ₂	56,72	56,60	9,87	9,74			12,41 12,15
15	N ^o -Palm-Lys→Dab-OCH ₃ ·2HCl	+	+	C ₂₇ H ₅₆ O ₄ N ₄ Cl ₂							12,41 12,24
9	N ^o -Palm-Lys→Lys-OCH ₃ ·2HCl	+	+	C ₂₉ H ₆₀ O ₄ N ₄ Cl ₂	58,07	58,29	10,08	10,22	9,34	9,35	
16	N ^o -Palm-Orn→Arg-OCH ₃ ·2HCl	+	+	C ₂₈ H ₅₈ O ₄ N ₆ Cl ₂	54,79	54,71	9,53	9,65	13,70	13,70	
17	N ^o -Palm-Arg→Arg-OC ₂ H ₅ ·2HCl	+	+	C ₃₀ H ₆₂ O ₄ N ₆ Cl ₂	53,79	53,36	9,33	9,35	16,73	16,75	

Tabelle 3. Einfluss der Länge des Fettsäurerestes auf die antibakterielle Wirkung des Dipetids $Ac-Lys \rightarrow Lys-OCH_3 \cdot 2HCl$

Nr. Peptidderivat	Antibakterielle Wirkung	Bruttoformel	%C		%H		%N		%Hal.	
			Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.	Ber.	Gef.
X = -Lys \rightarrow Lys-OCH ₃ · 2HCl	Gram-positiv									
Gram-negativ										
18 CH ₃ CO-X	-	C ₁₅ H ₃₂ O ₄ N ₄ Cl ₂	62,18	62,26	7,07	7,12	9,36	9,35		
19 CH ₃ (CH ₂) ₂ CO-X	-	C ₁₇ H ₃₄ O ₄ N ₄ Br ₂							32,23	32,46
20 CH ₃ (CH ₂) ₆ CO-X	-	C ₂₁ H ₄₄ O ₄ N ₄ Cl ₂							14,51	14,19
21 CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO-X	+	C ₂₅ H ₅₂ O ₄ N ₄ Cl ₂	55,23	55,47	9,64	9,63			13,05	13,00
22 CH ₃ (CH ₂) ₁₁ CO-X	+(+)	C ₂₆ H ₅₄ O ₄ N ₄ Cl ₂	56,00	55,75	9,75	9,43			12,72	12,70
23 CH ₃ (CH ₂) ₁₂ CO-X	+++ (+)	C ₂₇ H ₅₆ O ₄ N ₄ Cl ₂	56,72	56,82	9,87	9,70			12,41	12,30
24 CH ₃ (CH ₂) ₁₃ CO-X	+++ (+)	C ₂₈ H ₅₈ O ₄ N ₄ Cl ₂	57,42	57,55	9,98	9,82			12,11	12,10
9 CH ₃ (CH ₂) ₁₄ CO-X	++++	C ₂₉ H ₆₀ O ₄ N ₄ Cl ₂								
25 CH ₃ (CH ₂) ₁₅ CO-X	+++ (+)	C ₃₀ H ₆₂ O ₄ N ₄ Cl ₂	58,70	58,45	10,18	10,07			11,55	11,51
26 CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CO-X	+++	C ₃₂ H ₆₆ O ₄ N ₄ Cl ₂	59,88	59,80	10,36	10,23			11,05	11,01
27 CH ₃ (CH ₂) ₁₈ CO-X	+++	C ₃₃ H ₆₈ O ₄ N ₄ Cl ₂	60,43	60,52	10,45	10,24			10,81	10,68
28 C ₁₀ H ₁₋₃₃ CO-X (Phytanoyl)	+++	C ₃₃ H ₆₈ O ₄ N ₄ Cl ₂	60,43	60,13	10,45	10,38			10,81	10,68

Wirksamkeit offenbar eine starke Basizität erforderlich ist. Ein Einbau neutraler oder saurer Aminosäuren setzt die antibakterielle Wirkung herab oder bringt sie ganz zum Verschwinden (11). Eine Steigerung der Basizität durch Verschluss des endständigen Carboxyls, z.B. durch eine Amino- oder Ester-Gruppe, wirkt sich dagegen wirkungssteigernd aus (12, 13).

Unter den basischen Aminosäuren war Lysin (9) am wirksamsten. Weshalb das Arginindipeptid 17, das die grösste Basizität aufweist, gegenüber den Lysindipeptiden zurückfällt, ist uns nicht klar geworden. Dies hängt wohl mit der besonderen Natur der Guanidinogruppe zusammen.

C) *Einfluss der Länge des Fettsäurerestes.* In Tabelle 3 kann die Überlegenheit des Palmitinsäurerestes (C_{16}), gegenüber Fettsäureresten anderer Kettenlänge, in der Dipeptidreihe demonstriert werden. Ähnliche Beobachtungen wurden an quaternären Ammoniumsalzen [10] gemacht.

D) *Anteil der einzelnen Komponenten eines Dipeptides N^{α} -Palm-Lys \rightarrow Lys-OCH₃, 2HCl.* In der Entwicklung von verwertbaren Abkömmlingen der vorliegenden Reihe war die Frage nach der Wirksamkeit der Komponenten der Dipeptide von Wichtigkeit. Aus Tabelle 4 geht hervor, dass der Ersatz eines Dipeptids durch eine acylierte basische Aminosäure (30) eine beträchtliche Wirkungseinbusse, im besonderen gegenüber den GRAM-negativen Erregern, mit sich bringt. Für ein breites Spektrum gegen GRAM-positive und GRAM-negative Mikroorganismen ist somit ein Acyldipeptid erforderlich. Das nicht acylierte Dipeptid ist ebenfalls wirkungslos.

Tabelle 4. *Einfluss der einzelnen Komponenten eines Dipeptides auf die antibakterielle Wirkung*

Nr.	Dipeptid resp. Komponenten	Antibakterielle Wirkung	
		Gram-positiv	Gram-negativ
29	Palmitinsäure	—	—
30	N^{α} -Palm-Lys-OH·HBr	+++	(+)
31	H-Lys-OCH ₃ ·2HCl	—	—
9	N^{α} -Palm-Lys \rightarrow Lys-OCH ₃ ·2HCl	++++	++++

E) *Einfluss der Konfiguration.* Da es sich bei den beschriebenen Dipeptiden um oberflächenaktive Stoffe handelt, die systemisch inaktiv sind, war zu erwarten, dass die Konfiguration der verwendeten Aminosäuren keine entscheidende Rolle spielen würde. In der Tat fanden wir mit unserer Versuchsanordnung keine Wirkungsunterschiede zwischen den L, D und racemischen Formen von N^{α} -Palmitoyl-lysyl-lysin (Tabelle 7, Präparate 12, 6, 32, 33 und 34).

III. - Mikrobiologische und biologische Eigenschaften der Acyl-dipeptide

A) *Antimikrobielles Wirkungsspektrum.* Die antibakterielle Wirkung wurde mit dem üblichen Dilutionsverfahren unter Verwendung von Glucose- und Eiweiss-haltigen Nährmedien geprüft, und die Hemmungs- und Abtötungswerte wurden in Tabelle 5 zusammengestellt. Als Beispiel wurde die Aktivität von N^{α} -Palmitoyl-L-lysyl-L-lysin-äthylester-dihydrochlorid (12) verglichen mit zwei quaternären Ammoniumbasen und zwei Breitspektrum-Antibiotica. Vertreter der GRAM-positiven Bakterien-

Tabelle 5. Antibakterielle Wirkung im Vergleich mit quaternären NH_4 -Salzen und Antibiotica

	N α -Palm-Lys \rightarrow Lys-OC $_2$ H $_5$ ·2HCl (Nr. 12)		Tolytrimonium- methylsulfat ¹⁾		Triclobisonium- chlorid ²⁾		Chloramphenicol		Oxytetracyclin	
	h	a	h	a	h	a	h	a	h	a
GRAM-positive										
<i>Diphlococcus pneumoniae</i>	5	39	3	3	5	5	39	156	20	78
<i>Streptococcus haemolyticus</i> β	5	5	5	10	5	10	156	625	78	156
<i>Bacillus anthracis</i>	5	5	5	5	5	5	156	1250	10	78
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA	10	10	10	10	5	5	20	78	5	5
<i>Enterococcus haemolyticus</i>	20	156	3	3	10	39	312	625	20	312
GRAM-negative										
<i>Escherichia coli</i>	5	20	39	39	78	78	20	312	5	156
<i>Salmonella enteritidis</i> GÄRTNER	10	20	39	39	20	156	10	625	39	39
<i>Salmonella typhi</i> murium	10	39	39	39	20	78	20	156	10	78
<i>Shigella flexneri</i>	5	5	5	5	5	5	156	156	20	39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39	156	>156	625	156	625	312	>2500	5	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	20	39	39	312	312	10	78	5	39
<i>Proteus vulgaris</i>	>2500	>2500	156	625	1250	1250	39	2500	78	156

h = abs. hemmende Konzentration in γ /ml
 a = abs. abtötende Konzentration in γ /ml
¹⁾ als Wirkstoff enthalten im Markenpräparat «Desogen»
²⁾ als Wirkstoff enthalten im Markenpräparat «Triburon»

gruppe wurden durch Präparat 12 ungefähr in gleichem Ausmass gehemmt wie durch die beiden quaternären Ammoniumverbindungen. Für die totale Abtötung der Keime wurden von Präparat 12 etwas höhere Konzentrationen benötigt als von den quaternären Ammoniumbasen. Die beiden Antibiotica sind gegen die nämlichen Erreger durchschnittlich weniger aktiv. Im Unterschied zu den quaternären Ammoniumbasen ist Präparat 12 gegen die GRAM-negativen Erreger im Mittel sowohl hemmend als auch abtötend wirksamer, wobei *Pseudomonas aeruginosa* in relativ geringen Konzentrationen beeinflusst wird. Nr. 12 ist jedoch gegen *Proteus vulgaris* inaktiv im Gegensatz zu den beiden Antibiotica. Gegen die übrigen GRAM-negativen Keime entfaltet 12 ungefähr die gleiche Aktivität wie Oxytetracyclin; dem Chloramphenicol ist es deutlich überlegen.

Tuberkelbazillen vom *Typus humanus* und *bovinus* oder Pilze der Gattung *Trichophyton*³⁾ werden von 12 nicht gehemmt; dagegen sind Vertreter der Hefen (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* und *Cryptococcus neoformans*) in mässigem Grade beeinflussbar⁴⁾.

No. 12 hat somit ein relativ breites antimikrobielles Spektrum. Derivate derselben Aktivität bewerteten wir (Tabellen 1, 2, 3 und 6) mit dem Zeichen + + + +.

B) *Toxizität und Abbau*. Das als Beispiel gewählte Präparat 12 ist bei oraler Verabreichung besser verträglich als Tolytrimonium-methylsulfat und nähert sich ungefähr der Verträglichkeit des Antibiotikums Chloramphenicol (Tabelle 6).

Tabelle 6. *Akute orale Toxizität von Dipeptiden an der Maus*

Präparat	DL 90% mg/kg	DL 50% mg/kg	DL 10% mg/kg
12 (L → L)	4300	3500	2800
33 DL	1900	1300	900
32 (D → D)	2200	1800	1400
Tolytrimonium-methylsulfat	850	600	440
Chloramphenicol	5000	2875	1000

Die Toxizität ändert sich mit der sterischen Konfiguration: Die D-Form 32 und das Racemat 33 sind deutlich weniger gut verträglich. Dieses Verhalten könnte mit der verminderten Proteolyse dieser Verbindungen in Zusammenhang stehen (vgl. III/C).

C) *Proteolytischer Abbau in vitro mit Enzymen und Meerschweinchen-Darmsaft*. Von einigem Interesse war das Verhalten der aktiven Peptide gegenüber proteolytischen Enzymen. Dabei wurde insbesondere der Einfluss der Konfiguration studiert, eine Fragestellung, die mit dem Verwendungszweck solcher Derivate eng zusammenhängen dürfte.

Zur Untersuchung gelangten optisch einheitliche Antipoden, z. B. 12 und 32, sowie optisch inaktive Diastereomergemische, in denen das eine Racemat ange-

³⁾ Unveröffentlichte Untersuchungen von Dr. J. R. FREY & H. GELEICK.

⁴⁾ Unveröffentlichte Versuche von Dr. A. SCHOLER & Dr. M. GAY.

reichert war (33 und 34). Als Enzyme verwendeten wir Trypsin sowie Magen- und Darmsaft von Meerschweinchen⁵⁾. Bei den quantitativen Ansätzen wurde das während der 3- bis 48-stündigen Inkubation freiwerdende Lysin nach papierchromatographischer Abtrennung als Ninhydrin-Cu-Komplex photometrisch bestimmt.

Vorversuche mit Trypsin und Magensaft ergaben bei den Präparaten 6 und 9 praktisch keinen Abbau, ausser der quantitativen Esterspaltung im Präparat 9. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass Polylysin durch Trypsin [11] nur zu Tri- bzw. Dipeptiden abgebaut wird, nicht aber zu freiem Lysin.

Meerschweinchen-Darmsaft spaltet allfällige Estergruppen und die carboxylständige Amidgruppe mit grosser Geschwindigkeit, während die Peptidbindung zwischen den beiden Lysinresten langsamer angegriffen wird. Die Hydrolyse der Fettsäureamidgruppe verläuft mit noch geringerer Geschwindigkeit. In Tabelle 7 ist der Spaltungsgrad nach 24 Stunden bei 37° – bezogen auf den Totalabbau (2 Lys = 100%) – festgehalten. Die Lysinbestimmung allein erlaubt jedoch keine klare Differenzierung zwischen den Hydrolyseraten der Peptidbindung einerseits und der Bindung des langkettigen Acylrestes andererseits. Durch dünnschichtchromatographische Kontrolle des Abbaus erhielten wir jedoch die folgenden zusätzlichen Informationen:

Bei den L → L-Verbindungen 12 und 6 verläuft die Hydrolyse der carboxyl-endständigen Funktion und der Peptidbindung quantitativ; die Abspaltung des Fettsäurerestes dagegen ist nach 24 h noch nicht vollständig (Nachweis von N^α-Palm-Lys neben Lys auf dem Dünnschichtchromatogramm, jedoch keine intakte Dipeptidsäure). Das Amid 6 ist etwas beständiger als der Äthylester 12. Der wohl im Messfehler unserer Methodik liegende geringe Lys-Gehalt im Inkubat von 32 weist darauf hin, dass die D → D-Verbindung praktisch nicht angegriffen wird. Tatsächlich konnte dünnschichtchromatographisch nur unverändertes Ausgangsmaterial nachgewiesen werden; interessanterweise wurde auch die Estergruppe nicht hydrolysiert. Die

Tabelle 7. Antibakterielle Wirkung in vitro und Einfluss der Konfiguration auf die Proteolyse von Dipeptiden mit Meerschweinchen-Darmsaft

Nr. Präparat	Antibakterielle Wirkung		Spaltungsgrad in % bei 37° nach 24 Std. bez. auf 2 Lys = 100%
	GRAM-positiv	GRAM-negativ	
12 N ^α -Palm-L-Lys → L-Lys-OC ₂ H ₅ ·HCl	++++	++++	90%
32 N ^α -Palm-D-Lys → D-Lys-OC ₂ H ₅ ·2HCl	++++	++++	<5%
6 N ^α -Palm-L-Lys → L-Lys-NH ₂ ·2HCl	++++	++++	70%
33 N ^α -Palm-DL-Lys → DL-Lys-OC ₂ H ₅ ·2HCl (D → L; L → D)	++++	++++	17%
34 N ^α -Palm-DL-Lys → DL-Lys-OC ₂ H ₅ ·2HCl (L → L; D → D)	++++	++++	34%

⁵⁾ Magen- und Darmsaft von Meerschweinchen wurde uns in verdankenswerterweise von Hr. Prof. Dr. J. RIEDER aus unserer medizinischen Forschungsabteilung zur Verfügung gestellt.

Spaltungsverhältnisse der beiden Racemate sind nicht ohne weiteres interpretierbar, doch ist zu erwarten, dass 34 zur Hälfte (gemäss seinem Gehalt an L → L-Verbindung) und 33 sicherlich weniger als zur Hälfte abgebaut werden. Die erhaltenen Resultate weisen in diese Richtung. Da auf dem Chromatogramm neben intakter Dipeptidsäure und Lysin auch noch grössere Mengen N^α-Palm-Lys-OH gefunden wurden, wird angenommen, dass der ermittelte Lysingehalt hauptsächlich aus der Spaltung der Peptidbindung her stammt.

IV. Synthesen. - Vorliegende fettsäurehaltige Oligopeptide wurden nach den üblichen Methoden der Peptidchemie hergestellt. Bei den Vertretern mit N^α-ständiger Fettsäure tritt das Problem der partiellen Racemisierung auf, das aus der Literatur z. B. vom N^α-Acetyl-Rest [12] her hinreichend bekannt ist. Da schon früh im Verlaufe der Untersuchungen festgestellt wurde, dass die Konfiguration der fettsäurehaltigen Peptide auf die *in-vitro*-Aktivität (Tabelle 7) keinen oder mindestens einen mit unserer Methodik nicht fassbaren Einfluss hat, wurde das N^α-ständige Acyl generell als Schutzgruppe verwendet und der Partialracemisierung vorerst keine besondere Beachtung geschenkt, wenigstens nicht bei der Untersuchung der Konstitution und Wirkung.

Für besondere Zwecke wurden einzelne Vertreter dieser Stoffklasse, z. B. 6 (Tabelle 1), 9 und 12 (Tabelle 2) sowie 32 (Tabelle 7), auch in dieser Beziehung näher untersucht. Mit der Carbodiimid- und Carbonyldiimidazol-Methode wurde bei 0° bis -5° mit N^α-Palmitoyl-lysyl-lysinen eine ca. 30-prozentige Racemisierung der N-endständigen Aminosäure beobachtet, die sich nur mit der Azid-Methode vermeiden liess. Besonders deutlich liess sich dies bei Präparat 12 (Tabelle 2) zeigen, welches durch mehrmalige Kristallisation aus Äthanol optisch rein gewonnen werden kann mit $[\alpha]_D^{22} = -24^\circ$ ($c = 2$, H₂O). Mit der Carbodiimid-Methode erhält man z. B. ein Endprodukt mit $[\alpha]_D^{22} = -17^\circ$ ($c = 2$, H₂O), während mit der Azid-Methode mit sehr guter Ausbeute ein $[\alpha]_D^{22} = -23^\circ$ ($c = 2$, H₂O) erzielt wird. Beim entsprechenden Methylester 9 ist eine optische Reinigung durch Umkristallisieren nicht möglich. Auch hier wird mit der Azid-Methode der gleiche Drehwert beobachtet; mit anderen Methoden ein wesentlich tieferer Wert.

Viele Vertreter der Tabelle 3 wurden hergestellt über N^α-For-(N^ε-Z)-Lys-(N^ε-Z)-Lys-OCH₃ durch Ersatz der Formylgruppe durch den entsprechenden homologen Acylrest. Auch hier wurde gemäss dem Drehwert Partialracemisierung beobachtet, die im Endpunkt kleiner sein mag als bei der direkten Kondensation von N^α-Palm-(N^ε-Z)-Lys-OH mit dem entsprechenden Ester. Eine allfällige optische Reinigung bei der Isolierung der Zwischenstufen ist in diesem Verfahren nicht untersucht worden, so dass diese Frage einstweilen offen bleibt.

Diese Betrachtungen beweisen erneut die ausserordentliche Leistungsfähigkeit der Azid-Methode, die in dieser Reihe zur Herstellung optisch reiner Vertreter unbedingt herangezogen werden muss.

Bei der Herstellung eines Racematgemisches von N^α-Palm-DL-Lys → DL-Lys-OC₂H₅ ermöglichte fraktionierte Kristallisation aus Alkohol eine teilweise Trennung in eine Fraktion mit Smp. 226–230° (schwerer löslich) und in eine Fraktion mit Smp. 200–206° (leichter löslich). Durch Kristallisieren äquimolekularer Mengen von 12 und 32 wurde ein Racemat mit Smp. 226–230° gefunden, wodurch für das schwerer

lösliche Racemat die Struktur ($D \rightarrow D$; $L \rightarrow L$) (33) bewiesen wird, während im leichter löslichen Racemat das Isomere ($D \rightarrow L$; $L \rightarrow D$) (34) angereichert ist.

Eine chromatographische Trennung von Diastereomeren ist in dieser Reihe infolge der ausgleichenden Wirkung des langen Acylrestes schwierig.

Vorliegende Peptidderivate zeigen eine starke Oberflächenaktivität in wässriger Lösung mit beträchtlicher Netzwirkung. Ausgelesene Vertreter stehen zur Zeit in praktischer Prüfung.

Experimenteller Teil²⁾

A) Verbindungen der Tabelle 1.

a) *H*-(*N*^ε-*Palm*)-*Lys*-OH (1). 24 g (0,13 Mol) *H*-*Lys*-OH·HCl werden in 1500 ml Wasser mit 40 g basischem Kupfercarbonat 2 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach Filtration behandelt man bei 0° in der üblichen Weise mit 40 g (0,145 Mol) Palmitinsäurechlorid und der entsprechenden Menge 2*N* NaOH. Nach Isolierung des ausgefallenen Kupferkomplexes und Waschen mit Wasser, Aceton und Äther wird in der üblichen Weise mit H₂S zerlegt und die Aminosäure durch Neutralisation isoliert. 15 g, Smp. 240–241° (aus Eisessig). Sehr schwer löslich.

b) *H*-(*N*^ε-*Palm*)-*Lys*-OCH₃·HCl (2). Hergestellt nach der Methode von BRENNER [13]. Ausbeute 80%; Smp. 142–143° (aus MeOH/Äther), $[\alpha]_D^{25} = +7,2^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

c) *H*-*Lys*→(*N*^ε-*Palm*)-*Lys*-OCH₃·2HCl (3). Nach der Carbohydrid-Methode aus *N*^α-*N*^ε-Di-*Z*-*Lys*-OH [14] und 2 mit DCCD in DMF. Nach Ausschütteln mit Essigester wird das *N*^α-*N*^ε-Di-*Z*-*Lys*→(*N*^ε-*Palm*)-*Lys*-OCH₃ aus Methanol/Wasser kristallisiert; Smp. 151–153°. Ausbeute 50%; $[\alpha]_D^{25} = -1,9^\circ$ ($c = 0,6$, MeOH).

C₄₅H₇₀O₈N₄ (795,0) Ber. C 67,97 H 8,87 N 7,05% Gef. C 67,91 H 9,08 N 7,17%

Hydrogenolyse: Mit Pd in Methanol und 1 Äqu. HCl. Smp. 170° (aus Methanol/Äther), $[\alpha]_D^{25} = +2,2^\circ$ ($c = 1,1$, Methanol); Ausbeute 86%.

d) *H*-*Lys*→*Lys*→(*N*^ε-*Palm*)-*Lys*-OCH₃·3HCl (4). – *N*^α, *N*^ε-Di-*Z*-*Lys*→(*N*^ε-*Z*)-*Lys*-(*N*^ε-*Palm*)-*Lys*-OCH₃: 20,7 g (0,03 Mol) *N*^α, *N*^ε-Di-*Z*-*Lys*→(*N*^ε-*Z*)-*Lys*-NHNH₂ [15] werden in 100 ml Eisessig, 100 ml 60-proz. Essigsäure, 21 ml 3*N* HCl und 300 ml Essigester gelöst, auf –5° gekühlt und tropfenweise mit einer Lösung von 2,1 g (0,03 Mol) NaNO₂ in 5 ml H₂O versetzt. Nach 5 Min. Rühren bei –5° wird mit Eiswasser verdünnt, die Essigesterlösung abgetrennt, mit eiskalter 5-proz. NaHCO₃-Lösung und H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Unterdessen werden 13 g (0,03 Mol) (*N*^ε-*Palm*)-*L*-*Lys*-OCH₃·HCl in 180 ml Dimethylformamid suspendiert, mit 4,15 ml (0,03 Mol) Triäthylamin versetzt und 20 Min. kräftig gerührt. Darauf wird abgenutscht, mit wenig DMF nachgewaschen, auf –5° gekühlt und mit der Lösung des Azids in Essigester vereinigt. Eine allfällige Trübung wird durch Zusatz von DMF gelöst. Die Lösung wird über Nacht im Eiskasten aufbewahrt. Darauf wird zur Trockne verdampft, in Essigester gelöst, mit 5-proz. NaHCO₃-Lösung, Wasser, 1*N* HCl und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 23,8 g (75%); Smp. 152–153°, $[\alpha]_D^{25} = -11,2^\circ$ ($c = 1$, DMF).

C₅₉H₈₈O₁₁N₆ (1057,3) Ber. C 67,02 H 8,39 N 7,95% Gef. C 67,14 H 8,27 N 8,10%

Hydrogenolyse: In üblicher Weise mit Pd in MeOH und HCl. Ausbeute 90%; Smp. 223–224° (aus Methanol/Äther), $[\alpha]_D^{25} = -5,0^\circ$ ($c = 1,4$, DMF).

e) *H*-*Dab*→*D*-*Dab*→*D*-*Dab*→(*N*^γ-*Palm*)-*Dab*-NHNH₂·4HBr (5). – *H*-(*N*^γ-*Palm*)-*α*,*γ*-*Dab*-OH: 77,2 g (0,5 Mol) *H*-*α*,*γ*-*Dab*-OH·HCl [16], 600 ml Wasser und 66,5 g (0,3 Mol) basisches Kupfercarbonat werden 2 1/2 Std. unter Rückfluss erhitzt, dann wird abgenutscht und die Lösung des Cu-Komplexes zuerst mit 109 g (1,3 Mol) NaHCO₃ versetzt, darauf wird unter Rühren bei 20° innerhalb 20 Min. eine Lösung von 151 g (0,55 Mol) Palmitinsäurechlorid in 400 ml Aceton zugetropft und über Nacht weitergerührt. Der Kupferkomplex wird nach Isolierung mit H₂S zersetzt und die Aminosäure wie üblich aufgearbeitet. Aus Eisessig/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 45%, Smp. 208–210°.

C₂₀H₄₀O₃N₂ (356,54) Ber. C 67,37 H 11,31 N 7,86% Gef. C 67,27 H 11,27 N 7,81%

H-(*N*^γ-*Palm*)-*α*,*γ*-*Dab*-OCH₃·HCl: Hergestellt mit SOCl₂ und MeOH. Smp. 144–146° (aus Methanol/Äther). Ausbeute 70%.

N^{α} -For-(N^{γ} -Z)- α , γ -D-Dab \rightarrow (N^{γ} -Palm)-Dab-OCH₃: Aus N^{α} -For-(N^{γ} -Z)- α , γ -D-Dab-OH [17] und dem entsprechenden Ester mit DCCD in DMF. Smp. 163–166°; Ausbeute 50%.

H-(N^{γ} -Z)- α , γ -D-Dab \rightarrow (N^{γ} -Palm)- α , γ -Dab-OCH₃: Durch Deformylierung mit 4N HCl/MeOH bei Zimmertemperatur. Rohprodukt.

N^{α} -For-(N^{γ} -Z)- α , γ -Dab \rightarrow (N^{γ} -Z)- α , γ -D-Dab-NHNH₂: 56 g (0,2 Mol) N^{α} -For-(N^{γ} -Z)- α , γ -Dab-OH [17] werden in einer vom Triäthylamin·HCl abgenutzten Lösung von 60,4 g (0,22 Mol) (N^{γ} -Z)- α , γ -D-Dab-OCH₃·HCl [18] in 150 ml DMF + 28,8 ml (0,2 Mol) Triäthylamin gelöst, bei –10° mit 40,8 ml (0,2 Mol) DCCD versetzt und 20 Std. bei 0° aufbewahrt. Nach Filtration vom Harnstoff wird das Lösungsmittel durch Essigester ersetzt, wie üblich aufgearbeitet und der Dipeptidester als Rohprodukt mit Äther gefällt: 52 g Rohprodukt, Smp. 138–140°. Diese 52 g Ester werden in 200 ml Alkohol und 52 ml 80-proz. Hydrazinhydrat unter Erwärmen gelöst, über Nacht bei 25° aufbewahrt, abgenutzt, mit Alkohol und Äther gewaschen, getrocknet und aus DMF/Wasser umgefällt. Ausbeute 81% (bezogen auf Rohprodukt), Smp. 198–200°.

N^{α} -For-(N^{γ} -Z)- α , γ -Dab \rightarrow (N^{γ} -Z)- α , γ -D-Dab \rightarrow (N^{γ} -Z)- α , γ -D-Dab \rightarrow (N^{γ} -Palm)- α , γ -Dab-OCH₃: 9,1 g (15 mMol) N^{α} -For-(N^{γ} -Z)- α , γ -Dab-(N^{γ} -Z)- α , γ -D-Dab-NHNH₂ werden in 100 ml Eisessig, 50 ml Wasser, 100 ml Essigester und 12,7 ml 3N Salzsäure bei 0° unter starkem Rühren gelöst. Bei –10° tropft man unter Rühren eine Lösung von 1,09 g (15,8 mMol) NaNO₂ in 15 ml Wasser langsam zu, extrahiert nach 15 Min. bei 0° mit Essigester, wäscht mit Wasser und 1N Natriumhydrogencarbonat und trocknet die Lösung bei 0° über Natriumsulfat. Diese Azidlösung wird mit einer Lösung von 11 g H-(N^{γ} -Z)- α , γ -D-Dab \rightarrow (N^{γ} -Palm)- α , γ -Dab-OCH₃ (Rohprodukt) in 65 ml DMF versetzt, 20 Std. bei 0° und 6 Std. bei 20° stehengelassen, im Hochvakuum bei 45° konzentriert und mit 400 ml Äther ausgefällt. Nach Filtration wird mit Äther gewaschen und aus DMF/Alkohol umgefällt. Smp. 222–224°.

C₅₈H₈₄O₁₃N₈ (1101,32) Ber. C 63,25 H 7,69 N 10,17% Gef. C 63,58 H 7,91 N 10,11%

Überführung in das Hydrazid: 11 g N^{α} -For-(N^{γ} -Z)- α , γ -Dab \rightarrow (N^{γ} -Z)- α , γ -D-Dab \rightarrow (N^{γ} -Z)- α , γ -D-Dab \rightarrow (N^{γ} -Palm)- α , γ -Dab-OCH₃ werden in 90 ml DMF und 11 ml 100-proz. Hydrazinhydrat unter Erwärmen gelöst. Nach 20 Std. wird mit 200 ml Wasser vermischt, abgenutzt, mit Wasser gewaschen und im Vakuum bei 80° getrocknet: Ausbeute 95%, Smp. 240–242° (aus DMF/Alkohol umgefällt).

C₅₇H₈₄O₁₂N₁₀ (1101,32) Ber. C 62,16 H 7,69 N 12,72% Gef. C 62,20 H 7,89 N 12,55%

Decarbobenzoxylisierung mit HBr/Eisessig: 8 g N^{α} -For-(N^{γ} -Z)- α , γ -Dab \rightarrow (N^{γ} -Z)- α , γ -D-Dab \rightarrow (N^{γ} -Z)- α , γ -D-Dab \rightarrow (N^{γ} -Palm)- α , γ -Dab-NHNH₂ werden mit 80 ml 33-proz. Bromwasserstoff/Eisessig übergossen und 2 Std. unter Feuchtigkeitsausschluss geschüttelt. Die Suspension wird mit 300 ml abs. Äther ausgefällt, abgenutzt, der Rückstand mehrmals mit frischem Äther behandelt, in 80 ml Wasser aufgenommen, vom restlichen Äther durch Evakuieren befreit und 2 Std. bei 20° (Deformylierung) stehengelassen. Die wässrige Lösung wird lyophilisiert und der Rückstand aus Methanol mit Äther ausgefällt. Man löst in Methanol, neutralisiert mit Pyridin auf pH 7 und fällt die Lösung in Alkohol aus. Nach dem Trocknen wird die Substanz in 50 ml Wasser gelöst und lyophilisiert. Man erhält das Tetrahydrobromid als farbloses Pulver vom Smp. 245–250° (Zers.).

f) N^{α} -Palm-Lys \rightarrow Lys \rightarrow NH₂·HCl (6). – N^{α} -Palm-(N^{ϵ} -Z)-Lys \rightarrow (N^{ϵ} -Z)-Lys-NH₂: Eine Lösung von 50 g (63 mMol) N^{α} -Palm-(N^{ϵ} -Z)-Lys \rightarrow (N^{ϵ} -Z)-Lys-OMe (Azidmethode; vgl. B, a) in 300 ml Methanol wird in einem Rührautoklaven mit 100 g flüssigem Ammoniak versetzt und 20 Std. bei 40° und 30 atü N₂ gerührt. Das ausgefallene Amid wird abgenutzt, mit Alkohol und Wasser gewaschen, im Vakuum getrocknet und 2mal aus DMF/Methanol umkristallisiert. Ausbeute 70%; Smp. 186–188°, $[\alpha]_D^{25} = -11^{\circ}$ (c = 2, DMF).

C₄₄H₆₉O₇N₅ (780,03) Ber. N 8,98 OCH₃ 0% Gef. N 8,90 OCH₃ 0%

Hydrogenolyse: 58 g (74,5 mMol) N^{α} -Palm-(N^{ϵ} -Z)-Lys \rightarrow (N^{ϵ} -Z)-Lys-NH₂ werden in 300 ml Eisessig nach Zusatz von 7 g 5-proz. Palladiumkohle hydriert. Nach Abtrennen des Katalysators dampft man die Lösung auf 100 ml ein und leitet bei 20° trockenen Chlorwasserstoff bis zu einer Gewichtszunahme von 5,4 g ein. Man evakuiert 15 Min. und fällt in Essigester unter Umrühren aus. Nach Trocknen im Vakuum bei 50° wird die Substanz aus 90-proz. wässrigem Isopropanol/Aceton unter Rühren ausgefällt, abgenutzt, mit Aceton gewaschen und getrocknet. Ausbeute 88%; Smp. 242–244° (Zers.), $[\alpha]_D^{25} = -16^{\circ}$ (c = 3, Wasser) (optisch rein).

g) H-Lys \rightarrow (N^{ϵ} -Palm)-Lys-NH₂·2HBr (7). – N^{α} , N^{ϵ} -Di-Z-Lys \rightarrow (N^{ϵ} -Palm)-Lys-NH₂: 7,9 g (0,01 Mol) N^{α} , N^{ϵ} -Di-Z-Lys \rightarrow (N^{ϵ} -Palm)-Lys-OCH₃ (vgl. c) werden in 100 ml Methanol gelöst und

bei 0° mit Ammoniak gesättigt. Die Lösung wird gut verschlossen 2 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt und darauf abgedampft. Umkristallisation aus Methanol. Ausbeute 6,5 g (82%); Smp. 201–202°, $[\alpha]_D^{22} = -8,0^\circ$ ($c = 1,8$, DMF).

$C_{44}H_{69}O_7N_5$ (780,0) Ber. C 67,75 H 8,92 N 8,97% Gef. C 67,80 H 9,25 N 9,23%

Decarbobenzoylierung mit HBr/Eisessig: 6 g des geschützten Dipeptides werden mit 30 ml HBr/Eisessig wie üblich decarbobenzoyliert. Ausbeute 4,6 g (88%) aus Äthanol/Äther. Hygroskopisches Pulver, das plattenschromatographisch einheitlich ist. $[\alpha]_D^{22} = +13,1^\circ$ ($c = 1,2$, DMF).

h) H-Lys → (*N*^ε-*Palm*)-*Lys-NHNH*₂ · 3,2*HBr* (8). – *Hydrazid*: Aus *N*^α, *N*^ε-*Di-Z-Lys* → (*N*^ε-*Palm*)-*Lys-OCH*₃ und Hydrazin in Methanol. Ausbeute 96%; Smp. 178–180° (aus Methanol), $[\alpha]_D^{22} = -9,1^\circ$ ($c = 2$, DMF).

$C_{44}H_{70}O_7N_6$ (795,0) Ber. C 66,46 H 8,87 N 10,57% Gef. C 66,72 H 8,91 N 10,75%

Decarbobenzoylierung: Mit HBr/Eisessig. Ausbeute 60%; Smp. 194–196°, $[\alpha]_D^{22} = +8,7^\circ$ ($c = 1,4$, DMF).

B) Verbindungen der Tabelle 2

a) N^α-*Palm-Lys* → *Lys-OCH*₃ · 2*HCl* (9). – *N*^α-*Palm-(N*^ε-*Z)-Lys-OH*: In eine Lösung von 280 g (1 Mol) H-(*N*^ε-*Z*)-*Lys-OH* [19] und 129 g (2,3 Mol) KOH in 6 l Wasser tropft man unter Rühren bei Raumtemperatur eine Lösung von 288 g (1,05 Mol) Palmitinsäurechlorid in 400 ml Aceton. Nach 4 Std. wird mit 6 l Wasser verdünnt, abgenutscht, das Filtrat mit konz. HCl kongosauer gestellt, die Fällung abgenutscht, mit viel Wasser gewaschen, getrocknet und aus Essigester kristallisiert. Ausbeute 85%; Smp. 107–109°, $[\alpha]_D^{22} = -2,2^\circ$ ($c = 5$, DMF).

$C_{30}H_{50}O_5N_2$ (518,72) Ber. C 69,46 H 9,72 N 5,40% Gef. C 69,58 H 9,76 N 5,69%

N^α-*Palm-(N*^ε-*Z)-Lys-OCH*₃: Eine Lösung von 147 g (0,5 Mol) H-(*N*^ε-*Z*)-*Lys-OCH*₃ [20] in 500 ml Tetrahydrofuran und 77 ml (0,55 Mol) Triäthylamin wird unter Rühren bei 15–20° innerhalb 45 Min. mit einer Lösung von 137,5 g (0,5 Mol) Palmitinsäurechlorid in 150 ml Tetrahydrofuran versetzt. Nach 20 Std. wird in 2 l eiskalter 1*N* HCl ausgefällt, abgenutscht, in 1,2 l Alkohol gelöst, in einer eiskalten Lösung von 50 g NH₄Cl in 2 l 3*N* Ammoniak gefällt, abgenutscht, mit Wasser gewaschen, getrocknet und aus Essigester umkristallisiert. Ausbeute 90%, Smp. 90–91°.

$C_{31}H_{52}O_5N_2$ (532,74) Ber. C 69,88 H 9,84 N 5,26% Gef. C 69,90 H 10,12 N 5,47%

N^α-*Palm-(N*^ε-*Z)-Lys-NHNH*₂: Eine Lösung von 244 g (0,46 Mol) *N*^α-*Palm-(N*^ε-*Z)-Lys-OCH*₃ in 1 l DMF wird mit 112,5 ml (2,3 Mol) Hydrazinhydrat versetzt. Nach 48 Std. wird das Hydrazid abgenutscht, während 3 Std. in 2 l Wasser gerührt, abgenutscht, mit Wasser gewaschen, getrocknet und aus Dimethylformamid/Wasser umgefällt. Ausbeute 90%; Smp. 152–154°, $[\alpha]_D^{22} = -6,8^\circ$ ($c = 2$, DMF).

$C_{30}H_{52}O_4N_4$ (532,75) Ber. C 67,63 H 9,84 N 10,52% Gef. C 67,28 H 9,56 N 10,52%

N^α-*Palm-(N*^ε-*Z)-Lys* → (*N*^ε-*Z*)-*Lys-OCH*₃ (*Carbodiimid-Methode*): 100g (0,193 Mol) *N*^α-*Palm-(N*^ε-*Z)-Lys-OH* und 57 g (0,195 Mol) H-(*N*^ε-*Z*)-*Lys-OCH*₃ [20] werden in 230 ml DMF gelöst, bei –10° mit 40,8 g (0,198 Mol) DCCD versetzt und 16 Std. bei 0° stehengelassen. Das gebildete dicke Öl wird mit 50 ml DMF verdünnt, auf 50° erwärmt, auf 20° abgekühlt und vom Dicyclohexylharnstoff abgenutscht. Man fällt das Filtrat in 4 l 5-proz. Natriumchloridlösung, nutscht nach 1 Std. ab, wäscht mit Wasser, trocknet und kristallisiert aus Essigester/Petroläther. Ausbeute 85%; Smp. 123–125°, $[\alpha]_D^{20} = -7^\circ$ ($c = 2$, DMF).

N^α-*Palm-(N*^ε-*Z)-Lys* → (*N*^ε-*Z*)-*Lys-OCH*₃ (*Azidmethode*) [21]: Eine auf –10° abgekühlte Lösung von 266 g (0,5 Mol) *N*^α-*Palm-(N*^ε-*Z)-Lys-NHNH*₂ in 2,5 l DMF und 417 ml 6*N* HCl-Gas/Tetrahydrofuran (2,5 Mol HCl) wird unter Rühren innerhalb von 40 Min. mit 69 ml (0,512 Mol) Isoamylnitrit in 120 ml DMF versetzt und anschliessend 1 Std. bei –10° gerührt. Dann tropft man innerhalb 40 Min. bei –10° eine vorgekühlte Lösung von 150 g (0,51 Mol) H-(*N*^ε-*Z*)-*Lys-OCH*₃ [20] in 300 ml DMF und 357 ml (2,55 Mol) Triäthylamin dazu, rührt 6 Std. bei –10° und einem pH von 8–8,5 und lässt über Nacht langsam auftauen. Die Reaktionsmischung wird mit 6 l eiskalter 5-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung ausgefällt, abgenutscht, mit Wasser gewaschen, in 3 l Methanol gelöst und in 6 l eiskalter 1*N* Salzsäure ausgefällt, abgenutscht, mit Wasser gewaschen und aus Alkohol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 88%; Smp. 123–125°, $[\alpha]_D^{22} = -8,4^\circ$ ($c = 2$, DMF).

$C_{45}H_{70}O_8N_4$ (795,04) Ber. C 67,98 H 8,87 N 7,05% Gef. C 68,15 H 8,96 N 7,33%

Hydrogenolyse: 50 g N^α -Palm-(N^ϵ -Z)-Lys \rightarrow (N^ϵ -Z)-Lys-OCH₃ (Azidmethode) werden in 200 ml Eisessig mit 8 g 5-proz. Palladiumkohle hydriert. Nach Abtrennen des Katalysators wird der Eisessig abdestilliert, der Sirup mit 4N HCl/Methanol gelöst und auf ein pH von 2 gebracht, durch Zusatz von Aceton kristallisiert und anschliessend aus Methanol/Aceton umkristallisiert. Ausbeute 75%; Smp. 221–222°, $[\alpha]_D^{22} = -23,0^\circ$ ($c = 2$, H₂O). – Ein vollständig analog hergestelltes Produkt aus der Carbodiimid-Methode hat einen Smp. von 210–212° und $[\alpha]_D^{23} = -17^\circ$ ($c = 2$, H₂O).

b) N^α -Palm-Lys \rightarrow Ser-OCH₃·HCl (10). – N^α -Palm-(N^ϵ -Z)-Lys \rightarrow Ser-OCH₃: Aus N^α -Palm-(N^ϵ -Z)-Lys-OH und H-Ser-OCH₃·HCl [22] mit DCCD. Kristallisiert aus Alkohol. Ausbeute 65%; Smp. 125–127°.

Hydrogenolyse: In Methanol/Eisessig in Gegenwart von Pd, Überführen in das Hydrochlorid und Umkristallisieren aus Methanol/Äther und Chloroform/Äther. Smp. ab 139° (Zers.), $[\alpha]_D^{22} = -8,25^\circ$ ($c = 2$, H₂O). Die Substanz enthält 0,3 Mol Wasser und 0,06 Mol Chloroform.

c) Palm-Glu \rightarrow Glu-OH (11). – Palm-(γ -OCH₃)-Glu \rightarrow (γ -OCH₃)-Glu-OCH₃: Aus Palmitinsäurechlorid und H-(γ -OCH₃)-L-Glu-(γ -OCH₃)-L-Glu-OCH₃ [23] wie für N^α -Palm-(N^ϵ -Z)-Lys-OCH₃ beschrieben. Kristallisation aus Essigester/Äther. Smp. 116–118°; Ausbeute 63%.

Verseifung: In Methanol mit NaOH, Umkristallisieren aus Alkohol/Petroläther. Ausbeute 52%; Smp. 139–140°, $[\alpha]_D^{22} = -13,7^\circ$ ($c = 2,8$, Alkohol).

d) N^α -Palm-Lys \rightarrow Lys-OC₂H₅·2HCl (12). – N^α -Palm-(N^ϵ -Z)-Lys \rightarrow (N^ϵ -Z)-Lys-OC₂H₅: Nach der Azid-Methode aus N^α -Palm-(N^ϵ -Z)-Lys-NHNH₂ und H-(N^ϵ -Z)-Lys-OC₂H₅ [24] hergestellt, analog dem entsprechenden Dipeptid-OCH₃. Umkristallisiert aus Alkohol. Ausbeute 90%; Smp. 124–126°, $[\alpha]_D^{22} = -8,4^\circ$ ($c = 2$, DMF).

C₄₆H₇₂O₈N₄ (809,07) Ber. C 68,28 H 8,97 N 6,92% Gef. C 68,62 H 8,80 N 6,95%

Hydrogenolyse: In Eisessig über Pd und Überführung ins Hydrochlorid. Umkristallisiert aus Alkohol. Smp. 245–250° (Zers.), $[\alpha]_D^{22} = -24^\circ$ ($c = 2$, H₂O) (optisch rein).

e) N^α -Palm-Lys \rightarrow Lys-OH·HCl (13). – N^α -Palm-(N^ϵ -Z)-Lys \rightarrow (N^ϵ -Z)-Lys-OH: Durch Verseifen von N^α -Palm-(N^ϵ -Z)-Lys \rightarrow (N^ϵ -Z)-Lys-OCH₃ (siehe B, a) in Methanol mit NaOH. Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther. Ausbeute 90%, Smp. 129–131°.

C₄₄H₆₈O₈N₄ (791,02) Ber. C 67,66 H 8,78 N 7,17% Gef. C 67,92 H 9,14 N 7,23%

Hydrogenolyse: In Eisessig/Wasser mit Pd. Nach der Operation wird zur Trockne verdampft, in wenig Wasser gelöst, das pH mit 1N HCl auf 7 gestellt, mit Aceton gefällt, abgenutscht und getrocknet. Ausbeute 85%. Zersetzung oberhalb 180°; $[\alpha]_D^{20} = -5^\circ$ ($c = 2$, H₂O).

f) N^α -Palm-Orn \rightarrow Orn-OCH₃·2HCl (14). – N^α -Palm-(N^δ -Z)-Orn-OH: Man suspendiert 26,6 g (0,1 Mol) H-(N^δ -Z)-Orn-OH [25] in 150 ml 1,5N KOH und 100 ml THF, tropft unter Rühren bei 2–5° 30 g (0,11 Mol) Palmitinsäurechlorid zu und lässt noch 40 Min. bei Raumtemperatur rühren unter nochmaligem Zusatz von 25 ml 2N KOH. Dann wird mit 3N HCl angesäuert, das Tetrahydrofuran im Vakuum entfernt, der Rückstand mit 500 ml Essigester und etwas konz. HCl verdünnt, die Essigesterphase mit 4N HCl, Wasser und konz. NaCl-Lösung gewaschen und nach Trocknen eingedampft. Nach Umfällen aus Methanol/Wasser erhält man 39 g (78%). Smp. 91–96°, $[\alpha]_D^{20} = +4,8^\circ$ ($c = 1$, Alkohol).

C₂₆H₄₈O₅N₂ (504,6) Ber. C 69,01 H 9,59 N 5,55% Gef. C 69,44 H 9,57 N 5,45%

N^α -Palm-(N^δ -Z)-Orn \rightarrow (N^δ -Z)-Orn-OCH₃: Aus N^α -Palm-(N^δ -Z)-Orn-OH und H-(N^δ -Z)-Orn-OCH₃·HCl [26] in Essigester/DMF mit DCCD. Umkristallisiert aus Essigester. Ausbeute 62%; Smp. 121–124°, $[\alpha]_D^{21} = -1,9^\circ$ ($c = 1$, DMF).

C₄₃H₆₆O₈N₄ (766,9) Ber. C 67,33 H 8,67 N 7,31% Gef. C 67,52 H 8,49 N 7,56%

Hydrogenolyse: In Eisessig und anschliessende Überführung in das Dihydrochlorid, kristallisation aus Methanol/Aceton. Ausbeute 74%; Smp. 230–233°, $[\alpha]_D^{21} = -12,2^\circ$ ($c = 2$, Methanol).

g) N^α -Palm-Lys \rightarrow Dab-OCH₃·2HCl (15). – N^α -Palm-(N^ϵ -Z)-Lys \rightarrow (N^γ -Z)-Dab-OCH₃: Hergestellt aus N^α -Palm-(N^ϵ -Z)-Lys-OH und H-(N^γ -Z)-Dab-OCH₃ [18] mit DCCD in DMF. Ausbeute 70%; Smp. 141°, $[\alpha]_D^{23} = -15,95^\circ$ ($c = 2$, DMF).

C₄₃H₆₆O₈N₄ (766,9) Ber. C 67,33 H 8,67 N 7,31% Gef. C 67,31 H 8,69 N 7,55%

Hydrogenolyse: In Methanol mit Äqu. HCl. Aus Methanol/Aceton umgefällt. Ausbeute 85%; Smp. ab 200° (Zers.), $[\alpha]_D^{24} = -14,3^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

h) N^α -Palm-Orn \rightarrow Arg-OCH₃·2HCl (16). – N^α -Palm-(N^δ-Z)-Orn \rightarrow (NO₂)-Arg-OCH₃: Hergestellt aus N^α -Palm-(N^δ-Z)-Orn-OH und H-(N^G-NO₂)-Arg-OCH₃ [27] in DMF mit DCCD. Umkristallisiert aus Essigester. Ausbeute 69%; Smp. 135–139°, $[\alpha]_D^{21} = -2,5^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

C₃₆H₆₁O₈N₇ (719,9) Ber. C 60,06 H 8,54 N 13,62% Gef. C 60,50 H 8,37 N 13,39%

Hydrogenolyse: In Eisessig bei 50° mit Pd und anschließende Überführung ins Hydrochlorid mit HCl/Methanol. Umkristallisiert aus Methanol/Äther. Ausbeute 51%; Smp. 217–220° (Zers.), $[\alpha]_D^{21} = -5,2^\circ$ ($c = 1$, Methanol).

i) N^α -Palm-Arg \rightarrow Arg-OC₂H₅·2HCl (17). – N^α -Z-(N^G-NO₂)-Arg \rightarrow (N^G-NO₂)-Arg-OC₂H₅: 35,3 g (0,1 Mol) N^α -Z-(N^G-NO₂)-Arg-OH [28] werden in 400 ml THF bei –10° mit 16,2 g (0,1 Mol) Carbonyldiimidazol versetzt und 40 Min. bei –10° gerührt. Dann wird eine Lösung von Nitroarginin-äthylester⁶⁾ in 150 ml DMF (erhalten durch Umsetzen des Hydrochlorides mit Triäthylamin) zugegeben und 4 Std. bei 0° gerührt. Nach Eindampfen wird in Essigester und 1N HCl aufgenommen, wobei sich der Hauptteil als schweres Öl abscheidet, das mit Wasser verrieben erstarrt. 22,3 g (38%). Aus der Essigesterlösung erhält man nach Neutralwaschen, Trocknen und Eindampfen 5,6 g (10%). Beide Fraktionen werden vereinigt und aus Alkohol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 17,2 g (30%); Smp. 123–125°, $[\alpha]_D^{21} = -7,8^\circ$ ($c = 1$, Alkohol).

C₂₂H₃₄O₉N₁₀ (582,5) Ber. C 45,35 H 5,88 N 24,05% Gef. C 45,37 H 5,94 N 24,04%

N^α -Palm-(N^G-NO₂)-Arg \rightarrow (N^G-NO₂)-Arg-OC₂H₅: 14,6 g (0,025 Mol) der obigen Verbindung werden mit 50 ml 25-proz. H.Br in Eisessig während 1 Std. decarboxyliert, anschließend mit Äther gefällt und der Rückstand nach mehrmaligem Auswaschen mit Äther und Alkohol zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in 150 ml Alkohol gelöst, mit Triäthylamin alkalisch gestellt, zur Trockne verdampft und der Rückstand noch 2mal mit Toluol abgedampft. Dann wird in 150 ml Pyridin aufgenommen, mit 4 ml Triäthylamin versetzt und bei –10° bis –15° rasch unter Rühren mit 7,2 g (0,026 Mol) Palmitinsäurechlorid versetzt. Nach 30 Min. Rühren bei 0° wird zur Trockne verdampft, in Essigester aufgenommen und neutral gewaschen, wobei bereits ein Teil der Substanz ausfällt. Der Essigester wird nach Filtration zur Trockne verdampft und die vereinigten Produkte aus Alkohol/Äther kristallisiert. Ausbeute 7,7 g (45%); Smp. 179–182°.

C₃₀H₅₈O₈N₁₀ (686,8) Ber. C 52,46 H 8,51 N 20,40% Gef. C 51,97 H 8,32 N 19,90%

Hydrogenolyse: In Eisessig/Wasser über Pd, Überführung in das Hydrochlorid und Umkristallisieren aus Alkohol/Äther. Ausbeute 48%; Smp. 225–230°, $[\alpha]_D^{21} = -13,7^\circ$ ($c = 2$, Alkohol).

C) Verbindungen der Tabelle 3

a) N^α -Acetyl-Lys \rightarrow Lys-OCH₃·2HCl (18). – N^α -For-(N^ε-Z)-Lys \rightarrow (N^ε-Z)-Lys-OCH₃: 26,3 g (0,085 Mol) N^α -For-(N^ε-Z)-Lys-OH [29] werden in 150 ml Tetrahydrofuran bei –10° unter Rühren mit 13,8 g (0,085 Mol) Carbonyldiimidazol versetzt. Nach 30 Min. setzt man 25,5 g (0,085 Mol) H-(N^ε-Z)-Lys-OCH₃ [20] in 50 ml THF zu und lässt noch 4 Std. bei Raumtemperatur weiterrühren. Danach wird das Lösungsmittel eingeeengt, mit Essigester versetzt, mit eiskalter Weinsäure, KHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, getrocknet und im Vakuum eingedampft. Umkristallisieren des Rückstandes aus Aceton/Äther. 29,2 g (58%); Smp. 147–149°, $[\alpha]_D^{22} = -16,9^\circ$ ($c = 1,0$, Methanol).

C₃₀H₄₀O₈N₄ (584,65) Ber. C 61,63 H 6,90 N 9,58% Gef. C 61,96 H 6,75 N 9,44%

N^α -Acetyl-(N^ε-Z)-Lys \rightarrow (N^ε-Z)-Lys-OCH₃: Der Formyl-dipeptidester wird in der 5fachen Menge 1N methanolischer HCl-Lösung 5 Std. bei Raumtemperatur geschüttelt, im Vakuum verdampft, 3mal mit Äther verrieben und dekantiert. 5,9 g (0,01 Mol) des so deformylierten Produktes werden in 20 ml Essigester gelöst, auf 0° gekühlt und mit 1,4 ml (0,01 Mol) Triäthylamin versetzt. Nach Filtration vom Triäthylammoniumsalz gibt man 2,2 g (0,012 Mol) *p*-Nitrophenylacetat [30] zu, bewahrt 2 Tage bei Raumtemperatur auf, nutschts ab, wäscht die gelartige Masse mit Essigester, KHCO₃-Lösung und Wasser und trocknet im Vakuum. Aus Methanol/Wasser erhält man 4,2 g (70%). Smp. 141–143°, $[\alpha]_D^{24} = -11,5^\circ$ ($c = 2,2$, DMF).

C₃₁H₄₂O₈N₄ (598,7) Ber. C 62,18 H 7,07 N 9,36% Gef. C 62,26 H 7,12 N 9,35%

⁶⁾ N-(N^G-NO₂)-Arg-OC₂H₅·HCl wurde als Öl in analoger Weise wie der Methylester [27] hergestellt und direkt verwendet.

Hydrogenolyse: 3,6 g (0,006 Mol) des geschützten Dipeptids werden in 100 ml Methanol und 2 ml 3N HCl mit Pd-Kohle hydrogenolysiert. Der nach Filtration und Eindampfen erhaltene Rückstand wird noch 4mal mit Methanol zur Trockne verdampft, unter Äther verrieben und getrocknet. Es verbleiben 2 g (82%) eines sehr hygroskopischen Pulvers, das sich plattenchromatographisch einheitlich verhält. $[\alpha]_D^{23} = -19,3^\circ$ ($c = 1,5$, Methanol).

b) *N^α-Butyryl-Lys*→*Lys-OCH₃·2HBr* (19). – *N^α-Butyryl-(N^ε-Z)-Lys*→*(N^ε-Z)-Lys-OCH₃*: 11,8 g (0,02 Mol) deformyliertes Dipeptidester-hydrochlorid werden in 40 ml Essigester mit 2,8 ml (0,02 Mol) Triäthylamin (gemäss C, a) freigesetzt, mit 1,8 ml (0,021 Mol) Buttersäure und 4,5 g (0,022 Mol) DCCD versetzt und 16 Std. bei Raumtemperatur belassen. Nach Filtration vom Harnstoff wird der Essigester gewaschen, getrocknet und im Vakuum verdampft. Der Rückstand wird aus Alkohol/Wasser umgefällt und liefert 7 g (56%) des geschützten Zwischenproduktes. Smp. 104°, $[\alpha]_D^{22} = -15,2^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{33}H_{46}O_8N_4$ (626,7) Ber. C 63,24 H 7,39 N 8,94% Gef. C 63,01 H 7,43 N 8,95%

Decarbobenzoxylieung: 5,7 g (0,009 Mol) des geschützten Dipeptids werden mit 25 ml 30-proz. Bromwasserstoff in Eisessig 1 Std. bei Raumtemperatur geschüttelt, danach mit Äther gefällt, dekantiert und mehrere Male mit Äther verrieben. Nach 4maligem Abdampfen mit Methanol und Umfällen aus Äthanol/Äther erhält man 4 g (85%) eines hygroskopischen Pulvers, welches auf dem Plattenchromatogramm nur einen Fleck zeigt. $[\alpha]_D^{23} = -11,6^\circ$ ($c = 1,3$, Methanol).

c) *N^α-Caprylyl-Lys*→*Lys-OCH₃·2HBr* (20). – *N^α-Caprylyl-(N^ε-Z)-Lys*→*(N^ε-Z)-Lys-OCH₃*: 11,8 g (0,02 Mol) deformylierter Dipeptidester werden gemäss C, b) mit 3,2 ml (0,02 Mol) Caprylsäure acyliert. Man erhält 8 g (59%) aus Methanol/Wasser umgefälltes Produkt vom Smp. 112–115°; $[\alpha]_D^{22} = -8,7^\circ$ ($c = 1,2$, DMF).

$C_{37}H_{54}O_8N_4$ (682,8) Ber. C 65,07 H 7,97 N 8,20% Gef. C 65,21 H 8,14 N 8,43%

Hydrogenolyse: 1,36 g (0,002 Mol) des geschützten Dipeptides lieferten in HCl/McOH mit Pd 0,8 g (82%) umgefälltes Produkt vom Smp. 195–197° (Alkohol/Äther); $[\alpha]_D^{24} = -12,2^\circ$ ($c = 2,3$, DMF).

d) *N^α-Lauroyl-Lys*→*Lys-OCH₃·2HCl* (21). – *N^α-Lauroyl-(N^ε-Z)-Lys-OH*: Laurylsäurechlorid [31] wird gemäss B, a) mit H-(N^ε-Z)-Lys-OH umgesetzt. Der Rückstand wird mittels einiger Tropfen Methanol in Lösung gebracht und nach Zugabe von Petroläther kristallisiert. Ausbeute 78%; Smp. 102–104°, $[\alpha]_D^{21} = +2,8^\circ$ ($c = 2,0$, Alkohol).

$C_{26}H_{42}O_5N_2$ (462,61) Ber. C 67,50 H 9,15 N 6,06% Gef. C 67,61 H 9,09 N 6,06%

N^α-Lauroyl-(N^ε-Z)-Lys→*(N^ε-Z)-Lys-OCH₃*: 23,1 g (0,050 Mol) *N^α-Lauroyl-(N^ε-Z)-Lys-OH* werden mittels Carbonyldiimidazol mit H-(N^ε-Z)-Lys-OCH₃ [20] verknüpft und auf übliche Art aufgearbeitet. Aus Methanol/Wasser werden 15,8 g (43%) geschützter Lauroyl-dipeptidester vom Smp. 137–139° erhalten. $[\alpha]_D^{22} = -11,6^\circ$ ($c = 2,0$, Methanol).

$C_{41}H_{62}O_8N_4$ (738,94) Ber. C 66,64 H 8,46 N 7,58% Gef. C 66,48 H 8,38 N 7,55%

Hydrogenolyse: 13 g (0,018 Mol) dieses Dipeptidderivats hydrogenolysiert man in 750 ml Eisessig und 6 ml konz. HCl mittels Pd-Kohle bei Raumtemperatur. Nach Filtration und Verdampfen im Vakuum erhält man aus Methanol/Äther 4,1 g (43%) Endprodukt mit Smp. 212–214°, $[\alpha]_D^{22} = -20,0^\circ$ ($c = 2,0$, Methanol).

e) *N^α-Tridecanoyl-Lys*→*Lys-OCH₃·2HCl* (22). – *N^α-Tridecanoyl-(N^ε-Z)-Lys*→*(N^ε-Z)-Lys-OCH₃*: Tridecanoylchlorid wird aus der Säure und Thionylchlorid erhalten [31]. 29 g (0,050 Mol) Formyl-dipeptidester werden nach C, a) deformyliert und in Tetrahydrofuran mit 20 ml Triäthylamin versetzt. Nach Filtration wird unter Rühren bei -10° tropfenweise mit 11,9 g (0,050 Mol) Tridecanoylchlorid versetzt und noch 20 Min. bei 0° gerührt. Man dampft die Hälfte des Tetrahydrofurans ab, gibt Essigester zu und wäscht mit 1N HCl und Wasser. Nach Trocknen, Eindampfen und Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther erhält man 20,9 g (56%) geschützten Dipeptidester vom Smp. 135–137°. $[\alpha]_D^{22} = -13,7^\circ$ ($c = 2,0$, Methanol).

$C_{43}H_{64}O_8N_4$ (752,96) Ber. C 66,99 H 8,57 N 7,44% Gef. C 66,96 H 8,35 N 7,58%

Hydrogenolyse: Die Hydrogenolyse mit Pd in Eisessig liefert aus Methanol/Äther 6,9 g (56%) Tridecanoyl-dipeptidester-dihydrochlorid. Smp. 215–219°, $[\alpha]_D^{21} = -18,4^\circ$ ($c = 2,0$, Methanol).

f) *N*^α-Myristoyl-Lys→Lys-OCH₃·2HCl (23). – *N*^α-Myristoyl-(*N*^ε-Z)-Lys→(*N*^ε-Z)-Lys-OCH₃: Hergestellt aus Myristoylchlorid [31] nach Methode C, e). Aus Essigester/Petroläther umkristallisiert erhält man 76% des geschützten Dipeptids. Smp. 128–132°, $[\alpha]_D^{22} = -11,1^\circ$ (*c* = 2,0, Methanol). C₄₃H₆₆O₈N₄ (766,99) Ber. C 67,33 H 8,67 N 7,31% Gef. C 67,52 H 8,69 N 7,11%

Decarbobenzoxylisierung: Der geschützte Myristoyl-dipeptidester wird nach C, b) mittels Bromwasserstoff in Eisessig behandelt, anschließend mit eiskaltem 20-proz. Ammoniaklösung versetzt und mit Essigester extrahiert. Die Essigesterzüge werden nach gutem Waschen und Trocknen mit 3 Äqu. 4*N* HCl in Methanol versetzt und im Vakuum eingedampft. Aus Methanol/Äther erhält man 68% der Verbindung 23 vom Smp. 214–220°. $[\alpha]_D^{21} = -19,9^\circ$ (*c* = 2,0, Methanol).

g) *N*^α-Pentadecanoyl-Lys→Lys-OCH₃·2HCl (24). – *N*^α-Pentadecanoyl-(*N*^ε-Z)-Lys→(*N*^ε-Z)-Lys-OCH₃: Pentadecanoylchlorid [31] wird analog C, e) umgesetzt und aufgearbeitet. Aus Methanol/Wasser erhält man in 50% Ausbeute den geschützten Pentadecanoyl-dipeptidester vom Smp. 129–133°. $[\alpha]_D^{20} = -11,7^\circ$ (*c* = 2,0, Methanol).

C₄₄H₆₈O₈N₄ (781,02) Ber. C 67,66 H 8,78 N 7,17% Gef. C 67,82 H 8,48 N 7,29%

Hydrogenolyse: Ergibt ein Endprodukt mit Smp. 209–215° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -19,4^\circ$ (*c* = 2,0, Methanol).

h) *N*^α-Margaroyl-Lys→Lys-OCH₃·2HCl (25). – *N*^α-Margaroyl-(*N*^ε-Z)-Lys→(*N*^ε-Z)-Lys-OCH₃: Margarinsäurechlorid [31] wird analog C, e) hergestellt und aufgearbeitet. Ausbeute 56%; Smp. 130–132°, $[\alpha]_D^{20} = -11,8^\circ$ (*c* = 2,0, Methanol).

C₄₆H₇₂O₈N₄ (809,07) Ber. C 68,28 H 8,97 N 6,93% Gef. C 68,35 H 8,98 N 7,00%

Hydrogenolyse: Liefert das Endprodukt in 37% Ausbeute mit Smp. 216–220° (Zers.) aus Methanol/Äther. $[\alpha]_D^{20} = -16,4^\circ$ (*c* = 2,0, Methanol).

i) *N*^α-Stearoyl-Lys→Lys-OCH₃·2HCl (26). – *N*^α-Stearoyl-(*N*^ε-Z)-Lys-OH: Herstellung aus Stearinsäurechlorid [31] und H-(*N*^ε-Z)-L-Lys-OH analog der Vorschrift für *N*^α-Palmitoyl-(*N*^ε-Z)-Lys-OH (B, a)). Umkristallisiert aus Essigester/Petroläther, Smp. 95–97°, $[\alpha]_D^{24} = 0^\circ$ (*c* = 2,08, Alkohol).

C₃₂H₅₄O₅N₂ (546,76) Ber. C 70,29 H 9,96 N 5,13% Gef. C 70,53 H 9,71 N 5,01%

N^α-Stearoyl-(*N*^ε-Z)-L-Lys-(*N*^ε-Z)-L-Lys-OCH₃: Hergestellt aus *N*^α-Stearoyl-(*N*^ε-Z)-L-Lys-OH und H-(*N*^ε-Z)-Lys-OCH₃ mittels DCCD (analog C, e). Umkristallisiert aus Alkohol/Wasser, Smp. 105–108°.

C₄₆H₇₆O₈N₄ (837,12) Ber. C 68,88 H 9,15 N 6,70% Gef. C 68,54 H 8,87 N 6,61%

Hydrogenolyse: Mit Pd in Eisessig, Überführung ins Dihydrochlorid. Umkristallisiert aus Alkohol/Äther, Smp. ab 235°, langsame Zersetzung; $[\alpha]_D^{25} = -19^\circ$ (*c* = 2,3, H₂O).

k) *N*^α-Arachoyl-Lys→Lys-OCH₃·2HCl (27). – *N*^α-Arachoyl-(*N*^ε-Z)-Lys→(*N*^ε-Z)-Lys-OCH₃: Arachinsäurechlorid, dargestellt aus Arachinsäure mittels Thionylchlorid, Smp. 28–31°.

C₂₀H₃₈OCl (330,97) Ber. C 72,57 H 11,88 Cl 10,71% Gef. C 72,84 H 11,79 Cl 10,96%

Dieses wird mit H-(*N*^ε-Z)-Lys→(*N*^ε-Z)-Lys-OCH₃ umgesetzt und aufgearbeitet. Ausbeute 56%. Smp. 120–123° aus Essigester/Petroläther.

C₄₆H₇₈O₈N₄ (851,14) Ber. C 69,13 H 9,24 N 6,58% Gef. C 69,37 H 9,12 N 6,63%

Hydrogenolyse: Ergibt in 81% Ausbeute das Dipeptidester-dihydrochlorid. Smp. 220–223° aus Methanol/Äther; $[\alpha]_D^{20} = -16,5^\circ$ (*c* = 2,0, Methanol).

l) *N*^α-Phytanoyl-Lys→Lys-OCH₃·2HCl (28). – *N*^α-Phytanoyl-(*N*^ε-Z)-Lys→(*N*^ε-Z)-Lys-OCH₃: Phytanoylchlorid aus racemischer Phytansäure [32] wird mit H-(*N*^ε-Z)-Lys→(*N*^ε-Z)-Lys-OCH₃ umgesetzt und wie üblich aufgearbeitet. Ausbeute 61%. Smp. 115–118° aus Essigester/Petroläther; $[\alpha]_D^{20} = -12,9^\circ$ (*c* = 2,0, Methanol).

C₄₉H₇₈O₈N₄ (851,14) Ber. C 69,13 H 9,24 N 6,58% Gef. C 69,04 H 9,15 N 6,77%

Hydrogenolyse: Diese ergibt ein Endprodukt (64%) mit Smp. 215–219°; $[\alpha]_D^{22} = -19,5^\circ$ (*c* = 2,0, Methanol).

D) Verbindungen der Tabelle 4

a) *Palmitinsäure* (29). Zur Verwendung gelangte ein Handelspräparat der FLUKA AG.

b) *N*^α-Palm-Lys→HBr (30). 5,2 g *N*^α-Palm-(*N*^ε-Z)-Lys-OH werden mit 30 ml 33-proz. Bromwasserstoff/Eisessig 2 Std. unter CaCl₂-Verschluss geschüttelt, 15 Min. im Vakuum entgast, mit

250 ml Äther verdünnt, 2mal mit 30 ml Wasser extrahiert, die wässrigen Phasen mit Äther gewaschen und im Vakuum bei 35° bis zur reichlichen Kristallbildung eingedampft. Nach Abnutschen und Trocknen wird aus Alkohol/Essigester/Petroläther umgefällt. Ausbeute 75%; Smp. 109–112° (Zers.), $[\alpha]_D^{25} = -9,9^\circ$ ($c = 1,6$, Alkohol).

$C_{22}H_{44}O_3N_2 \cdot HBr$ (465,52) Ber. N 6,03 Br 17,17% Gef. N 6,03 Br 16,91%
c) *H-Lys-OCH₃ · 2HCl* (31)⁷⁾.

E) Verbindungen der Tabelle 7

a) *N^α-Palm-D-Lys* → *D-Lys-OC₂H₅ · 2HCl* (32). - *N^α-Palm-(N^ε-Z)-D-Lys-OCH₃*: Herstellung analog der L-Verbindung [B, d)]. Smp. 90–91°.

N^α-Palm-(N^ε-Z)-D-Lys-NHNH₂: Herstellung analog der L-Verbindung aus *N^α-Palm-(N^ε-Z)-D-Lys-OCH₃* und Hydrazinhydrat. Smp. 152–154°, $[\alpha]_D^{25} = +6,8^\circ$ ($c = 2$, DMF).

N^α-Palm-(N^ε-Z)-D-Lys → *(N^ε-Z)-D-Lys-OC₂H₅*: Herstellung analog der entsprechenden L → L-Verbindung. Smp. 124–126°, $[\alpha]_D^{25} = +8,4^\circ$ ($c = 2$, DMF).

Hydrogenolyse: Analog der L → L-Verbindung. Smp. 245–250° (Zers.), $[\alpha]_D^{25} = +24^\circ$ ($c = 3$, H₂O) (optisch rein).

$C_{30}H_{62}O_4N_4Cl_2$ (613,74) Ber. Cl 11,55 OC₂H₅ 7,34% Gef. Cl 11,30 OC₂H₅ 7,17%

b) *N^α-Palm-DL-Lys* → *DL-Lys-OC₂H₅ · 2HCl* (L → L; D → D) (34). - *N^α-Palm-(N^ε-Z)-DL-Lys-OH*: Herstellung analog der L-Verbindung [B, d)]. Umkristallisiert aus Methanol/Essigester, Smp. 134–136°.

$C_{30}H_{50}O_5N_2$ (518,70) Ber. N 5,40% Gef. N 5,55%

N^α-Palm-(N^ε-Z)-DL-Lys → *(N^ε-Z)-DL-Lys-OC₂H₅* (*Racematgemisch*): Herstellung aus *N^α-Palm-(N^ε-Z)-DL-Lys-OH* und *H-(N^ε-Z)-DL-Lys-OC₂H₅* mit DCCD analog der entsprechenden L → L-Verbindung. Umkristallisiert aus Alkohol/Wasser, Smp. 103–108°.

$C_{46}H_{72}O_8N_4$ (809,07) Ber. C 68,28 H 8,97 N 6,92% Gef. C 69,08 H 8,95 N 7,17%

Hydrogenolyse: Analog der L → L-Verbindung. Das Dihydrochlorid stellt ein Racematgemisch dar, Smp. 210–220° (Zers.). 150 g dieses Racematgemisches werden in 2,5 l siedendem Alkohol gelöst und über Nacht bei 0° aufbewahrt. 1. Fraktion: 77 g, Smp. 224–230° (Zers.); 2. Fraktion: 35 g, Smp. 226–230° (Zers.); 3. Fraktion: 38 g, Smp. 200–206° (Zers.). (3. Fraktion aus der Mutterlauge der 2. Fraktion durch Eindampfen und Ausfällen mit Aceton erhalten.) Die 1. und 2. Fraktion werden gemeinsam aus siedendem Alkohol umkristallisiert. Man erhält 105 g eines schwerlöslichen Racemates, Smp. 226–230°.

$C_{30}H_{62}O_4N_4Cl_2$ (613,74) Ber. N 9,13 Cl 11,55% Gef. N 9,03 Cl 11,57%

Durch Eindampfen gleicher Mengen gleichkonzentrierter alkoholischer Lösungen von authentischem *N^α-Palm-Lys* → *Lys-OC₂H₅ · 2HCl* (12) und *N^α-Palm-D-Lys* → *D-Lys-OC₂H₅ · 2HCl* (32) erhält man das gleiche Racemat, das im Smp. und in der Löslichkeit dem obigen schwerlöslichen Racemat entspricht. Es handelt sich somit um das Racemat der Zusammensetzung: (L → L; D → D).

c) *N^α-Palm-DL-Lys* → *DL-Lys-OC₂H₅ · 2HCl* (D → L; L → D) (33). Die 3. Fraktion aus dem Racematgemisch von *N^α-Palm-DL-Lys* → *DL-Lys-OC₂H₅ · 2HCl* (Verbindung 34, Hydrogenolyse) wird in wenig kaltem Alkohol gelöst und durch Zusatz von Aceton kristallisiert. Man erhält 35 g leichtlösliches Racemat, das vorwiegend die Zusammensetzung D → L; L → D aufweist. Smp. 200–206°.

$C_{30}H_{62}O_4N_4Cl_2$ (613,74) Ber. N 9,13 Cl 11,55% Gef. N 9,07 Cl 11,62%

F) Antibakterielle Wirkung (Tabelle 5). - Die Dilutionsteste führten wir bei der Prüfung der wasserlöslichen Präparate gegen anspruchsvolle Keime auf dem Nährmedium Brain Heart Infusion (Difco 0037), und gegen gut wachsende Erreger auf gewöhnlicher Nährbouillon (Difco 0003) durch. Nach der Impfung mit 1 Tropfen einer 18- bis 24-stündigen Inoculumkultur pro 5 ml Nährmedium wurden die Verdünnungsreihen bei 37°C während 24 Std. bebrütet, die sichtbare Hemmung abgelesen, danach aus jeder Konzentrationsstufe eine Öse auf eine Agarplatte (je nach den Ansprüchen des Erregers mit oder ohne Blutzusatz) verimpft, um die abtötenden Titer nach 24-stdg. Bebrütung der Subkulturen zu bestimmen.

G) Abbauversuche (vgl. Tabelle 7). - a) *Versuche mit Trypsin*: Die Präparate wurden mit Trypsin im Gewichtsverhältnis 20 : 1 bei pH 8,0 inkubiert (37°). Die Prüfung auf allfällige Spaltprodukte erfolgte periodisch durch Papierchromatographie in *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 1.

⁷⁾ Analog hergestellt wie *D-Lysin-methylester · 2HCl* [33].

b) *Abbau mit Meerschweinchen-Darmsaft*: Ansätze zur papierchromatographischen Lys-Bestimmung: Je 10 μ Mol Substanz wurden in 0,50 ml Darmsaft bei 37° inkubiert; periodisch wurden aliquote Proöbchen von 0,10 ml entnommen, 5 Min. auf 100° erhitzt, im Vakuum eingedunstet, mit 1–2 Tropfen 2N HCl aufgenommen und erneut über KOH zur Trockne gebracht. Nach Lösen in 0,20 ml Wasser wurden zur Papierchromatographie 10 μ l (0,1 μ Mol eingesetzter Substanz entsprechend) strichförmig aufgetragen. Auf den gleichen Papieren liefen ferner entsprechende Mengen Darmsaft allein, sowie Lysin-Standardlösungen (0,02–0,2 μ Mol) mit. Chromatographiert wurde auf SCHLEICHER & SCHÜLL-Papier 2043b gewaschen, 15 Std. absteigend mit *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 und *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24. Die fertigen Chromatogramme wurden 1 Std. in der Kapelle getrocknet und dann durch folgende Lösung [34] gezogen: 1 g Ninhydrin in 180 ml Aceton + 10 ml Wasser + 10 ml Eisessig. Die Chromatogramme liess man wiederum 1 Std. in der Kapelle hängen und erwärmte anschliessend im Trockenschrank 10 Min. auf 70°. Die violetten Lysinbanden wurden dann beidseitig mit Kupferreagens besprüht, bis die Farbe durchgehend in Rot umschlug.

Kupferreagens [34]: 1 ml gesättigte, wässrige Cu-Nitratlösung + 0,05 ml 20-proz. HNO₃ mit Aceton auf 100 ml stellen.

Die Banden wurden ausgeschnitten, fein zerschnitzelt, mit 3–6 ml abs. Methanol eluiert und innerhalb 90 Min. im Spektralphotometer (BECKMAN B) bei 504 $m\mu$ gemessen. Bei der Auswertung wurden Papier- und Darmsaft-Blindwerte berücksichtigt (die Darmsaftproben enthielten oft geringe Mengen freies Lys).

c) *Dünnschichtchromatographie der freien Palmitinsäure*: Die 24-Std.-Proöbchen wurden mit 0,2 ml Benzol extrahiert und 5–10 μ l Benzolextrakt auf eine Kieselgel-G-Platte aufgetragen; zum Vergleich liess man 2–10 μ g Palmitinsäure mitlaufen (ein Darmsaft-Blindversuch ergab keine freie Palmitinsäure). Mobile Phase: Petroläther tiefs./Äther abs./Eisessig *p. a.* 100:20:1. Laufstrecke: 10 cm; Dauer: ca. 30 Min. Anfärbung: Die Platte wurde zuerst mit einer Lösung von 50 mg Nilblau (SIEGFRIED AG.) in 50 ml Äthanol und 20 ml Diäthanolamin, und anschliessend mit Wasser (sehr fein vernebelt!) besprüht: dunkelblaue Flecke; Empfindlichkeit ca. 1 μ g. Der Rf-Wert der Palmitinsäure liegt je nach Wassergehalt der Lösungsmittel und dem Sättigungsgrad des Troges zwischen 0,6 und 0,8.

Die Mikroanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Dr. A. DIRSCHERL ausgeführt.

SUMMARY

The synthesis of a new class of surface active agents consisting of basic peptides containing on one amino group a large aliphatic acyl residue is outlined. There are some definite relations between constitution and antibacterial properties. The structural conditions for maximum activity are:

- 1) The peptide has to consist of strongly basic amino-acids. Lysine as an inexpensive constituent seems to be the material of choice.
- 2) Lengthening of the peptide chain in the oligo series is associated with increasing activity, but lysine dipeptides show optimal properties.
- 3) The aliphatic fatty acid residue has to contain preferably 14–18 carbon atoms, palmitic acid representing the optimum. It should be attached to the N $^{\alpha}$ -amino group.
- 4) The carboxyl end has to be protected, *e. g.* by an ester or amide function, in order to avoid a decrease in basicity.
- 5) Lower units such as acylated basic amino-acids exhibit lower activity, especially against GRAM-negative pathogens.

The *in vitro* antibacterial activity of the prototypes such as N $^{\alpha}$ -palmitoyl-L-lysyl-L-lysineethyl ester dihydrochloride is specified in comparison with quaternary ammonium salts and broad spectrum antibiotics.

Studies on degradation *in vitro* by intestinal juice (guinea pig) and proteolytic enzymes are reported. Intestinal proteolysis depends mainly on the configuration of the amino-acid moieties. The D-form resists proteolysis. These results conform with the LD₅₀ figures, which are lower in the D-series and racemic products as compared with the corresponding L-forms.

Chemische und Medizinische Forschungsabteilung der
F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. A. G., Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER & E. BÖHNI, *Experientia* **17**, 223 (1961).
- [2] K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER, E. BÖHNI & B. FUST, *Helv.* **46**, 2823 (1963).
- [3] W. HAUSMANN & L. C. CRAIG, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 4892 (1954).
- [4] W. HAUSMANN, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 3663 (1956).
- [5] P. P. REGNA, *Amer. J. Med.* **18**, 686 (1955).
- [6] H. KOFFLER, *Science* **130**, 1419 (1959).
- [7] Vgl. Schweiz. Patentanmeldung vom 1. 6. 61 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. A.G., Basel).
- [8] T. ITO & O. OGAWA, *Bull. agric. chem. Soc. Japan* **23**, 536 (1959); *J. agric. chem. Soc. Japan* **26**, 432 (1952); **24**, 418 (1950).
- [9] K. TOKO & T. OHNO, *J. agric. chem. Soc. Japan* **29**, 370 (1955).
- [10] E. I. VALKO & A. S. DU BOIS, *J. Bacteriol.* **50**, 481 (1945); Z. BAKER, R. W. HARRISON & B. F. MILLER, *J. exp. Med.* **73**, 249 (1941).
- [11] S. G. WALEY & J. WATSON, *Biochem. J.* **55**, 328 (1953).
- [12] N. A. SMART, G. T. YOUNG & M. W. WILLIAMS, *J. chem. Soc.* **1960**, 3902.
- [13] M. BRENNER & W. HUBER, *Helv.* **36**, 1109 (1953).
- [14] M. BERGMANN, L. ZERVAS & W. F. ROSS, *J. biol. Chemistry* **111**, 245 (1935).
- [15] G. W. ANDERSON & R. W. YOUNG, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 5307 (1952).
- [16] D. W. ADAMSON, *J. chem. Soc.* **1939**, 1564.
- [17] K. VOGLER & L. H. CHOPARD-DIT-JEAN, *Helv.* **43**, 280 (1960).
- [18] K. VOGLER & P. LANZ, *Helv.* **43**, 270 (1960).
- [19] K. SCHLÖGL & H. FABITSCHOWITZ, *Mh. Chem.* **84**, 937 (1953); M. BERGMANN, L. ZERVAS & W. F. ROSS, *J. biol. Chemistry* **111**, 245 (1935).
- [20] M. BERGMANN, L. ZERVAS & W. F. ROSS, *J. biol. Chemistry* **111**, 245 (1935); St. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **41**, 1867 (1958).
- [21] Arbeitsweise von J. HONZL & J. RUDINGER, *Coll. czechoslov. Commun.* **26**, 2333 (1961).
- [22] E. FISCHER & W. A. JACOBS, *Ber.* **39**, 2942 (1906); St. GUTTMANN & R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **41**, 1852 (1958).
- [23] F. R. KONINSZY & K. FOLKERS, U.S.P. 2538104 (1951).
- [24] S. G. WALEY & J. WATSON, *Biochem. J.* **57**, 529 (1954).
- [25] J. C. HARRIS & T. S. WORK, *Biochem. J.* **46**, 582 (1950).
- [26] R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.* **42**, 99 (1948).
- [27] H. O. VAN ORDEN & E. L. SMITH, *J. biol. Chemistry* **208**, 751 (1954); K. HOFMANN, W. D. PECKHAM & A. RHEINER, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 238 (1956).
- [28] M. BERGMANN, L. ZERVAS & H. RINKE, *Z. physiol. Chem.* **224**, 40 (1934), und [27].
- [29] K. HOFMANN, E. STUTZ, G. SPÜHLER, H. JAGIMA & E. T. SCHWARZ, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 3727 (1960).
- [30] C. HUGGIN & J. LAPIDES, *J. biol. Chemistry* **170**, 467 (1947).
- [31] H. E. FIERZ-DAVID & W. KUSTER, *Helv.* **22**, 82 (1939).
- [32] P. KARRER & A. EPPRECHT, *Helv.* **23**, 272 (1940).
- [33] M. BERGMANN, L. ZERVAS & J. P. GREENSTEIN, *Ber.* **65**, 1692 (1932).
- [34] K. RÖWE, E. FERBER & H. FISCHER, *Z. physiol. Chem.* **313**, 174 (1958).