

126. Synthesen in der Polymyxin-Reihe

9. Mitteilung¹⁾

Synthese von Polymyxin B₁

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

(15. V. 65)

A. Einleitung

In den letzten Jahren ist mit erheblichem Aufwand versucht worden, die Konstitution der Polymyxine [1], einer Gruppe von basischen, fettsäurehaltigen Cyclopeptiden, die vor allem gegen Gram-negative Infektionserreger Verwendung finden, abzuklären.

Der wichtigste Vertreter war Polymyxin B₁, das HAUSMANN & CRAIG [2] bereits vor 1956, d. h. in der Pionierzeit der Gegenstromverteilung, als erster Vertreter dieser Gruppe in reinem Zustand isolieren konnten. Durch saure Partialhydrolyse gelang es kurz darauf HAUSMANN [3], die Konstitution dieses Antibiotikums auf vier mögliche Varianten einzuschränken. Da es damals sehr schwierig erschien, auf analytischem Wege eine endgültige Auslese zu treffen, versuchten wir durch Synthesen, die sich über mehrere Jahre ausdehnten, dieses Ziel zu erreichen. Es gelang uns, die vier Varianten [4] [5] [6] [7], die wir nach der Anzahl der Aminosäuren im Ring (8 bzw. 7) und der Art der Verknüpfung der Seitenketten an der α - oder γ -Aminogruppe des Verzweigungsgliedes als 8 α oder 8 γ und 7 α oder 7 γ bezeichneten [4], durch Total-synthese zu gewinnen. Zwei davon, 7 α und 7 γ , waren *in vitro* und *in vivo* hochaktiv, untereinander und relativ zum Naturprodukt in den physikalisch-chemischen Eigenschaften sehr ähnlich, aber mit diesem nicht identisch [7]. Es bedurfte indessen besonderer Anstrengungen, diese Nichtidentität auf chemischem Wege zu erhärten. Das wichtigste Instrument dazu war die Rotationsdispersion der zuerst von BRINTZINGER [8] hergestellten Ni-Komplexe sowie die spezifische Drehung.

Eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit ergab sich bereits im Juni 1963 aus dem Verhalten gegen das Enzym Nagarse [9], das aus natürlichem Polymyxin B₁ und aus den synthetischen Cyclopeptiden 7 γ und 7 α Spaltprodukte freimachte, die sich plattenchromatographisch verschieden verhielten.

Nach diesen Ergebnissen sowie besonderen zusätzlichen Untersuchungen war es dann für uns klar, dass diese Unterschiede nicht auf mangelnde Reinheit, Partial-racemisierung, Nebenreaktionen bei der Cyclisierung oder Inaktivierung, z. B. durch Na/fluß. NH₃, zurückgeführt werden konnten. Ein Fehler musste vielmehr noch in der Analyse des Naturproduktes gelegen haben.

¹⁾ 8. Mitteilung vgl. [7]. Eine vorläufige Mitteilung dieser Arbeit ist in *Experientia* 20, 365 (1964) erschienen. – Abkürzungen: Dab = α, γ -Diaminobuttersäure, Z = Benzyloxycarbonyl, BOC = *t*-Butyloxycarbonyl, Bu^t = *t*-Butylester, OPN = *p*-Nitrophenylester, PHT = Phthaloyl, DMF = Dimethylformamid. Anstelle der früher verwendeten Abkürzung «Ipel» für (+)-6-Methyloctansäure (Isopelargonsäure) ziehen wir aus Gründen der korrekteren Schreibweise die im englischen Sprachgebrauch verwendete Abkürzung MOA vor.

HAUSMANN & CRAIG [2] hatten nach Totalhydrolyse des natürlichen Polymyxins B₁ D-Phenylalanin präparativ isoliert und eindeutig identifiziert. Der Drehwert des Monohydrochlorides der isolierten α, γ -Diaminobuttersäure von $[\alpha]_D^{25} = +20,3^\circ$ ($c = 2, 6N HCl$) war aber gegenüber dem Literaturwert [10] von $[\alpha]_D^{25} = +31,6^\circ$ ($c = 2, 6N HCl$)²⁾ zu niedrig. Dies führte sie zum Schluss, dass entweder eine partielle Racemisierung während der Totalhydrolyse eingetreten war, oder aber, dass im ursprünglichen Peptid einer der sechs α, γ -Diaminobuttersäurereste in der D-Form vorliege. Eine ähnliche Beobachtung ist auch von uns nach Totalhydrolyse von Polymyxin B₁ und Abbau der Dab-Fraktion mit L-Aminosäureoxydase [7] gemacht worden. Ob es sich dabei um eine Partialracemisierung bei der Totalhydrolyse handelt, bildet noch Gegenstand einer besonderen Untersuchung. BIZERTE & DAUTREVAUX berichteten [12] etwas später über die Isolierung des Fragmentes MOA \rightarrow Dab der Seitenkette sowie über den Nachweis des Dab-Restes als zur D-Konfiguration gehörend. Unsere synthetischen Produkte enthielten demzufolge zwei D-Aminosäuren, D-Phenylalanin in der Ringsequenz und eine D- α, γ -Diaminobuttersäure in Nachbarstellung der Fettsäure.

Kürzlich konnten nun SUZUKI *et al.* [11] [13] nach Abbau von Polymyxin B₁ mit dem Enzym Nagarse durch Gegenstromverteilung die drei Peptide MOA-Dab-Thr, MOA-Dab-Thr-Dab und Cyclo(γ -Dab-Dab-D-Phe-Leu-Dab-Dab-Thr-) isolieren. Aus jedem der drei Peptide konnte präparativ α, γ -Diaminobuttersäure in optisch reiner Form isoliert werden, die mit Hilfe der optischen Drehung, IR.-Spektrum und D-Aminosäureoxydase als eindeutig nur zur L-Konfiguration gehörend bestimmt wurde. Aus diesen Fragmenten und den früher von HAUSMANN [3] sowie BIZERTE & DAUTREVAUX [12] erhaltenen Bruchstücken ergab sich die Struktur 7 α . Zum gleichen Ergebnis ist unabhängig von den japanischen Forschern WILKINSON [14] mit anderer Methodik gekommen, wobei die Formel des Naturproduktes auf die zwei möglichen Strukturen 8 γ und 7 α eingeengt werden konnte.

Die Struktur 7 α ist aus biogenetischen Gründen schon vor zwei Jahren nach dem Resultat der biologischen Aktivität als wahrscheinlichste Struktur des Naturproduktes in Erwägung gezogen worden [15]. Nun konnten mit einem Schlage die damaligen Abweichungen in der spezifischen Drehung und in der Rotationsdispersion erklärt werden. Ein Einbau von L-Dab in 1' (Fig. 1) müsste den spezifischen Drehwert erhöhen und würde wohl auch die Maxima der COTTON-Kurven des Kupferkomplexes ändern.

Im Lichte dieser neuen Ergebnisse war unser früher synthetisiertes Cyclodecapeptid 7 α (1'-D-Dab) als ein Stereoisomeres des Naturproduktes (7 α , all-L-Dab) anzusprechen. Dies ist nun durch die Totalsynthese bestätigt worden (vgl. Fig. 4).

B. Synthese

In Anlehnung an die Synthesen der cyclischen Decapeptide 8 γ [4], 8 α [5], 7 α [6] und 7 γ [7] wurde zuerst das vollständig geschützte, verzweigte Decapeptid 7 α (XXIV) hergestellt (Fig. 1).

²⁾ Dieser Wert ist aber zu hoch. Eigene Messungen an einem analysenreinen Präparat des Monohydrochlorids von α, γ -Diaminobuttersäure ergaben $[\alpha]_D^{25} = +24,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 2,5, 6N HCl$), vgl. auch SUZUKI *et al.* [11], die $[\alpha]_D^{24} = +22,5^\circ \pm 1^\circ$ ($c = 0,9843, 6N HCl$) angeben.

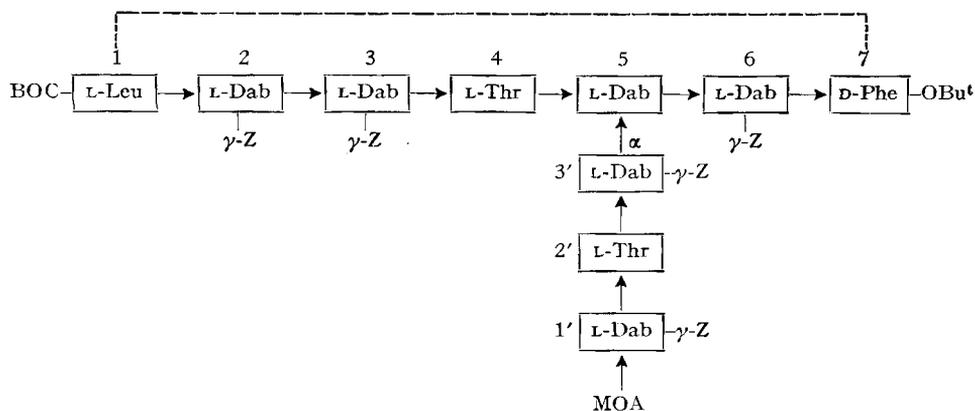
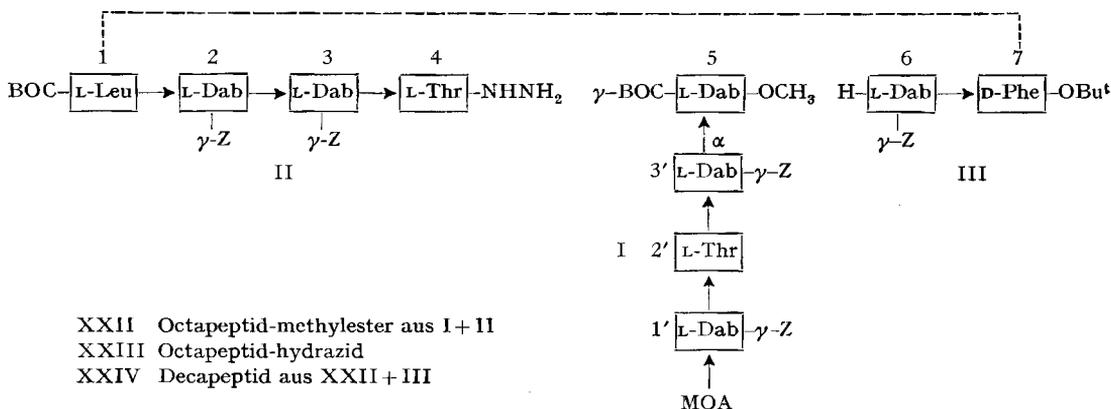


Fig. 1. *Decapeptid XXIV*

Im Gegensatz zu den früher verwendeten Schutzgruppen (Formyl-, *p*-Toluolsulfonyl-, Carbobenzoxy- bzw. Methyl ester) wurde diesmal zum Schutz der Aminogruppe in 1-Stellung der *t*-Butyloxycarbonylrest, zum Schutze der Carboxylgruppe in 7-Stellung der *t*-Butylester und für die γ -Aminogruppen der Z-Rest verwendet. Der dadurch bedingte veränderte Weg zur Synthese des geschützten, verzweigten Decapeptides (Fig. 1) ist in Fig. 2 dargestellt.



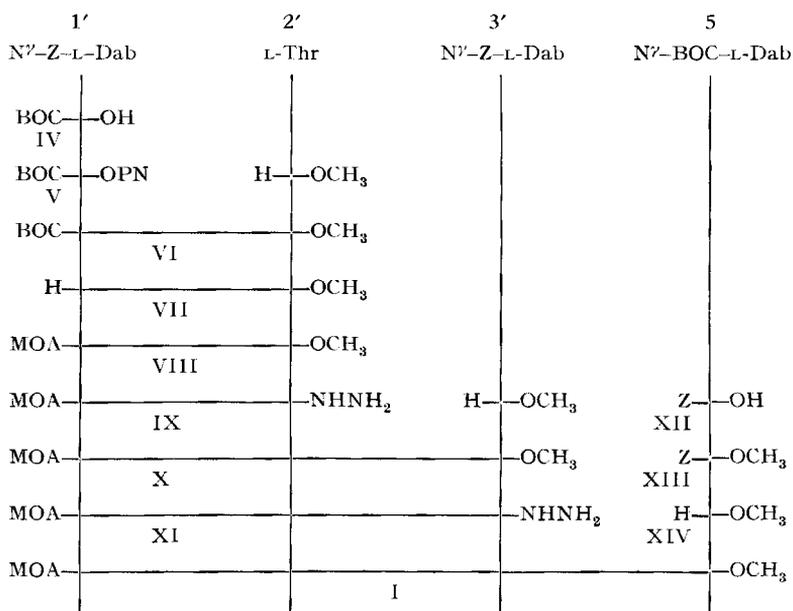
- XXII Octapeptid-methylester aus I + II
- XXIII Octapeptid-hydrazid
- XXIV Decapeptid aus XXII + III

Fig. 2. *Aufbauschema des geschützten Decapeptids*

Die drei Zwischenprodukte I, II und III mussten ebenfalls neu synthetisiert werden.

1. *Synthese des Tetrapeptid-Derivates I (1'-2'-3'-5)*. Das Tetrapeptid-Derivat I wurde nach Schema 1 aufgebaut.

Das Dipeptid VI wurde durch Umsetzung von N^{α} -BOC- N^{γ} -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure-*p*-nitrophenylester V mit L-Threonin-methylester als ölige Verbindung erhalten. Nach Abspaltung des BOC-Restes mit Trifluoressigsäure konnte das Di-

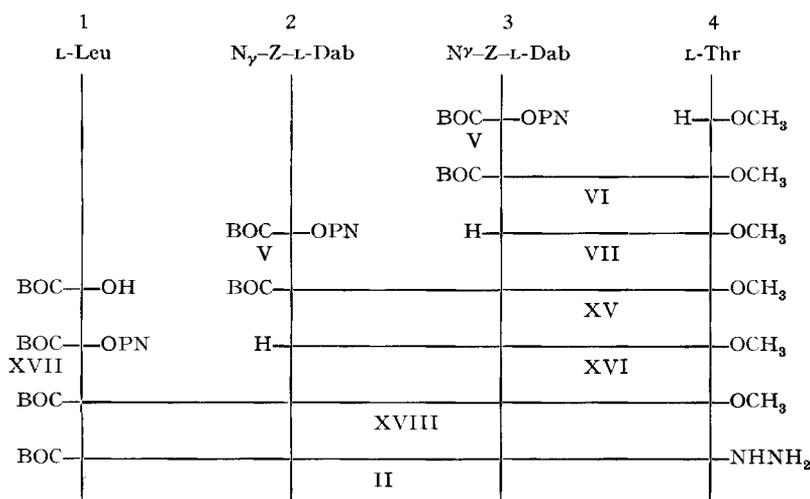
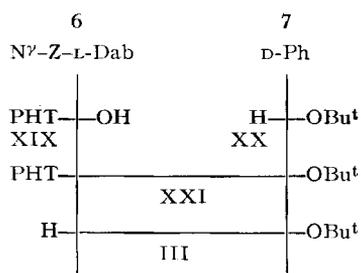
Schema 1. *Synthese des Tetrapeptid-Derivates I*

peptid-Derivat VII als Hydrochlorid kristallin erhalten werden. Dieses wurde mit (+)-6-Methyl-octansäure mit Hilfe von Carbonyldiimidazol zum N^α-(+)-6-Methyl-octanoyl-N^γ-Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester (VIII) gekuppelt und nachfolgend mit Hydrazinhydrat ins entsprechende Hydrazid IX verwandelt. Die Überführung von IX in das Säureazid und anschließende Kondensation mit N^γ-Z-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester lieferte N^α-(+)-6-Methyl-octanoyl-N^γ-Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N^γ-Z-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester (X). Nach Herstellung der Hydrazides XI wurde in einer weiteren Azidreaktion XI mit N^γ-BOC-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester (XIV) zum geschützten Tetrapeptid I verlängert. XIV wurde durch Carbobenzylierung von N^γ-BOC-L- α , γ -diaminobuttersäure [16] zu XII, Veresterung von XII mit Diazomethan zu XIII und anschließende katalytische Hydrierung des letzteren über Pd/C erhalten und konnte als Hydrochlorid kristallin gefasst werden.

2. *Synthese des Tetrapeptides II (1-2-3-4)*. Das Tetrapeptid II wurde durch stufenweisen Aufbau vom N-Terminus her nach der *p*-Nitrophenylester-Methode [17] erhalten (Schema 2).

Für den Schutz der α -Aminogruppe wurde durchwegs der BOC-Rest gewählt, der sich leicht selektiv durch Trifluoressigsäure entfernen liess. Die entstehende Esterbase XVI wurde als kristallines Hydrochlorid charakterisiert.

3. *Synthese des Dipeptides III (6-7)*. Die Synthese des Dipeptid-Derivates III (Schema 3) konnte durch Kondensation von N^α-Phtaloyl-N^γ-Z-L- α , γ -diaminobuttersäure (XIX) mit D-Phenylalanin-*t*-butylester (XX) und Dicyclohexylcarbodiimid erreicht werden. Abspaltung der Phtaloylgruppe mit Hydrazin führte zu III, das in Form seines Hydrochlorides kristallisiert werden konnte.

Schema 2. *Synthese des Tetrapeptid-Derivates II*Schema 3. *Synthese des Dipeptid-Derivates III*

4. *Synthese des Cyclodecapeptides 7 α (all-L-Dab) (XXV)*. Die γ -BOC-Gruppe im Tetrapeptid I (1'-2'-3'-5) wurde mit Trifluoressigsäure abgespalten und das erhaltene Produkt mit dem Azid von II (1-2-3-4) (Fig. 2) zum geschützten Octapeptid-methylester XXII umgesetzt. Dieser wurde mit Hydrazinhydrat ins entsprechende Hydrazid XXIII übergeführt und nach dem Azidverfahren mit III (5-6) zum vollständig geschützten Decapeptid XIV (Fig. 1) verlängert. Die beiden Kettenenden 1 und 7 wurden durch kurze Behandlung mit Trifluoressigsäure freigelegt und das erhaltene Produkt mit überschüssigem Carbodiimid in hoher Verdünnung in Dimethylformamid/Dioxan cyclisiert.

Die Abspaltung der Z-Gruppen aus dem Cyclisierungsprodukt verlief mit Hilfe der katalytischen Hydrierung über Pd/C in Eisessig bei Raumtemperatur nicht vollständig. Eine vollständige Abspaltung konnte mit Natrium in flüssigem Ammoniak erreicht werden.

Die Reinigung dieses Rohproduktes zum reinen *cyclo*-Decapeptid XXV (Fig. 4) erfolgte durch Gegenstromverteilung im System *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser

(40:10:5:45) und Fällung mit konz. NH_3 bei 0° . XXV konnte anschliessend als Pentaphosphat kristallisiert erhalten werden (Fig. 3).

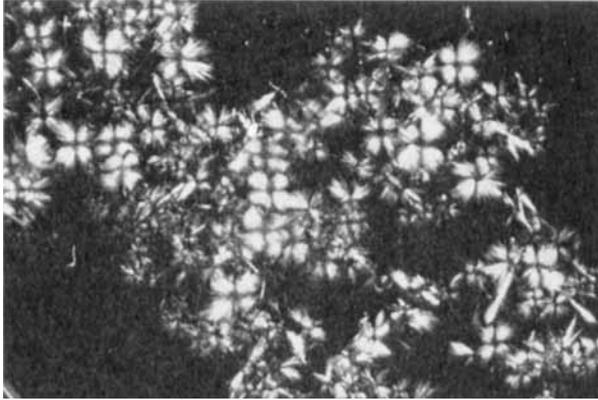


Fig. 3. Pentaphosphat von synthetischem Polymyxin B_1 im polarisierten Licht (Vergrößerung 55 fach) (Photo in unserer mikroanalytischen Abteilung von Herrn Dr. H. WALDMANN aufgenommen)

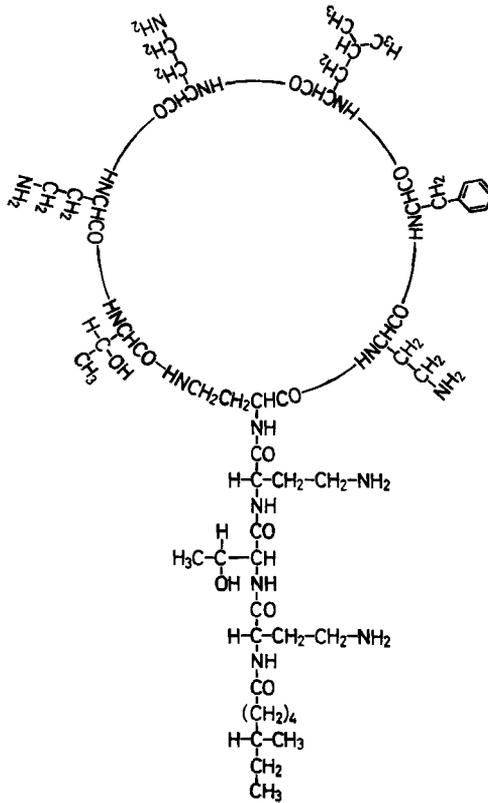


Fig. 4. Polymyxin B_1 = cyclisches Decapeptid 7α (all-L-Dab) XXV

C) Vergleich des Endproduktes mit natürlichem Polymyxin B₁

Das kristalline Phosphat des synthetischen *cyclo*-Decapeptids 7 α (XXV) wurde in Anlehnung an die Charakterisierung früherer Syntheseprodukte nach dem Schema der Tabelle 1 mit dem kristallinen Phosphat des natürlichen Polymyxins B₁ verglichen. Die Werte zeigen innerhalb der Fehlergrenzen eine gute Übereinstimmung.

Besonders wichtig war der Vergleich der Rotationsdispersion der Nickelkomplexe von natürlichem und synthetischem Polymyxin B₁. Wie wir früher zeigen konnten [7], bestand ein charakteristischer Unterschied in den Rotationsdispersionskurven der Nickelkomplexe von natürlichem Polymyxin B₁ und den beiden synthetischen Produkten 7 α und 7 γ , die beide in der Seitenkette eine D- α , γ -Diaminobuttersäure enthielten. Fig. 5 zeigt die erhaltenen Kurven, wobei als Vergleich das ursprüngliche *cyclo*-Heptapeptid 7 α (1'-D-Dab) mitaufgeführt ist.

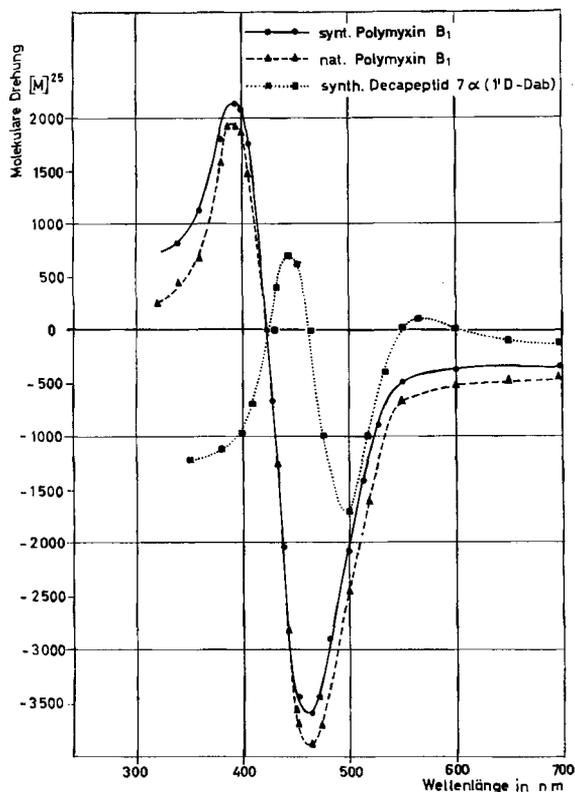


Fig. 5. Rotationsdispersionskurven der Nickelkomplexe des natürlichen Polymyxins B₁ und der synthetischen Produkte 7 α (all-L-Dab) und 7 α (1'-D-Dab)

Die Dispersionskurven von B₁ und dem synthetischen 7 α (all-L-Dab) sind praktisch identisch, unterscheiden sich jedoch deutlich von der Kurve des Stereoisomeren 7 α (1'-D-Dab). Auch die frühere Beobachtung [7], dass die Kurven der Lösungen von B₁ mit der Zeit bei Zimmertemperatur in charakteristischer Weise verändert werden, konnte nun am synthetischen 7 α (all-L-Dab) beobachtet werden. Die Verschiebungen sind sowohl qualitativ als auch quantitativ identisch.

Tabelle 1. Vergleich der kristallinen Pentaphosphate von synthetischem und natürlichem Polymyxin B₁³⁾

Analysecharakterisierung	synthetisch	natürlich
1. Papierchromatographie (<i>n</i> -Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24)	einheitlich; Rf = 0,66	einheitlich; Rf = 0,66
2. Dünnschichtchromatographie, Kieselgel G (<i>n</i> -Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24)	einheitlich; Rf = 0,68	einheitlich; Rf = 0,68
3. Hochspannungselektrophorese pH 2,5, 65 V cm ⁻¹ ; His = 1	einheitlich; 1,0 His	einheitlich; 1,0 His
4. $[\alpha]_D^{25}$ berechnet auf wasserfreie Substanz	-67,5° ± 3° (c = 0,273, H ₂ O)	-72,0° ± 3° (c = 0,35, H ₂ O)
5. Totalhydrolyse, Aminosäureverhältnis ber.: Dab Thr Phe Leu 6,0 2,0 1,0 1,0	gef.: Dab Thr Phe Leu 6,03 1,95 0,95 1,01	gef.: Dab Thr Phe Leu 6,2 2,0 0,9 1,0
6. Dinitrophenylierung und Hydrolyse des DNP-Peptides	kein DNP-Leu	kein DNP-Leu
7. Zersetzungspunkt	ca. 185-188°	ca. 185-188°
8. Wassergehalt (nach K. FISCHER)	4,01%	6,0%

3) Für die Erläuterungen zur Tabelle vgl. [6].

Der enzymatische Abbau von B_1 und dem neuen 7α (all-L-Dab) mit Hilfe des Enzyms Nagarse [9] und die nachfolgende plattenchromatographische Bestimmung der Bruckstücke zeigte, dass die beiden Substanzen zu identischen Fragmenten abgebaut werden. Diese Spaltstücke unterscheiden sich jedoch deutlich von denjenigen, die durch den Abbau von D-Dab enthaltenden 7α und 7γ mit Nagarse erhalten werden.

Nachdem es nun geglückt war, sowohl das natürliche B_1 als auch unser 7α (all-L-Dab) als Pentaphosphate zu kristallisieren, ist es merkwürdig, dass dies bis jetzt für die beiden früher beschriebenen Cyclodecapeptide 7α und 7γ (1'-D-Dab) noch nicht gelungen ist. Mikrobiologisch war das Verhalten von 7α (all-L-Dab) besonders gegenüber *Klebsiella pneumoniae* interessant. Während die früheren Cyclodecapeptide 7α und 7γ gegen *Brucella bronchiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* praktisch die gleiche Aktivität aufwiesen wie natürliches B_1 , waren beide gegen *Klebsiella pneumoniae* rund 5mal weniger aktiv.

Tabelle 2. Antibakterielle Aktivität in vitro des synthetischen und des natürlichen Polymyxin B_1 (kristalline Pentaphosphate)

Mikroorganismus	Mittlere Aktivität E ^a /mg	SE ^b) ±	Vertrauensgrenzen	p
<i>Brucella bronchiseptica</i> ATCC 4617				
Synthetisches Polymyxin B_1	5928	404	5120–6736	≥ 0,05
Natürliches Polymyxin B_1	6297	270	6297–6837	
<i>Escherichia coli</i> 10536				
Synthetisches Polymyxin B_1	7150	331	6488–7812	≥ 0,05
Natürliches Polymyxin B_1	6398	191	6016–6780	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10131				
Synthetisches Polymyxin B_1	8546	632	7282–9810	≥ 0,05
Natürliches Polymyxin B_1	7522	527	6468–8576	

^a) Bezogen auf Hilfsstandard Polymyxin B-Sulfat mit 7000 E/mg.

^b) Mittlerer Fehler vom Mittelwert.

Wir bestimmten nach derselben Methodik [7] die Aktivität des neuen synthetischen 7α (all-L-Dab) (als Pentaphosphat) in E/mg im Vergleich mit natürlichem Polymyxin B_1 (als Pentaphosphat) unter Benützung unseres Hilfsstandards Polymyxin-B-Sulfat und unter Berücksichtigung äquimolarer Verhältnisse.

Aus Tabelle 2 geht hervor, dass wir vom neuen Produkt nicht nur gegen *Brucella bronchiseptica* und gegen Colibazillen praktisch identische Aktivitäten mit dem Naturprodukt finden, sondern auch solche gegen *Klebsiella pneumoniae*. Die Aktivitäten gegen Klebsiellen und Colibazillen liegen im Mittel bei der synthetischen Verbindung sogar etwas höher als beim Naturprodukt. Die statistische Analyse zeigt jedoch, dass die Unterschiede nicht signifikant sind. Somit entspricht die Aktivität des neuen synthetischen Cycloheptapeptides derjenigen von natürlichem Polymyxin B_1 . Da sich das neue Cycloheptapeptid chemisch nur im Hinblick auf den Einbau von L-Diaminobuttersäureresten (anstelle von D-) unterscheidet, können wir folgern, dass wir in unserem Teststamm *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10131 einen Mikroorganismus haben, der auf Stereoisomeren anspricht.

D) Diskussion

Auf Grund der vorliegenden Resultate besitzt Polymyxin B₁ die von SUZUKI u. Mitarb. [13] sowie etwas später von WILKINSON [14] vorgeschlagene Struktur 7 α (all-L-Dab).

Es ist interessant, dass die früher beschriebenen Verbindungen 8 α , 8 γ , 7 α und 7 γ , die alle eine D-Dab in Nachbarstellung zur Fettsäure besitzen, ebenfalls hochaktive Substanzen mit dem Wirkungsspektrum der Polymyxine darstellen. Jedoch steht die Grössenordnung der Aktivität mit der Ringgrösse im Zusammenhang, indem eine Erweiterung des Rings von 7 auf 8 Aminosäuren mit einem Absinken der Aktivität auf rund 12% verbunden ist. Sowohl bei den beiden Achtering- als auch bei den beiden Siebnerring-Analogen spielt die Verknüpfung der Seitenkette in α - oder γ -Stellung der Verzweigungsdiaminobuttersäure für die antimikrobielle Aktivität praktisch keine Rolle. Die Einführung einer D-Diaminobuttersäure anstelle der L-Diaminobuttersäure in Nachbarstellung zur Fettsäure wird signifikant nur von einem der geprüften Organismen erfasst.

Ähnlich wie beim Gramacidin S [17] [18] [19] dürfte auch beim Polymyxin B₁ der ganze Charakter der Molekel für seine antimikrobielle Aktivität verantwortlich sein. Vermutlich wird auch die Polymyxinmolekel eine Konformation einnehmen, bei welcher die hydrophilen N γ -Aminogruppen und die hydrophoben Seitenketten mit der Fettsäure auf verschiedenen Seiten der Molekelebene angeordnet sind. Eine solche, dem Gramacidin S ähnliche Gestalt könnte ihre ähnliche Wirkung auf die Zellmembranen erklären.

Experimenteller Teil⁴⁾

Schema I

1. *N* α -BOC-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure (IV). 17,7 g (0,07 Mol) N γ -Z-L-Dab-OH [20] werden in 100 ml Wasser und 6,4 g MgO suspendiert und unter kräftigem Rühren bei 45° 20 g (0,14 Mol) *t*-Butyloxycarbonylazid [20] in 210 ml Dioxan zugetropft. Die Mischung wird über Nacht kräftig bei 45° gerührt und darauf im Vakuum auf ca. $\frac{1}{3}$ konzentriert. Das Konzentrat wird in einem Scheidetrichter auf Eiswasser gegossen, mit Essigester überschichtet, das pH mit eiskalter Zitronensäure sauer gestellt und die Trübung mit Essigester extrahiert. Die Essigesterlösung wird mit Wasser neutral gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft: 24 g Öl (97%).

Charakterisierung von IV als *Dicyclohexylaminsalz*: 6,8 g (0,019 Mol) des Öls werden in 50 ml Äther gelöst und in der Kälte mit 3,6 g (0,02 Mol) Dicyclohexylamin versetzt. Die erhaltenen Kristalle werden abgenutscht und aus Äther umkristallisiert. Smp. 98–101°. $[\alpha]_D^{25} = -6,2^\circ$ ($c = 1$, DMF).

C₂₈H₄₇O₆N₃ (533,7) Ber. C 65,26 H 8,88 N 7,87% Gef. C 64,70 H 8,69 N 7,85%

2. *N* α -BOC-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure-*p*-nitrophenylester (V). 3,4 g (0,0063 Mol) *N* α -BOC-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure (IV) werden zusammen mit 1,4 g (0,01 Mol) *p*-Nitrophenol in 40 ml Essigester gelöst, in Eis gekühlt und mit 2,1 g (0,01 Mol) DCCD versetzt. Nach 2stündigem Rühren in Eis wird vom Harnstoff abgenutscht und zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird aus Äthanol umkristallisiert. Smp. 110°. $[\alpha]_D^{25} = -26,5^\circ$ ($c = 2$, DMF).

C₂₃H₂₇O₈N₃ (473,47) Ber. C 58,34 H 5,75 N 8,88% Gef. C 58,62 H 5,88 N 8,97%

3. *N* α -BOC-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester (VI). 4,75 g (0,01 Mol) *N* α -BOC-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure-*p*-nitrophenylester (V) werden zusammen mit 1,4 g L-Thr-OCH₃

⁴⁾ Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Die Analysenmuster wurden 16 Std. über P₂O₅ bei 0,01 Torr/50–100° getrocknet. Die Mikroanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung unter der Leitung der Herren Dres. H. WALDMANN und A. DIRSCHERL ausgeführt. Für die sorgfältige Mitarbeit danken wir den Herren K. SCHWEIZER und W. BERNASCONI.

[19] (0,01 Mol) in 20 ml kaltem DMF gelöst, 1 Std. in Eis gerührt und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Darauf wird mit 200 ml Essigester verdünnt, mit eiskalter 5-proz. NaHCO_3 Lösung, Wasser, eiskalter 5-proz. Zitronensäure und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft: 4,5 g Öl. Dieses wird direkt weiterverwendet.

4. *N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin methylester-hydrochlorid (VII)*. 4,6 g (0,01 Mol) *N α -BOC-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester (VI)* werden mit 20 ml Trifluoressigsäure 40 Min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Der durch Abdampfen erhaltene ölige Rückstand wird in 20 ml 4N HCl/Methanol gelöst und die Lösung erneut zur Trockne verdampft. Das anfallende Hydrochlorid wird aus Methanol/Äther umkristallisiert. Ausbeute 3 g (75%) VII. Smp. 187°. $[\alpha]_D^{25} = +22,1^\circ$ ($c = 2$, DMF).

$\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{O}_6\text{N}_3\text{Cl}$	Ber. C 50,55	H 6,49	N 10,41	Cl 8,78%
(403,8)	Gef. „ 50,51	„ 6,36	„ 10,52	„ 8,89%

5. *N α -(+)-6-Methyloctanoyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester (VIII)*. 4,6 ml (0,02 Mol) (+)-6-Methyloctansäure [21] werden in 10 ml DMF und 40 ml Dioxan gelöst. Die auf 0° gekühlte Lösung wird mit 4,1 g (0,025 Mol) Carbonyldiimidazol [22] versetzt und 30 Min. bei 0° gerührt. Inzwischen werden 8,2 g (0,02 Mol) *N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester-hydrochlorid (VII)* in 20 ml DMF und 80 ml Dioxan gelöst, auf 0° gekühlt und mit 2,8 ml (0,02 Mol) Triäthylamin versetzt. Nach 10 Min. Rühren wird vom ausgefallenen Triäthylaminhydrochlorid abgentscht und das Filtrat mit der Reaktionslösung der Methyloctansäure vereinigt. Die Mischung wird 2 Std. bei 0° gerührt und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Darauf wird das Dioxan im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen und die Lösung mit 1N NH_3 , Wasser, 1N HCl und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird aus Methanol/Wasser umkristallisiert: 7,2 g (71%) VIII. Smp. 139–141°. $[\alpha]_D^{20} = -15,9^\circ$ ($c = 0,75$, Methanol).

$\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{O}_7\text{N}_3$ (507,6)	Ber. C 61,52	H 8,14	N 8,28%	Gef. C 60,99	H 7,94	N 8,07%
--	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

6. *N α -(+)-6-Methyloctanoyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threoninhydrazid (IX)*. 3,4 g (0,0067 Mol) *N α -(+)-6-Methyloctanoyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester (VIII)* werden in 20 ml Methanol gelöst, mit 1,7 ml Hydrazinhydrat versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das entstandene Gel wird mit Eiswasser verrieben, abgentscht, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das Hydrazid wird aus DMF/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 3,1 g (91%) IX. Smp. 215–218°. $[\alpha]_D^{25} = -9,4^\circ$ ($c = 2$, DMF).

$\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{O}_6\text{N}_5$ (507,6)	Ber. C 59,15	H 8,14	N 13,79%	Gef. C 59,07	H 7,99	N 13,85%
--	--------------	--------	----------	--------------	--------	----------

7. *N α -(+)-6-Methyloctanoyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threoninyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester (X)*. 5,1 g (0,01 Mol) *N α -(+)-6-Methyloctanoyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threoninhydrazid (IX)* werden in 100 ml 60-proz. Essigsäure und 7 ml (0,021 Mol) 3N HCl gelöst, auf -10° gekühlt und mit einer Lösung von 0,76 g (0,011 Mol) Natriumnitrit in 5 ml Wasser versetzt. Nach 5 Min. Rühren bei -10° wird das Azid mit Eiswasser gefällt, abgentscht, mit eiskalter 5-proz. NaHCO_3 -Lösung und kaltem Wasser gewaschen und scharf abgepresst. In der Zwischenzeit werden 4 g (0,013 Mol) *N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester-hydrochlorid* in 20 ml DMF gelöst, bei 0° mit 1,85 ml (0,013 Mol) Triäthylamin versetzt, 5 Min. bei 0° gerührt und dann das Triäthylaminhydrochlorid abgentscht. In das eiskalte Filtrat wird das Azid eingetragen und bis zur vollständigen Lösung unter Eiskühlung gerührt. Nach Stehen über Nacht im Eisschrank wird die Lösung mit Essigester verdünnt und mit 1N HCl, Wasser, 5-proz. NaHCO_3 -Lösung und Wasser neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Das Tripeptid wird aus Methanol/Wasser kristallisiert. Ausbeute 5,2 g (70%) X. Smp. 178–180°. $[\alpha]_D^{25} = -21^\circ$ ($c = 2$, DMF).

$\text{C}_{33}\text{H}_{55}\text{O}_{10}\text{N}_5$ (741,8)	Ber. C 61,52	H 7,47	N 9,44%	Gef. C 61,31	H 7,35	N 9,57%
---	--------------	--------	---------	--------------	--------	---------

8. *N α -(+)-6-Methyloctanoyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threoninyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäurehydrazid (XI)*. 2,4 g (0,0032 Mol) *N α -(+)-6-Methyloctanoyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threoninyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester (X)* werden in 25 ml Methanol gelöst, mit 1,7 ml Hydrazinhydrat versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das entstandene Gel wird mit Eiswasser verdünnt, abgentscht, mit Wasser, Äthanol und Äther ge-

waschen, getrocknet und aus DMF/Alkohol gefällt. Ausbeute 8 g (89%) XI. Smp. 249–251°. $[\alpha]_D^{22} = -15,2^\circ$ ($c = 0,5$, DMF).

$C_{37}H_{55}O_9N_7$ (741,8) Ber. C 59,90 H 7,47 N 13,22% Gef. C 60,25 H 7,61 N 13,20%

9. *N α -Z-N γ -BOC-L- α , γ -diaminobuttersäure (XII)*. 4,5 g (0,022 Mol) N γ -BOC-L- α , γ -diaminobuttersäure [16] werden in 11 ml (0,022 Mol) 2N NaOH gelöst und unter Eiskühlung und kräftigem Rühren gleichzeitig mit 3,5 g (0,022 Mol) Carbobenzoxylchlorid und 11 ml 2N NaOH innerhalb 30 Min. versetzt. Nach 4 Std. Rühren in Eis wird 2mal mit Äther extrahiert, anschliessend die wässrige Phase mit eiskalter Zitronensäure sauer gestellt und 2mal mit Äther extrahiert. Dieser wird mit Wasser neutral gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft: 6,8 g (92%) XII. Das entstandene Öl wird direkt weiterverwendet.

Charakterisierung von XII als *Dicyclohexylaminsalz*: 1 g Öl, in 10 ml Äther gelöst, wird bei 0° mit 0,55 g Dicyclohexylamin versetzt. Nach 1 Std. werden die Kristalle abgenutscht und aus Äthanol/Äther umkristallisiert. Smp. 198–200°. $[\alpha]_D^{23} = -7,6^\circ$ ($c = 1,8$, DMF).

$C_{29}H_{47}O_6N_3$ (533,7) Ber. C 65,26 H 8,88 N 7,87% Gef. C 65,56 H 8,64 N 7,96%

10. *N α -Z-N γ -BOC-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester (XIII)*. 2,2 g (0,065 Mol) N α -Z-N γ -BOC-L- α , γ -diaminobuttersäure (XII) werden in üblicher Weise mit Diazomethan verestert. Der erhaltene Ester wird aus Äther/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute 2,1 g (90%) XIII. Smp. 67–68°. $[\alpha]_D^{23} = -22^\circ$ ($c = 2,3$, DMF).

$C_{18}H_{26}O_6N_2$ (366,5) Ber. C 58,98 H 7,15 N 7,68% Gef. C 59,23 H 7,10 N 7,67%

11. *N γ -BOC-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester-hydrochlorid (XIV)*. 2,1 g (0,058 Mol) N α -Z-N γ -BOC-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester (XIII) werden in 100 ml Methanol gelöst und über Palladiumkohle hydriert. Nach der Hydrierung wird eingedampft, der ölige Rückstand in 50 ml Äther gelöst, die Lösung auf -15° gekühlt und mit 1,65 ml (0,0065 Mol) 4N HCl/Methanol versetzt. Nach 5 Min. bei -15° wird mit 60 ml Äther verdünnt, der Niederschlag abgenutscht, mit Äther gewaschen und aus Methanol/Äther umkristallisiert. Ausbeute 1,5 g (85%) XIV. Smp. 167°. $[\alpha]_D^{23} = +17,5^\circ$ ($c = 2$, Methanol).

$C_{10}H_{21}O_4N_2Cl$ Ber. C 44,69 H 7,87 N 10,42 Cl 13,19%
(268,7) Gef. „ 44,79 „ 7,98 „ 10,50 „ 13,24%

12. *N α -(+)-6-Methyloctanoyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -BOC-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester (I)*. 3 g (0,004 Mol) N α -(+)-6-Methyloctanoyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäurehydrazid (XI) werden in 60 ml 60-proz. Essigsäure, 2,8 ml 3N HCl und 100 ml Essigester gelöst. Nach Abfiltrieren von wenig Unlöslichem wird die Lösung auf -10° gekühlt und mit 276 mg (0,004 Mol) $NaNO_2$ in 2 ml Wasser versetzt. Nach 10 Min. Rühren bei -10° wird in einem Scheidetrichter auf Eiswasser gegossen, die Essigesterphase 3mal mit eiskalter 5-proz. $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen, mit Eiswasser nachgewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Eine mögliche Trübung kann mit wenig DMF wieder gelöst werden. In der Zwischenzeit werden 1,1 g (0,004 Mol) N γ -BOC-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester-hydrochlorid (XIV) in 5 ml DMF gelöst, in der Kälte mit 0,56 ml (0,004 Mol) Triäthylamin versetzt, 5 Min. geschüttelt, das Triäthylamin-hydrochlorid abfiltriert und mit 5 ml DMF nachgewaschen. Die beiden kalten Lösungen werden vereinigt, 1 Std. in Eis gerührt und über Nacht im Eiskasten aufbewahrt. Dann wird mit 200 ml Essigester verdünnt und unter steter Eiskühlung mit eiskalter 5-proz. Zitronensäure, eiskalter 5-proz. $NaHCO_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Die Substanz wird aus Methanol/Wasser gefällt. 3,5 g (80%) I. Smp. 168–172°. $[\alpha]_D^{25} = -18,3^\circ$ ($c = 1,1$, DMF).

$C_{47}H_{71}O_{13}N_7$ (942,1) Ber. C 59,92 H 7,59 N 10,41% Gef. C 59,99 H 7,58 N 10,68%

Schema II

1. *N α -BOC-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester (XV)*. 2,2 g (0,0047 Mol) N α -BOC-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure-*p*-nitrophenylester (V) und 1,9 g (0,0047 Mol) N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester-hydrochlorid (VII) werden zusammen in 20 ml DMF gelöst, auf 0° gekühlt und mit 0,65 ml (0,0047 Mol) Triäthylamin versetzt. Nach 3 Std. Rühren in Eis wird über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Darauf wird mit Eiswasser gefällt, der entstandene Gummi in Essigester extrahiert, diese Lösung mit eiskalter

5-proz. Zitronensäure, eiskalter 5-proz. NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Die anfallende Substanz wird aus Essigester/Äther kristallisiert. Ausbeute 3 g (90%) XV. Smp. 163–165°. $[\alpha]_D^{25} = -8,0^\circ$ ($c = 2$, DMF).

$\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{O}_{11}\text{N}_5$ (701,7) Ber. C 58,27 H 6,76 N 9,99% Gef. C 58,22 H 6,67 N 9,96%

2. *N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester-hydrochlorid* (XVI). 2,5 g (0,0035 Mol) *N α -BOC-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester* (XV) werden in 5 ml Trifluoressigsäure gelöst. Nach 10 Min. stehen bei Raumtemperatur wird die Lösung eingedampft. Der ölige Rückstand wird in 20 ml 4N HCl/Methanol gelöst, nochmals zur Trockne verdampft und der Rückstand aus Methanol/Äther kristallisiert. Ausbeute 2 g (90%). Smp. 249–250°. $[\alpha]_D^{25} = +12,1^\circ$ ($c = 1,9$, DMF).

$\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_9\text{N}_5\text{Cl}$ Ber. C 54,58 H 6,32 N 10,97 Cl 5,56%
(638,1) Gef. „ 54,51 „ 6,39 „ 11,14 „ 5,73%

3. *BOC-L-leucin-p-nitrophenylester* (XVII). 2,19 g (0,01 Mol) BOC-L-leucin [23] werden zusammen mit 1,39 g (0,01 Mol) *p*-Nitrophenol in 20 ml Essigester gelöst, auf 0° gekühlt und mit 2,1 g (0,01 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Die Mischung wird 1 Std. bei Raumtemperatur belassen, vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 3,5 g (86%). Smp. 83–84°. $[\alpha]_D^{25} = -44^\circ$ ($c = 2$, DMF).

$\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{N}_6$ (352,3) Ber. C 57,94 H 6,86 N 7,95% Gef. C 57,69 H 6,92 N 7,93%

4. *BOC-L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester* (XVIII). 1,6 g (0,0024 Mol) *N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester-hydrochlorid* (XVI) werden zusammen mit 0,9 g BOC-L-leucin-*p*-nitrophenylester (XVII) in 15 ml DMF gelöst und bei 0° mit 0,34 ml (0,0024 Mol) Triäthylamin versetzt. Die Lösung wird 1 Std. in Eis gerührt und über Nacht bei Raumtemperatur belassen. Nachher wird mit Eiswasser gefällt, abgenutscht, mit eiskalter 5-proz. NaHCO_3 -Lösung, Wasser, eiskalter 5-proz. Zitronensäure und Wasser gewaschen und getrocknet. Die Substanz wird aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 1,8 g (93%) XVIII. Smp. 223°. $[\alpha]_D^{25} = -21,8^\circ$ ($c = 2$, DMF).

$\text{C}_{40}\text{H}_{58}\text{O}_{12}\text{N}_6$ (814,9) Ber. C 58,95 H 7,17 N 10,31% Gef. C 59,30 H 7,28 N 10,41%

5. *BOC-L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threoninhydrasid* (II). 6,3 g (0,0077 Mol) BOC-L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester (XVIII) werden in 30 ml DMF gelöst, mit 4,5 ml Hydrazinhydrat versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Darauf wird mit Eiswasser gefällt, abgenutscht, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das Hydrazid wird aus Äthanol/Wasser umgefällt. Ausbeute 6 g (95%) II. Smp. 231–232°. $[\alpha]_D^{25} = -26,2^\circ$ ($c = 1,8$, DMF).

$\text{C}_{39}\text{H}_{58}\text{O}_{11}\text{N}_8$ (815,0) Ber. C 57,47 H 7,17 N 13,78% Gef. C 57,63 H 6,88 N 13,70%

Schema III

1. *N α -PHT-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure* (XIX). 50,4 g (0,2 Mol) *N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure* [19] und 30 g (0,2 Mol) Phtalsäureanhydrid werden in 500 ml Dioxan 20 Std. unter Rückfluss bei einer Ölbadtemperatur von 110° erhitzt und dann abgekühlt. Nach Filtration wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand noch 2mal mit Essigester zur Trockne verdampft. Der gelbe Sirup wird in Essigester gelöst, 6mal mit 3N HCl, 2mal mit 6N HCl und 3mal mit Wasser gewaschen, über MgSO_4 getrocknet, filtriert und eingedampft. Ausbeute 75 g (97%) leicht gelber Honig. Er wird direkt zur weiteren Synthese verwendet.

2. *D-Phenylalanin-t-butylester-hydrochlorid* (XX). 50 g (0,14 Mol) *Z-D-phenylalanin-t-butylester* [24] werden in 500 ml Methanol gelöst und über Palladiumkohle hydriert. Nach beendeter Wasserstoffaufnahme wird vom Katalysator abfiltriert und zur Trockne verdampft. Ausbeute 30 g Öl (93%). Dieses wird direkt weiterverwendet.

Charakterisierung von XX als *Hydrochlorid*. 2,2 g (0,01 Mol) *D-Phenylalanin-t-butylester* werden in 100 ml Äther gelöst, auf -20° gekühlt, mit 5 ml 2N HCl/Methanol (0,01 Mol) versetzt und das Ganze 30 Min. bei -20° aufbewahrt. Dann werden die Kristalle abgenutscht, mit Äther ge-

waschen und getrocknet. Das Hydrochlorid wird aus Methanol/Äther umkristallisiert. Ausbeute 2,3 g (90%). Smp. 208–211°. $[\alpha]_D^{25} = -41,1^\circ$ ($c = 2$, DMF).

$C_{13}H_{20}O_2NCl$ (257,7) Ber. C 60,57 H 7,82 Cl 13,76% Gef. C 60,57 H 7,61 Cl 14,09%

3. *N* α -PHT-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-*t*-butylester (XXI). 3,8 g (0,01 Mol) *N* α -PHT-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure (XIX) werden zusammen mit 2,2 g (0,01 Mol) *D*-Phenylalanin-*t*-butylester in 30 ml Acetonitril gelöst und bei -10° mit 2,1 g (0,01 Mol) DCCD versetzt. Es wird 1 Std. bei -10° gerührt und über Nacht im Eiskasten aufbewahrt. Nachher wird vom Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, zur Trockne verdampft, der Rückstand in Äther gelöst und die Lösung nacheinander mit eiskalter 5-proz. Zitronensäure, eiskalter 5-proz. NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird aus Aceton/Äther/Petroläther kristallisiert. Ausbeute 5,7 g (95%) XXI. Smp. 105–106°. $[\alpha]_D^{25} = +26,1^\circ$ ($c = 2,4$, DMF).

$C_{33}H_{35}O_7N_3$ (585,6) Ber. C 67,68 H 6,02 N 7,18% Gef. C 67,94 H 6,14 N 7,18%

4. *N* γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-*t*-butylester-hydrochlorid (III). 6,3 g (0,013 Mol) *N* α -PHT-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-*t*-butylester (XXI) werden in 50 ml Äthanol gelöst, mit 0,7 ml (0,013 Mol) Hydrazinhydrat versetzt und 1 Std. unter Rückfluss auf dem Dampfbad erhitzt. Darauf wird in Eis gekühlt, abfiltriert und zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in Äther gelöst, die Lösung filtriert und zur Trockne verdampft. Ausbeute 4,3 g Öl. Dieses wird in 100 ml Äther gelöst, auf -15° gekühlt und mit 6 ml 2*N* HCl in Methanol versetzt. Nach Zusatz von Petroläther bis zur Trübung wird bei -15° aufbewahrt, wobei Kristallisation eintritt. Es wird abgenutscht und getrocknet. Das Hydrochlorid wird aus wenig Methanol und viel Äther umkristallisiert. Ausbeute 5,5 g (83%) III. Smp. 185–188°. $[\alpha]_D^{25} = +29,4^\circ$ ($c = 2$, DMF).

$C_{25}H_{34}O_5N_3Cl$ (492,0) Ber. C 61,02 H 6,96 Cl 7,20% Gef. C 60,79 H 7,16 Cl 7,38%

Synthese des cyclischen Decapeptides 7a XXV (Fig. 4)

1. *N* α -(+)-6-Methyloctanoyl-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-*N* γ -[BOC-L-leucyl-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester (XXII). 6,6 g (0,007 Mol) *N* α -(+)-6-Methyloctanoyl-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-*N* γ -[BOC-L-leucyl-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester (I) werden mit 30 ml Trifluoressigsäure 40 Min. bei Raumtemperatur geschüttelt, wobei vollständige Lösung eintritt. Dann wird in Eis gekühlt, mit eiskaltem Äther gefällt. Der Niederschlag wird abgenutscht, mit Äther gewaschen, getrocknet, dann in Methanol gelöst und die Lösung mit 1,9 ml (0,0075 Mol) 4*N* HCl in Methanol versetzt und abgedampft. Der Rückstand wird in Methanol gelöst, die Lösung mit Äther gefällt, der Niederschlag abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet. Das Ninhydrin-positive, plattenchromatographisch reine Tetrapeptidhydrochlorid wird direkt verwendet.

2,3 g (0,0027 Mol) BOC-L-leucyl-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-hydrazid (II) werden in 40 ml DMF gelöst, auf -12° gekühlt und tropfenweise mit 10,8 ml (0,0108 Mol) 1*N* HCl versetzt. Anschließend wird die Lösung tropfenweise mit 3,2 ml (0,0032 Mol) 1*N* NaNO₂-Lösung versetzt und 5 Min. bei -12° gerührt. Nun wird das Azid langsam mit auf -12° vorgekühlter 20-proz. NaCl-Lösung ausgefällt, abgenutscht, mit eiskalter 5-proz. NaHCO₃-Lösung und Eiswasser gewaschen und scharf abgepresst. Inzwischen werden 2,4 g (0,0027 Mol) des obigen Tetrapeptidhydrochlorids in 20 ml DMF gelöst und bei 0° mit 0,38 ml (0,0027 Mol) Triäthylamin versetzt. Nach 5 Min. Rühren wird filtriert und das Azid in das Filtrat eingetragen. Die Reaktionsmischung wird bis zur vollständigen Lösung des Azids gerührt und über Nacht im Eiskasten aufbewahrt. Am andern Morgen wird das entstandene Gel mit 200 ml Äthanol verrieben, abgenutscht, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Es wird nochmals aus DMF/Äthanol umgefällt. Ausbeute 2,8 g (61%) XXII. Smp. 216–218°. $[\alpha]_D^{25} = -26,1^\circ$ ($c = 2$, DMF). $C_{81}H_{117}O_{22}N_{13}$ (1624,8) Ber. C 59,87 H 7,26 N 11,21% Gef. C 59,94 H 7,03 N 11,22%

2. *N* α -(+)-6-Methyloctanoyl-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-*N* γ -[BOC-L-leucyl-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-*N* γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- α , γ -diaminobuttersäurehydrazid (XXIII). 6 g (0,0037 Mol) Octapeptidester XXII werden in 50 ml DMF gelöst und bei Raumtemperatur mit 2 ml Hydrazinhydrat versetzt. Nach Stehen der Lösung über Nacht wird das entstandene Gel mit Wasser verrieben, abgenutscht, mit Wasser gewaschen und

getrocknet. Das Hydrazid wird aus DMF/Wasser umgefällt. Ausbeute 5 g (84%) XXIII. Smp. 238–239°. $[\alpha]_D^{25} = -18,5^\circ$ ($c = 0,8$, DMF).

$C_{80}H_{117}O_{21}N_{15}$ (1624,8) Ber. C 59,13 H 7,26 N 12,93% Gef. C 58,83 H 7,22 N 13,00%

3. N^α -(+)-6-Methyloctanoyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -[BOC-L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-t-butylester (XXIV) (Fig. 7). 0,8 g (0,49 mMol) Octapeptid-hydrazid XXIII werden in 15 ml DMF gelöst, auf -12° gekühlt, langsam mit 1,96 ml (1,96 mMol) 1N HCl und anschliessend mit 0,58 ml (0,58 mMol) 1N NaNO $_2$ -Lösung versetzt. Nach 5 Min. Rühren bei -12° wird das Azid mit auf -12° vorgekühlter 20-proz. NaCl-Lösung gefällt, abgenutscht, mit eiskalter 20-proz. NaHCO $_3$ -Lösung und Eiswasser gewaschen und scharf abgepresst. Unterdessen werden 246 mg (0,49 mMol) N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-t-butylester (III) in 5 ml DMF gelöst und bei 0° mit 0,068 ml (0,49 mMol) Triäthylamin versetzt. Nach 5 Min. Rühren wird abfiltriert und das Azid im eiskalten Filtrat gelöst. Nach vollständiger Lösung wird über Nacht im Eiskasten aufbewahrt und darauf das entstandene Gel mit 100 ml Äthanol verrieben, abgenutscht, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Das so erhaltene Produkt wird aus DMF/Wasser umgefällt. Ausbeute 0,7 g (69%) XXIV. Smp. 224° (mit 2 DMF). $[\alpha]_D^{25} = -20,3^\circ$ ($c = 1,2$, DMF).

$C_{105}H_{146}O_{26}N_{16} \cdot 2C_3H_7ON$ Ber. C 60,75 H 7,35 N 11,49%
(2194,6) Gef. „ 60,79 „ 7,21 „ 11,46%

4. *Abspaltung der Schutzgruppen in XXIV an den Kettenenden 1 und 7 und Cyclisierung.* 2 g des geschützten Decapeptides XXIV werden 15 Min. mit 4 ml Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur geschüttelt, wobei vollständige Lösung eintritt. Darauf wird in Eis gekühlt, mit eiskaltem Äther gefällt, der Niederschlag abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet. Die Substanz wird anschliessend in wenig DMF gelöst. Die Lösung wird mit etwas Pyridin alkalisch gestellt und dann mit Wasser gefällt. Der Niederschlag wird abgenutscht, mit Wasser und Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 1,9 g, die direkt zur Cyclisierung verwendet werden.

Die Lösung von 5,2 g dieses Produktes in 6,5 l wird unter kräftigem Rühren zu einer Lösung von 208 g DCCD in 26 l Dioxan getropft. Die Lösung wird $3\frac{1}{2}$ Tage bei Raumtemperatur gerührt, darauf mit 230 ml 50-proz. Essigsäure versetzt und bei 35° auf ca. 1 l konzentriert. Vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff wird abgenutscht und das Filtrat zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in 500 ml DMF gelöst, die Lösung von einer weiteren Menge Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und erneut bei 35° zur Trockne verdampft. Dieser Prozess wird noch 3mal wiederholt. Dann wird in 100 ml DMF gelöst und in 1,5 l Äther/Petroläther 2:1 ausgerührt, der Niederschlag abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute an Rohprodukt 4,2 g.

5. *Entfernung der Schutzgruppen aus dem Roh-Cyclisierungsprodukt.* 3,5 g dieses Rohproduktes werden in 800 ml flüssigem Ammoniak gelöst und mit Na bis zu einer 20 Min. bestehenden Blaufärbung reduziert. Dann werden 2,3 g Ammoniumchlorid zugegeben, das Ammoniak verdampft und letzte Spuren durch Evakuieren im Wasserstrahlvakuum entfernt. Der Rückstand wird in 100 ml Eiswasser gelöst, die Lösung bei 0° mit 6N HCl auf pH 6 gestellt, filtriert und das Filtrat lyophilisiert. Man erhält 7,4 g Rohprodukt mit einer Aktivität von 340 E/mg gegen *Brucella bronchiseptica* ATCC 4617.

6. *Reinigung des Cyclisierungsproduktes.* – a) *Gegenstromverteilung:* Das Rohprodukt (7,4 g entsprechend ca. 2,5 Millionen Einheiten) wurde einer multiplikativen Verteilung über 188 Stufen im System *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (40:10:5:45) unterworfen (Fig. 6). Die Verteilungskurve erhielten wir durch Umsetzen von je 0,2 ml unterer Phase mit FOLIN-DENIS-Reagens und Bestimmung der optischen Dichte bei 750 nm [25]. Die vereinigten Gläscheninhalte 115–134 wurden im Hochvakuum bei 20° konzentriert und anschliessend lyophilisiert. Nach 2maligem Lyophilisieren erhält man 300 mg farbloses, lockeres Pulver mit einer Aktivität von 2450 E/mg gegen *Brucella bronchiseptica* ATCC 4617.

b) *Umfällen über die freie Base:* Die lyophilisierte Verteilungs-Hauptfraktion wurde in ca. 5 ml Wasser gelöst und unter Eis-Kochsalzkühlung 15–20 Min. NH $_3$ eingeleitet. Anschliessend wurde die Fällung abzentrifugiert, 3mal mit 5-proz. eiskaltem Ammoniak gewaschen, in Wasser suspendiert und 2mal lyophilisiert. Darauf wurde die Base in der berechneten Menge 0,1N HCl gelöst und die ganze Operation des Umfällens über die freie Base noch 2mal wiederholt. Nach der

3. Fällung verbleiben ca. 70 mg farblose Base mit einer Aktivität *in vitro* von 5520 E/mg gegen *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10131.

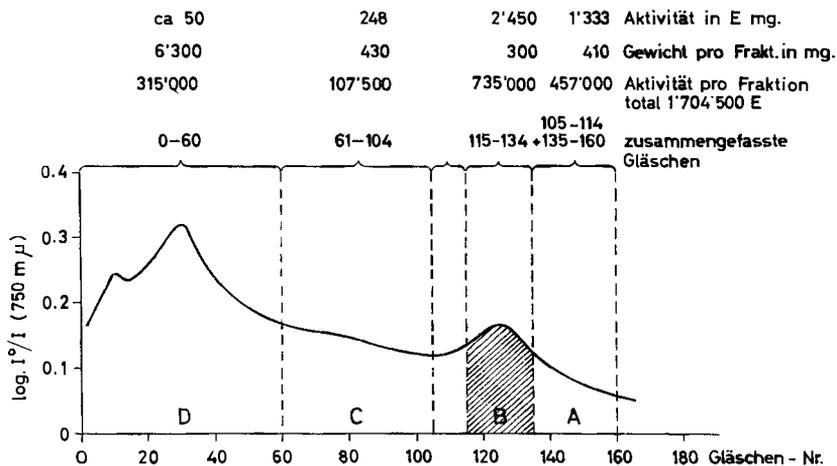


Fig. 6. Gegenstromverteilung des Cyclisierungs-Rohproduktes im System *n*-Butanol|Pyridin|Eisessig|Wasser (40:10:5:45)

c) *Kristallisation als Orthophosphat*: Eine Lösung von 56 mg Base in 0,75 ml H_3PO_4 -Lösung (2,2 g 85-proz. H_3PO_4 mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt) wurde in der Siedehitze bis zur beginnenden Trübung tropfenweise mit abs. Äthanol versetzt, dann wurde langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Darauf wurde das Kristallisat abgenutscht, mit kaltem abs. Alkohol gewaschen und bei Raumtemperatur im Vakuumexsikkator über konz. H_2SO_4 getrocknet. Ausbeute 54 mg. Zum Umkristallisieren wurde es in 2 ml abs. Alkohol suspendiert und unter Erhitzen auf dem Dampfbad durch tropfenweisen Zusatz von heissem Wasser in Lösung gebracht. Die Lösung wurde filtriert, das Filtrat in der Siedehitze bis zur bleibenden Trübung mit abs. Alkohol versetzt, die Trübung mit 1–2 Tropfen der verdünnten H_3PO_4 -Lösung eben zum Verschwinden gebracht und die Lösung langsam abgekühlt und darauf über Nacht im Eiskasten aufbewahrt. Nach Abnutschen, Waschen mit eiskaltem Alkohol und Trocknen bei Raumtemperatur im Vakuumexsikkator über konz. H_2SO_4 verblieben 45 mg farblose, feine Nadeln, deren analytische Charakterisierung in Tabelle 1 zusammengefasst ist.

7. *Abbauversuche mit Nagarse*. Ansätze: Je 2 mg natürliches B_1 -Pentaphosphat und synthetisches 7α -(all-L-Dab)-pentaphosphat und Cycloheptapeptid 7α (1'-D-Dab) wurden in je 0,75 ml Ammoniumacetat/ $NaHCO_3$ -Puffer, pH 8,0 (0,05M), gelöst und je mit 0,25 ml Enzymlösung, enthaltend 0,08 mg Nagarse (Enzym-Substrat-Gewichtsverhältnis 1:25) versetzt. Während der Inkubation bei 37° wurden nach 3, 6 und 24 Std. aliquote Proben von je 0,20 ml entnommen, mit 1 Tropfen Ameisensäure versetzt, im Vakuumexsikkator über KOH eingedampft, in 0,2 ml Wasser wieder gelöst und von dieser Lösung zur Dünnschichtchromatographie je 2 μ l aufgetragen. Laufmittel: *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24; Anfärbung: Ninhydrin-Reagens.

Ergebnisse: Das natürliche B_1 und das synthetische 7α (all-L-Dab) B_1 verhalten sich untereinander, sowohl im qualitativen wie im quantitativen Ablauf der Spaltung, vollständig gleich, während das cyclische Decapeptid 7α (1'-D-Dab) ein anderes Abbaubild ergibt.

8. *Herstellung der Nickelkomplexe und Rotationsdispersionsmessung*. Die Nickelkomplexe wurden durch Zusammengeben von äquimolaren Mengen Peptid und Nickelsulfat sowie Einstellen des pH mit 0,1N NaOH auf pH 9,4 hergestellt. Die Peptidkonzentration (Pentahydrochlorid) in der Endlösung betrug etwa 0,1%.

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

SUMMARY

The synthesis of the cycloheptapeptide 7 α (Fig. 4) containing the α, γ -diaminobutyric acid residues only in the L form, and its crystallization as pentaphosphate are reported. This latter substance proved to be in all respects identical with the crystalline penta-phosphate of natural polymyxine B₁.

Chemische 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] W. HAUSMANN & L. C. CRAIG, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 4892 (1954).
- [3] W. HAUSMANN, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 3663 (1956).
- [4] K. VOGLER, R. O. STUDER, W. LERGIER & P. LANZ, *Helv.* **43**, 1751 (1960).
- [5] R. O. STUDER, K. VOGLER & W. LERGIER, *Helv.* **44**, 131 (1961).
- [6] R. O. STUDER, W. LERGIER & K. VOGLER, *Helv.* **46**, 612 (1963).
- [7] K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER, E. BÖHNI & B. FUST, *Helv.* **46**, 2823 (1963).
- [8] H. BRINTZINGER, *Helv.* **44**, 744 (1961).
- [9] Japanisches Pat. Nr. 5264 vom 7. 5. 1963.
- [10] J. P. GREENSTEIN, S. M. BIRNBAUM & M. C. OTEY, *J. biol. Chemistry* **204**, 307 (1953).
- [11] T. SUZUKI, K. HAYASHI, K. FUJIKAWA & K. TSUKAMOTO, *J. Biochem.* **54**, 555 (1963).
- [12] G. BIZERTE & M. DAUTREVAUX, *Bull. Soc. Chim. biol.* **39**, 795 (1957).
- [13] T. SUZUKI, K. HAYASHI, K. FUJIKAWA & K. TSUKAMOTO, *J. Biochem.* **56**, 335 (1964).
- [14] S. WILKINSON & L. A. LOWE, *Nature* **202**, 1211 (1964).
- [15] R. O. STUDER & K. VOGLER, *Helv.* **45**, 819 (1962).
- [16] Schweizer Patentanmeldung A 6442/60 vom 24. 8. 1959.
- [17] M. BODANSZKY & V. DU VIGNEAUD, *Nature, London* **183**, 1324 (1959).
- [18] R. SCHWYZER, «CIBA Foundation Symposium on Amino Acids and Peptides with Antimetabolic Activity», Churchill, London 1958, p. 171; G. M. J. SCHMIDT, D. CROWFOOT HODGKIN & B. M. OUGHTON, *Biochem. J.* **65**, 744 (1957); D. T. WARNER, *Nature* **190**, 120 (1961).
- [19] K. VOGLER & P. LANZ, *Helv.* **43**, 270 (1960).
- [20] R. SCHWYZER, P. SIEBER & H. KAPPELER, *Helv.* **42**, 2622 (1959); W. KLEE & M. BRENNER, *Helv.* **44**, 2151 (1961).
- [21] L. CROMBIE & ST. H. HARPER, *J. chem. Soc.* **1950**, 2685; K. VOGLER & L. H. CHOPARD-DIT-JEAN, *Helv.* **43**, 279 (1960).
- [22] H. A. STAAB, *Angew. Chem.* **68**, 754 (1956); G. W. ANDERSON & R. PAUL, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 4423 (1958).
- [23] F. C. MCKAY & N. F. ALBERTSON, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 4686 (1957); G. W. ANDERSON & A. C. MCGREGOR, *ibid.* **79**, 6180 (1957).
- [24] G. W. ANDERSON & F. M. CALLAHAN, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 3359 (1960).
- [25] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & ROSE J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* **193**, 265 (1951).