

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] W. G. KUMP & H. SCHMID, *Helv.* **44**, 1503 (1961).  
 [2] T. R. GOVINDACHARI, B. R. PAI, S. RAJAPPA, N. VISWANATHAN, W. G. KUMP, K. NAGARAJAN & H. SCHMID, *Helv.* **45**, 1146 (1962).  
 [3] C. DJERASSI, H. BUDZIKIEWICZ, R. J. OWELLEN, J. M. WILSON, W. G. KUMP, D. J. LE COUNT, A. R. BATTERSBY & H. SCHMID, *Helv.* **46**, 742 (1963).  
 [4] M. HESSE, W. VETTER & H. SCHMID, *Helv.* **48**, 674 (1965).  
 [5] CH. KUMP, Dissertation, Universität Zürich 1964.  
 [6] H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSI & D. H. WILLIAMS, Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry, Volumen I: Alkaloids, Holden-Day, Inc., San Francisco 1964.  
 [7] O. ŠTROUF & J. TROJÁNEK, *Coll. czechoslov. chem. Commun.* **29**, 447 (1964).  
 [8] P. CERUTTI & H. SCHMID, *Helv.* **47**, 203 (1964).  
 [9] M. F. BARTLETT & W. I. TAYLOR, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 5941 (1960).  
 [10] M. HESSE, W. V. PHILIPSBORN, D. SCHUMANN, G. SPITELLER, M. SPITELLER-FRIEDMANN, W. I. TAYLOR, H. SCHMID & P. KARRER, *Helv.* **47**, 878 (1964).  
 [11] J. H. BEYNON & A. E. WILLIAMS, Mass and Abundance Tables for Use in Mass Spectrometry, Elsevier, Amsterdam 1963.

## 111. Synthesen in der Polymyxinreihe

11. Mitteilung<sup>1)</sup>

## Die Synthese von Circulin A

von R. O. Studer, W. Lergier und K. Vogler

(13. I. 66)

**1. Einleitung.** – Im Jahre 1948 berichteten MURRAY & TETRAULT [2] über die Isolierung eines Antibioticums, das gegen GRAM-negative Mikroorganismen eine stärkere Hemmwirkung zeigte als gegen GRAM-positive. Etwas später konnten sie den für die Bildung dieses Wirkstoffes verantwortlichen Mikroorganismus als einen nicht hämolytischen Stamm von *Bacillus circulans* identifizieren [3], und sie gaben deshalb dem Antibioticum den Namen Circulin. Im gleichen Jahre isolierte McLEOD [4] eine antimikrobiell wirksame Verbindung aus Kulturen von *Bacillus krzemieniewski*, einer mukoiden Variante von *B. circulans*, ebenfalls unter dem Namen Circulin. Da es sich sehr bald herausstellte, dass dieses aktive Prinzip von demjenigen von MURRAY & TETRAULT [2] verschieden war, wurde dieser Name im gegenseitigen Einverständnis der beiden Gruppen in Polypeptin umgeändert und der Name Circulin für das Antibioticum von MURRAY & TETRAULT reserviert [5].

Circulin, das chemisch und biologisch stark an die ein Jahr früher beschriebenen Antibiotica vom Typus der Polymyxine erinnerte, konnte schon sehr bald durch Chromatographie in fünf biologisch aktive Komponenten aufgespalten werden, wobei die Hauptanteile als Circulin A und Circulin B bezeichnet wurden [6] [7].

Schon 1949 charakterisierten PETERSON & REINEKE [6] Circulin in Form seines Sulfates als Polypeptid. Nach saurer Totalhydrolyse identifizierten sie die Amino-

<sup>1)</sup> 10. Mitteilung s. [1]. – *Abkürzungen*: Z = Benzyloxycarbonyl, BOC = *t*-Butyloxycarbonyl, But<sup>t</sup> = *t*-Butylester, MOA = (+)-6-Methyloctansäure, DMF = Dimethylformamid, DNP = Dinitrophenyl.

säuren D-Leucin, L-Threonin und  $\alpha,\gamma$ -Diaminobuttersäure sowie eine optisch aktive Fettsäure, ein Isomeres der Pelargonsäure [6]. DOWLING und Mitarbeiter [7] zeigten etwas später, dass Circulin A zusätzlich noch L-Isoleucin enthielt. Sechs Jahre später fanden KOFFLER und Mitarbeiter [8], dass sowohl Circulin A als auch Circulin B die Komponenten L- $\alpha,\gamma$ -Diaminobuttersäure, L-Threonin, D-Leucin, L-Isoleucin und (+)-6-Methyloctansäure im Molverhältnis 6:2:1:1:1 enthalten. Auf Grund von Fragmenten, die nach saurer Partialhydrolyse von Circulin A und B isoliert wurden, formulierte KOFFLER beide Verbindungen als Cyclodecapeptide ohne Peptid-Seitenketten (Fig. 1) [9].

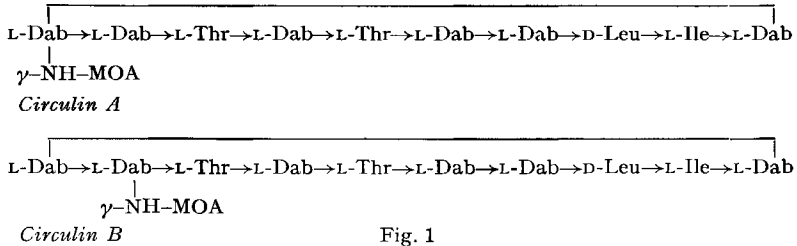


Fig. 1

Angesichts der grossen Ähnlichkeit dieser Wirkstoffe in den Bausteinen und im antibakteriellen Wirkungsspektrum mit den Polymyxinen wirkten diese Struktur-

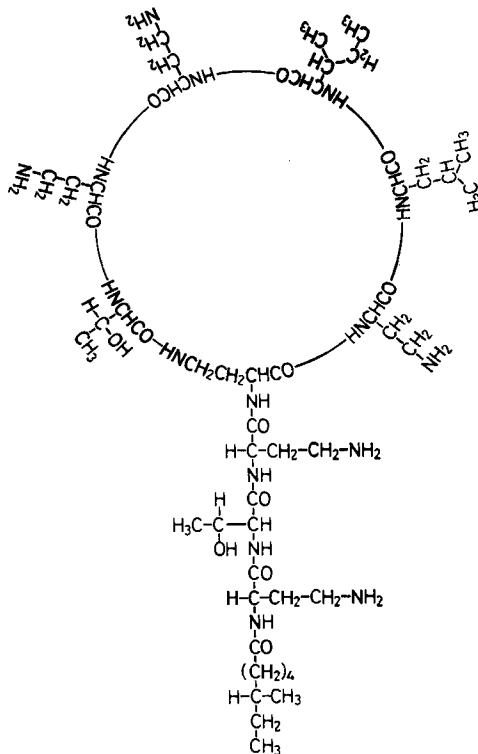


Fig. 2. Struktur des verzweigten Cycloheptapeptides XIII = Circulin A

vorschläge fremdartig. SUZUKI und Mitarbeiter führten daher kürzlich an reinem Circulin A eine Reihe von Abbauprüfungen durch, die sie schon erfolgreich zur Strukturaufklärung von Polymyxin B<sub>1</sub> [10], E<sub>1</sub> (Colistin A) [11] [12] und E<sub>2</sub> (Colistin B) [13] benutzt hatten. Durch Kombination der Peptidfragmente, die sie durch saure Partialhydrolyse einerseits sowie durch enzymatischen Abbau mit Nagarse andererseits und nachfolgender Sequenzanalyse erhalten hatten, formulierten sie für Circulin A eine Struktur, welche seine enge Verwandtschaft mit den Polymyxinen aufzeigt (Fig. 2) [14].

Parallel zu diesen Versuchen von SUZUKI *et al.* konnten wir selbst mittels der Rotationsdispersionskurven des Ni-Komplexes von Circulin A und Polymyxin E<sub>1</sub> (Colistin A) schlagartig zeigen, dass ersteres zu den Polymyxinen gehört<sup>2)</sup>. Danach unterscheidet sich Circulin A von Polymyxin E<sub>1</sub> (Colistin A) nur durch den Austausch von L-Leucin durch L-Isoleucin, und von Polymyxin B<sub>1</sub> durch den Ersatz von L-Leucin und D-Phenylalanin durch L-Isoleucin bzw. D-Leucin.

Im Rahmen unserer Arbeiten in der Reihe der Polymyxine ist es nun gelungen, diese Struktur von Circulin A synthetisch zu bestätigen. Die Synthese erfolgte in Anlehnung an diejenige von Polymyxin B<sub>1</sub> [15] und Polymyxin E<sub>1</sub> (Colistin A) [1] über ein geschütztes verzweigtes Decapeptid, das in 1-Stellung einen L-Isoleucinrest an Stelle des im Polymyxin E<sub>1</sub> enthaltenen L-Leucinrestes besitzt (Fig. 3).

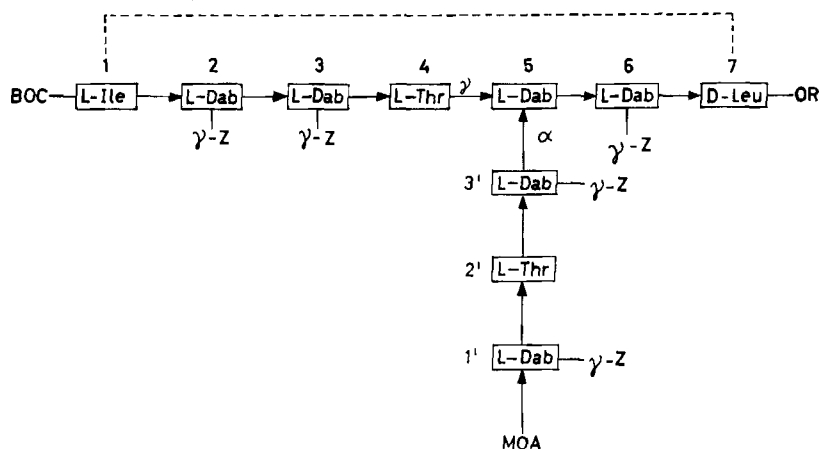


Fig. 3. Struktur des geschützten Decapeptides

**2. Synthese.** – Es konnten verschiedene, schon bei den Synthesen von Polymyxin B<sub>1</sub> und E<sub>1</sub> hergestellte Peptid-Zwischenprodukte verwendet werden (Fig. 4). Insbesondere das allen drei Cyclopeptiden gemeinsame Bruchstück I (1'–2'–3'–5) (Fig. 4) konnte unverändert übernommen werden. Im Tetrapeptid-hydrazid II (1–2–3–4) (Fig. 4) musste gegenüber Polymyxin B<sub>1</sub> und E<sub>1</sub> L-Leucin durch L-Isoleucin ersetzt werden. Dazu wurde das bereits beschriebene Tripeptid N<sup>γ</sup>-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-N<sup>γ</sup>-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-L-threonin-methylester [1] [15] mit BOC-L-Isoleucin-N-

<sup>2)</sup> Für die freundliche Überlassung eines Präparates von Circulin-A-sulfat sowie für die Informationen vorgängig der Publikation danken wir Herrn Prof. T. SUZUKI, Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka (Japan).

hydroxy-succinimidester [16] zum Tetrapeptid verlängert und anschliessend mit Hydrazinhydrat ins Hydrazid übergeführt. Das Bruchstück III ( $R = OCH_3$ ) wurde durch Umsetzung von  $N^\alpha$ -BOC- $N^\gamma$ -Z-L- $\alpha,\gamma$ -diaminobuttersäure-*p*-nitrophenylester [15] mit D-Leucin-methylester und nachfolgende Behandlung mit Trifluoressigsäure erhalten.

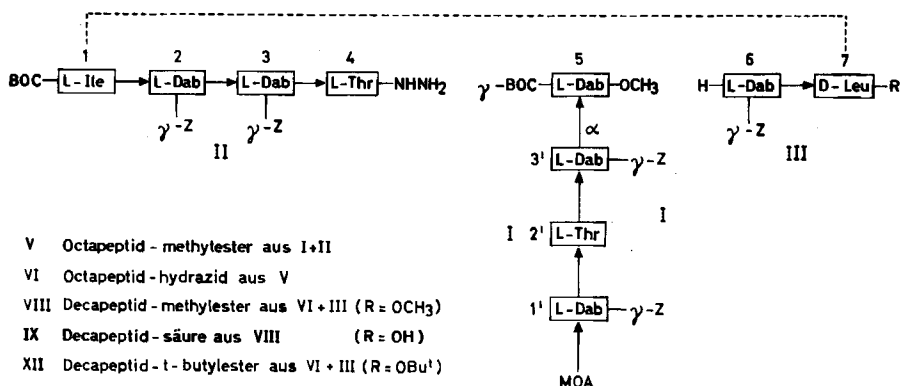


Fig. 4. Aufbauschema des geschützten Decapeptids

Die  $\gamma$ -BOC-Gruppe im Tetrapeptid I (1'-2'-3'-5) (Fig. 4) wurde mit Trifluoressigsäure abgespalten und das erhaltene Produkt mit dem Azid von II (1-2-3-4) (Fig. 4) zum geschützten Octapeptid-methylester V umgesetzt. Dieser wurde anschliessend mit Hydrazinhydrat ins entsprechende Hydrazid VI übergeführt und nach dem Azidverfahren mit III ( $R = OCH_3$ ) zum vollständig geschützten Decapeptid-methylester VIII verlängert. Durch alkalische Verseifung gelangt man zur entsprechenden Decapeptidsäure IX. Verschiedene Versuche, diese durch Umsetzung mit Di-*p*-nitrophenylsulfid [17] in den entsprechenden *p*-Nitrophenylester überzuführen, resultierten nur in einer ca. 20-proz. Ausbeute an aktiviertem Ester. Deshalb wurde die *t*-Butyloxy-carbonylgruppe in 1-Stellung von IX mit Trifluoressigsäure entfernt und das erhaltene Produkt mit überschüssigem Dicyclohexyl-carbodiimid in hoher Verdünnung in Dimethylformamid/Dioxan cyclisiert.

Zusätzlich wurde durch Umsetzung des Octapeptid-hydrazids VI mit dem bereits beschriebenen Dipeptid  $N^\gamma$ -Z-L- $\alpha,\gamma$ -diaminobutyryl-D-Leucin-*t*-butylester III ( $R = OBU^t$ ) [1] der Decapeptid-*t*-butylester XII hergestellt. Nach Abspaltung der beiden Schutzgruppen an den Kettenenden mit Trifluoressigsäure konnte auch dieses Produkt in bereits beschriebener Weise cyclisiert werden.

Aus dem Cyclisierungsprodukt wurden die übrigen Schutzgruppen durch Natrium in flüssigem Ammoniak entfernt und das so erhaltene Rohprodukt anschliessend durch 3malige Gegenstromverteilung gereinigt. Nach 2maligem Fällen über die freie Base in konz.  $NH_3$  bei  $0^\circ$  konnte das cyclische Decapeptid analog den Polymyxinen  $B_1$  und  $E_1$  als Pentaphosphat kristallisiert werden. Die Ausbeute war jedoch deutlich geringer als bei den analogen Synthesen von Polymyxin  $B_1$  und  $E_1$ , was mit der grösseren sterischen Hinderung des Isoleucinrestes zusammenhängen mag.

**3. Vergleich des Endproduktes mit natürlichem Circulin A.** – Die physikalisch-chemischen Daten des kristallinen Phosphates des Cycloheptapeptides XIII sind in

Tabelle 1 zusammengestellt und mit denjenigen des Phosphates von natürlichem Circulin A verglichen<sup>2)</sup>. Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse belegt die Identität der entsprechenden Produkte.

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

2. Die Herstellung der Kieselgel-Platten und die Arbeitstechnik entsprechen den Originalangaben von STAHL [18]. Als Laufmittel diente das gleiche Gemisch wie bei der Papierchromatographie. Die Laufzeit betrug 2–3 Std.; aufgetragen wurden ca. 5 µg in 1 µl.

3. Wir benutzten den Hochspannungs-Pherographen nach WIELAND & PFLEIDERER [19] der Firma L. HORMUTH, Heidelberg. Arbeitsbedingungen: Papier: SCHLEICHER & SCHÜLL 2043 b mgl, gewaschen; Elektrolyt: 2N Essigsäure (pH ca. 2,5); Feldstärke: 65 V · cm<sup>-1</sup>; Versuchsdauer: 45 Min.; Kammertemperatur: +1° bis +3°. Die Wanderstrecke wird im Verhältnis zu derjenigen des Histidins, das gleichzeitig mitlief, angegeben.

Tabelle 1

*Analytische Charakterisierung der Phosphate von natürlichem und synthetischem Circulin A*

Charakterisierung	synthetisch	natürlich
1. Papierchromatographie (SS 2043 b, gewaschen, <i>n</i> -Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24)	einheitlich Rf ~ 0,7	einheitlich Rf ~ 0,7
2. Dünnschichtchromatographie, Kieselgel G (Laufmittel wie bei 1.)	einheitlich (Spur Schwanz) Rf 0,68	einheitlich  Rf 0,68
3. Hochspannungs-Papierelktrophorese (SS 2043 b, pH 2,5; 65 V · cm <sup>-1</sup> ; His = 1,0)	einheitlich; 1,0 His	einheitlich; 1,0 His
4. $[\alpha]_D^{25}$ , Wasser (Beide Proben 3 Std. bei 56° im Hochvakuum, P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , getrocknet)	-57,6° ( <i>c</i> = 0,346%)	-55,0 ( <i>c</i> = 0,477%)
5. Freie Aminogruppen nach Ninhydrin-Bestimmung	5,1 <sub>4</sub> ± 10%	5,0 ± 10%
6. Totalhydrolyse, Aminosäureverhältnisse (± 10%) ber.: Dab 6,0 Thr 2,0 Leu 1,0 Ileu 1,0 (DC Trennung Leu/Ileu: s. unter Erläuterungen)	gef.: Dab 6,0 Thr 2,0 Leu + Ileu (nicht getrennt) 1,9	
7. Dinitrophenylierung und Hydrolyse des DNP-Peptides	kein DNP-Leu	
8. Enzymatischer Abbau mit Nagarse [12]	identisch mit Naturprodukt	identisch mit Synthese-Präparat

4. Die Drehungsmessungen wurden in einem photoelektrischen Polarimeter mit Thermostat, das in unserer physikochemischen Abteilung durch Dr. F. BURKHARDT entwickelt worden war, aufgenommen. Die Werte sind nicht auf wasserfreie Substanz umgerechnet, da infolge der geringen Materialmenge keine Wasserbestimmungen durchgeführt wurden. Beide Präparate wurden vor der Messung unter identischen Bedingungen getrocknet.

5. Zur Ermittlung der Anzahl freier Aminogruppen wurde das für Aminosäure-Bestimmungen viel gebrauchte Ninhydrin-Hydrindantin-Reagens pH 4,7 (s. z. B. BOISSONNAS [20]) verwendet; als Vergleichssubstanz wurde natürliches Circulin A mitbestimmt.

6. 1 mg Peptid wurde in 0,5 ml 6N HCl 24 Std. bei 110° hydrolysiert und nach Entfernung der Salzsäure im Vakuum über KOH der Rückstand in 0,1 ml Wasser gelöst. 5  $\mu$ l dieser Hydrolysatlösung wurden strichförmig auf ein Chromatographiepapier SCHLEICHER & SCHÜLL 2043b, gewaschen, aufgetragen; auf dem gleichen Streifen liefen ca. äquimolare Mengen einer Vergleichslösung, enthaltend Dab/Thr/Leu/Ileu im Molverhältnis 6:2:1:1 mit. Chromatographiert wurde über Nacht im Laufmittel *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1. Die Auswertung erfolgte photometrisch, nach Entwickeln mit Ninhydrin-Kupfer-Reagens [21] und Eluieren mit abs. Methanol. Leu und Ileu werden nicht getrennt und als Summe bestimmt. Die Trennung von Leu/Ileu wurde dünn-schichtchromatographisch mittels der Durchlauftechnik (BN-Kammer [22]) auf Kieselgel G im System Methyläthylketon/Pyridin/Wasser/Eisessig 70:15:15:2 durchgeführt.

7. Ca. 1  $\mu$ Mol synth. Circulin-A-pentaphosphat wurde nach SANGER [23] mit Dinitrofluorbenzol in wässriger 1-proz. Triäthylaminlösung, unter Zusatz des gleichen Volumens Äthanol, dinitrophenyliert und das DNP-Peptid in 0,5 ml 6N HCl 14 Std. bei 110° hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde nach Verdünnen mit Wasser je 2mal mit Äther und *sek.*-Butanol extrahiert und die Extrakte sowie die wässrige saure Restlösung dünn-schichtchromatographisch neben authentischen Reinpräparaten von DNP-Leu und  $\gamma$ -DNP-Dab untersucht. Als Laufmittel dienten die Systeme: a) Chloroform/Benzylalkohol/Eisessig 70:30:3 und b) *n*-Propanol/25-proz. Ammoniaklösung 70:30 [22]. Im Ätherextrakt konnten keine DNP-Aminosäuren nachgewiesen werden, im *sek.*-Butanolextrakt nur  $\gamma$ -DNP-Dab. (DNP-Leu wäre als säure- und wasserunlösliche DNP-Aminosäure mit Äther extrahierbar, während die säurelösliche  $\gamma$ -DNP-Dab zu den mit *sek.*-Butanol extrahierbaren DNP-Derivaten gehört.)

8. Abbau mit Nagarse: Je 1 mg natürliches und synthetisches Circulin-A-pentaphosphat wurden in 0,3 ml pH-8-Puffer (0,05M Ammoniumacetat + 0,05M NaHCO<sub>3</sub>) gelöst, je 0,1 ml als «Leerwert» entnommen und die restlichen 0,2 ml mit 0,1 ml Enzymlösung, enthaltend 40  $\mu$ g Nagarse [12] versetzt. Nach 1, 3, 6 und 24 Std. Inkubation bei 25° wurden Probchen von je 1  $\mu$ l

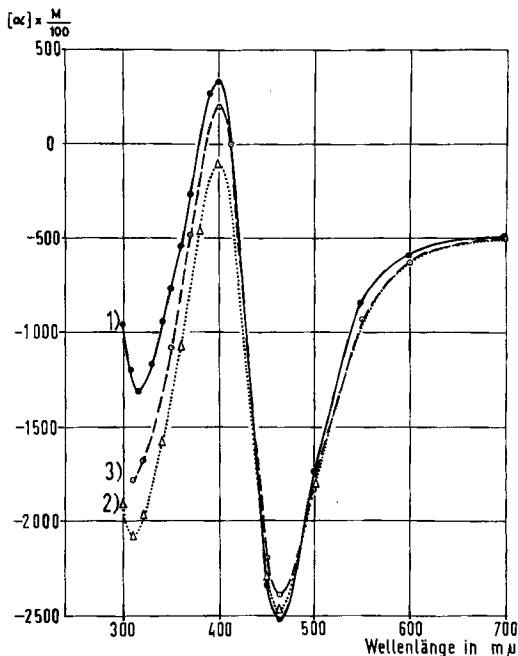


Fig. 5. Rotationsdispersionskurven der Nickelkomplexe von natürlichem und synthetischem Circulin A sowie von Polymyxin E<sub>1</sub> (Colistin A)

1. Circulin nat. 2. Circulin A synth. 3. Colistin A nat.

dünnschichtchromatographisch im System *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24 miteinander verglichen. Man erhält identische Chromatogramme.

Der enzymatische Abbau mit Nagarse [14] führte bei synthetischem und natürlichem Circulin A zu plattenschichtchromatographisch identischen Bruchstücken.

*Herstellung der Nickelkomplexe und Rotationsdispersions-Messung:* Durchführung vgl. [1]. Auch die Rotationsdispersionskurven der Nickelkomplexe, die bei der Identifizierung von Polymyxin B<sub>1</sub> [15] [24] und Polymyxin E<sub>1</sub> [1] besonders wichtig waren, zeigten eine gute Übereinstimmung (Fig. 5).

Die antibakterielle Aktivität des Cycloheptaepitides XIII wurde gegen verschiedene Erreger *in vitro* sorgfältig mit derjenigen von natürlichem Circulin A nach der schon früher beschriebenen Methodik verglichen [24] (Tabelle 2). Als Standard wurde Circulin-sulfat (UPJOHN, U-4444, Lot 5837CPC-44) mit einer Aktivität von 900 mcg/mg verwendet. Gegen alle Mikroorganismen erweist sich das synthetische Produkt innerhalb der Fehlergrenzen als gleich aktiv wie natürliches Circulin A, was nach unserer Erfahrung als besonders empfindlicher Identitätsbeweis anzusehen ist.

Tabelle 2. Antibakterielle Aktivität der Pentaphosphate von synthetischem und natürlichem Circulin A *in vitro* (Standardabweichung  $\pm 20\%$ )

Standard = UPJOHN, U-4444, Lot 5837CPC-44<sup>3)</sup>

Mikroorganismus	synthetisch, mcg/mg	natürlich, mcg/mg
<i>Brucella bronchiseptica</i> ATCC 4617	920	860
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	936	886
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	1069	1079
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10131	1048	1042

**4. Diskussion.** – Auf Grund aller vorliegenden Daten besitzt Circulin A die von SUZUKI *et al.* [14] vorgeschlagene Struktur eines Cycloheptaepitides mit einer  $\alpha$ -verknüpften Seitenkette und nicht die früher von KOFFLER [9] abgeleitete Struktur eines Cyclodecapeptides. Circulin A ist damit eindeutig ein Analogon der Polymyxine B<sub>1</sub> und E<sub>1</sub>. Es ist interessant, dass sich alle drei Verbindungen nur durch eine Variation in der gleichen Dipeptidsequenz des 7gliedrigen Ringes unterscheiden. Die im Polymyxin B<sub>1</sub> vorhandene Dipeptidsequenz D-Phe-L-Leu ist in Polymyxin E<sub>1</sub> (Colistin A) durch D-Leu-L-Leu und in Circulin A durch D-Leu-L-Ile ersetzt.

Diese enge Verwandtschaft geht auch eindeutig aus den Rotationsdispersionskurven der Ni-Komplexe hervor. Die drei Antibiotica stimmen in bezug auf die Lage der Maxima und Minima der COTTON-Kurven völlig überein, differieren jedoch etwas in den Amplituden, was auf Grund der Variation der Aminosäuren möglich ist, jedoch z. T. auch auf der Instabilität der Ni-Komplexe beruhen mag [24]. Alle unterscheiden sich deutlich von den früher beschriebenen Analogon von Polymyxin B<sub>1</sub>, die in der Seitenkette eine zur Fettsäure benachbarte D- $\alpha,\gamma$ -Diaminobuttersäure enthielten [15].

Verbindungen, die den von KOFFLER vorgeschlagenen Strukturen entsprechen, sind anderseits beschrieben worden. So berichtete RUDINGER [25] über die Synthese eines geschützten cyclischen Decapeptides (Fig. 1) mit der damals vermuteten Struktur des Circulins A, das an Stelle der (+)-6-Methyloctansäure die *n*-Pelargon-

<sup>3)</sup> Die Bestimmungen der mikrobiologischen Aktivität wurden in unserer mikrobiologischen Abteilung unter der Leitung von Prof. B. FÜST und Dr. ERIKA BÖHNI durchgeführt.

säure enthielt. AROLD [26] hingegen beschrieb eine Synthese des entsprechenden Cyclodecapeptides von Circulin B mit racemischer 6-Methyloctansäure. Über die Eigenschaften beider Cyclodecapeptide und über ihren Vergleich mit natürlichem Circulin A bzw. B ist leider noch nicht berichtet worden.

Die Problematik der Synthese von Cyclopeptiden mit der Struktur der Polymyxine liegt, abgesehen von den Schutzgruppen, hauptsächlich in der Cyclisierung. Der schon bei einfachen Peptiden mit relativ kleinen Ausbeuten verlaufende Ringschluss wird hier bei diesen verzweigten Decapeptiden durch die Anwesenheit der  $\gamma$ -NH<sub>2</sub>-Schutzgruppen und der Seitenketten offenbar erschwert. Ein erster Versuch, die Cyclisierungsmethode zu ändern und an Stelle von Dicyclohexyl-carbodiimid aktivierte Ester zu verwenden, scheiterte an der geringen Ausbeute bei der Aktivierung der endständigen Carboxylgruppe. Der Ringschluss eines entsprechenden linearen Decapeptids, das lauter  $\alpha$ -Peptidbindungen enthielt [27], konnte leider ebenfalls noch nicht realisiert werden. Als eine weitere Möglichkeit soll zu gegebener Zeit der Ringschluss eines Cycloheptapeptides unter nachfolgender Einführung der Seitenkette versucht werden.

#### Experimenteller Teil<sup>4)</sup>

1. *BOC-L-Isoleucyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester (IV)*. 1,6 g (0,005 Mol) BOC-L-Isoleucin-N-hydroxy-succinimidester [16] und 3,2 g (0,005 Mol) N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester-hydrochlorid [15] werden zusammen in 25 ml DMF gelöst und mit 0,7 ml (0,005 Mol) Triäthylamin versetzt. Nach 2 Std. Rühren wird mit Wasser gefällt, der Niederschlag abgenutscht, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Substanz wird aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 3,2 g (80%). Smp. 202–204°.  $[\alpha]_D^{25} = -25,7^\circ$  ( $c = 1,8$ , DMF).

C<sub>40</sub>H<sub>58</sub>O<sub>12</sub>N<sub>6</sub> (814,9) Ber. C 58,95 H 7,17 N 10,31% Gef. C 58,79 H 6,96 N 10,03%

2. *BOC-L-Isoleucyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonin-hydrazid (II)*. 18,1 g (0,022 Mol) geschützter Tetrapeptid-methylester IV werden in 150 ml DMF gelöst, mit 6,6 ml Hydrazinhydrat versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das entstandene Gel wird mit Eiswasser verrieben, abgenutscht, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das Hydrazid wird aus DMF/Wasser umgefällt. Ausbeute 17 g (94%). Smp. 215–216°.  $[\alpha]_D^{25} = -28,0^\circ$  ( $c = 1,3$ , DMF).

C<sub>39</sub>H<sub>58</sub>O<sub>11</sub>N<sub>8</sub> (815,0) Ber. C 57,47 H 7,17 N 13,78% Gef. C 57,26 H 7,36 N 13,50%

3. *N $\alpha$ -(+)-6-Methyloctanoyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-N $\gamma$ -[BOC-L-isoleucyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobuttersäure-methylester (V)*. 2,3 g (0,0027 Mol) geschütztes Tetrapeptid-hydrazid II werden in 40 ml DMF gelöst, auf  $-12^\circ$  gekühlt und tropfenweise mit 10,8 ml (0,0108 Mol) 1N HCl versetzt. Anschliessend wird die Lösung tropfenweise mit 3,2 ml (0,0032 Mol) 1N NaNO<sub>2</sub>-Lösung versetzt und 5 Min. bei  $-12^\circ$  gerührt. Nun wird das Azid langsam mit auf  $-12^\circ$  vorgekühlter 20-proz. NaCl-Lösung ausgefällt, abgenutscht, mit eiskalter 5-proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und Eiswasser gewaschen und scharf abgepresst. Inzwischen werden 2,4 g (0,0027 Mol) N $\alpha$ -(+)-6-Methyloctanoyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobuttersäure-methylester-hydrochlorid [15] 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 eiskalte 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/

<sup>4)</sup> Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Die Analysenmuster wurden 16 Std. über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> bei 0,01 Torr und 100° getrocknet. Für die sorgfältige Mitarbeit danken wir den Herren K. SCHWEIZER und W. BERNASCONI.



Äthanol und DMF/Wasser umgefällt. Ausbeute 2,9 g (62%). Smp. 219–221°.  $[\alpha]_D^{24} = -24,9^\circ$  ( $c = 1$ , DMF).

$C_{81}H_{117}O_{22}N_{13}$  (1624,8) Ber. C 59,87 H 7,26 N 11,21% Gef. C 59,85 H 7,30 N 11,42%

4.  $N^\alpha$ -(+)-6-Methyloctanoyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-N $\gamma$ -[BOC-L-isoleucyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobuttersäure-hydrazid (VI). 11 g (0,0068 Mol) Octapeptidester V werden in 100 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 9,5 g (86%). Smp. 234–235°.  $[\alpha]_D^{24} = -25,7^\circ$  ( $c = 1,3$ , DMF).

$C_{80}H_{117}O_{21}N_{15}$  (1624,8) Ber. C 59,13 H 7,26 N 12,93% Gef. C 59,10 H 7,43 N 12,74%

5.  $N^\alpha$ -BOC-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-D-leucin-methylester (VII). 4,7 g (0,01 Mol)  $N^\alpha$ -BOC-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobuttersäure-p-nitrophenylester [15] werden zusammen mit 1,8 g (0,01 Mol) D-Leucin-methylester-hydrochlorid [28] in 20 ml DMF gelöst und bei 0° mit 1,39 ml (0,01 Mol) Triäthylamin versetzt. Die Reaktionsmischung wird 2 Std. in Eis gerührt und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Darauf wird sie zur Trockne verdampft, der Rückstand in Essigester gelöst, mit verdünntem wässrigem  $NH_3$ , verdünntem HCl und Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Die Substanz wird aus Äther/Petroläther umkristallisiert. Ausbeute 3,9 g (81%). Smp. 86–88°.  $[\alpha]_D^{24} = +2,2^\circ$  ( $c = 2$ , DMF).

$C_{24}H_{37}O_7N_3$  (479,6) Ber. C 60,10 H 7,77 N 8,76% Gef. C 59,91 H 7,75 N 8,95%

6. N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-D-leucin-methylester-hydrochlorid (III, R =  $OCH_3$ ). 5,8 g (0,01 Mol)  $N^\alpha$ -BOC-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-D-leucin-methylester (VII) werden mit 20 ml Trifluoressigsäure 40 Min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Der durch Abdampfen erhaltene ölige Rückstand wird in 20 ml 4 N HCl/Methanol gelöst und die Lösung erneut zur Trockne verdampft. Das anfallende Harz ist plattenchromatographisch rein und wird direkt weiterverwendet.

7.  $N^\alpha$ -(+)-6-Methyloctanoyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-N $\gamma$ -[BOC-L-isoleucyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-D-leucin-methylester (VIII). 2,4 g (1,37 mMol) Octapeptid-hydrazid VI werden in 45 ml DMF gelöst, auf -12° gekühlt, langsam mit 5,88 ml (5,88 mMol) 1 N HCl und anschließend mit 1,74 ml (1,74 mMol) 1 N  $NaNO_2$ -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. Unterdrücken werden 0,57 g (1,37 mMol) N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-D-leucin-methyl-ester-hydrochlorid (III, R =  $OCH_3$ ) in 15 ml DMF gelöst, bei 0° mit 0,19 ml (1,37 mMol) Triäthylamin versetzt, 5 Min. gerührt und filtriert. In das Filtrat wird bei 0° das Azid eingetragen, bis zur vollständigen Lösung gerührt und über Nacht im Eiskasten aufbewahrt. Das entstandene Gel wird mit Äthanol verdünnt, abgenutscht, mit Äthanol gewaschen und getrocknet. Die Substanz wird anschließend aus Eisessig/Wasser umgefällt. Ausbeute 2,3 g (85%). Smp. 242–243°.  $[\alpha]_D^{23} = -20,7^\circ$  ( $c = 1,1$ ; DMF).

$C_{99}H_{142}O_{26}N_{18}$  (1972,2) Ber. C 60,28 H 7,26 N 11,36% Gef. C 60,19 H 7,37 N 11,48%

8.  $N^\alpha$ -(+)-6-Methyloctanoyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-N $\gamma$ -[BOC-L-isoleucyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-D-leucin (IX). 7,5 g (0,0038 Mol) Decapeptid-methylester VIII werden in 100 ml Dimethylsulfoxid gelöst, mit 4,18 ml (0,00418 Mol) 1 N NaOH versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Darauf wird auf -12° gekühlt, mit 5-proz. Zitronensäure auf pH 5 gestellt und mit auf -20° vorgekühlter 20-proz. NaCl-Lösung gefällt, abgenutscht, mit viel Wasser gewaschen und getrocknet. Ausbeute 6,8 g (93%). Die Mikrotitration zeigt 1,03 COOH-Gruppen.

9.  $N^\alpha$ -(+)-6-Methyloctanoyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-N $\gamma$ -[BOC-L-isoleucyl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-N $\gamma$ -Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-D-leucin-p-nitrophenylester (X). 3,2 g (0,0016 Mol) Decapeptidsäure IX werden in 20 ml Pyridin und 10 ml DMF gelöst, bei Raumtemperatur mit 5,2 g (0,016 Mol) Di-p-nitrophenylsulfid [17] versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Dann wird mit 500 ml Äther/Petroläther (1:1) gefällt, abgenutscht, mit Äther gewaschen und

getrocknet. Die Substanz wird darauf so lange mit Äther/Petroläther verrieben, bis eine Probe mit verd. NaOH nicht mehr gelb wird. Ausbeute 2,8 g. Die Reinheit des Decapeptid-*p*-nitrophenylesters wurde spektroskopisch zu ca. 20% bestimmt [29].

10. *N*<sup>α</sup>-(+)-6-Methyloctanoyl-*N*<sup>γ</sup>-Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonyl-*N*<sup>γ</sup>-Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-*N*<sup>γ</sup>-[L-Isoleucyl-*N*<sup>γ</sup>-Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-*N*<sup>γ</sup>-Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-*N*<sup>γ</sup>-Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-D-leucin (XI). 2,6 g der geschützten Decapeptidsäure IX werden mit 5 ml Trifluoressigsäure bei Raumtemperatur geschüttelt, wobei vollständige Lösung eintritt. Darauf wird in Eis gekühlt, mit eiskaltem Äther gefällt, abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet. Die Substanz wird anschliessend in wenig DMF gelöst, mit etwas Pyridin alkalisch gestellt und dann mit Wasser gefällt, abgenutscht, mit Wasser und Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 2,3 g, die direkt zur Cyclisierung verwendet werden.

11. *N*<sup>α</sup>-(+)-6-Methyloctanoyl-*N*<sup>γ</sup>-Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonyl-*N*<sup>γ</sup>-Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-*N*<sup>γ</sup>-[BOC-L-Isoleucyl-*N*<sup>γ</sup>-Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-*N*<sup>γ</sup>-Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-*N*<sup>γ</sup>-Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-D-leucin-*t*-butylester (XII). Dieses geschützte Decapeptid wird analog dem entsprechenden Mchylester VIII hergestellt, nur wird an Stelle des Dipeptid-methylesters III (R = OCH<sub>3</sub>) die äquivalente Menge von *N*<sup>γ</sup>-Z-L- $\alpha$ , $\gamma$ -diaminobutyryl-D-leucin-*t*-butylester [1] verwendet. Das in einer Ausbeute von 70% erhaltene Endprodukt wird aus DMF/Wasser umgefällt. Smp. 222–224°.  $[\alpha]_D^{24} = -23,2^\circ$  ( $c = 0,47$ , DMF). Nach Totalhydrolyse beträgt das Aminosäureverhältnis Dab:Thr:Leu/Ile 6,3:2,1:2,0 (ber. 6,0:2,0:2,0). Isoleucin wurde platenchromatographisch neben Leucin im System Methyläthylketon/Pyridin/Wasser/Eisessig (70:15:15:2) nachgewiesen. Das Produkt enthält noch 3 Mol. DMF.

C<sub>102</sub>H<sub>148</sub>O<sub>26</sub>N<sub>16</sub>·3C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>ON (2219,5) Ber. C 59,63 H 7,62 N 11,91% Gef. C 59,50 H 7,24 N 11,80%

12. *Abspaltung der Schutzgruppen an den Kettenenden 1 und 7 zu XI und Cyclisierung zu XIII*. 2,6 g des geschützten Decapeptids XII werden auf analoge Weise, wie unter 10. beschrieben, mit Trifluoressigsäure gespalten. Das Endprodukt wird direkt zur Cyclisierung verwendet. – 5,6 g dieses Produktes werden in 7 l DMF gelöst und unter kräftigem Rühren zu einer Lösung von 224 g Dicyclohexyl-carbodiimid in 28 l Dioxan getropft. Die Lösung wird 3½ Tage bei Raumtemperatur gerührt, darauf mit 250 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, 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 2 l Äther/Petroläther 2:1 ausgerührt, abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute an Rohprodukt 4,5 g.

Auf gleiche Weise werden 3,8 g Decapeptid XI cyclisiert.

13. *Entfernung der Schutzgruppen*. 7,9 g Roh-Cyclisierungsprodukt werden in 1,5 l flüssigem Ammoniak gelöst und mit Na bis zu einer 20 Min. bestehenden Blaufärbung reduziert. Dann werden 5,3 g Ammoniumchlorid zugegeben, das Ammoniak verdampft und letzte Spuren durch Evakuieren im Wasserstrahlvakuum entfernt. Der Rückstand wird in 200 ml Eiswasser gelöst, bei 0° mit 6N HCl auf pH 6 gestellt, filtriert und das Filtrat lyophilisiert.

14. *Reinigung des Cyclisierungsproduktes*. – a) *Multiplikative Verteilung*: Das salzhaltige Roh-Cyclisierungsprodukt (aus 7,9 g geschütztem Decapeptid) wurde einer multiplikativen Verteilung über 190 Stufen im System *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (40:10:5:45) unterworfen. Die Verteilungskurve erhielten wir durch Umsetzen von je 0,2 ml unterer Phase mit FOLIN-DENIS-Reagens [30] und Bestimmung der optischen Dichten bei 750 nm. Da die Verteilungskurve im erwarteten Bereich keine Anzeichen eines Maximums aufwies, wurde der gesamte Inhalt der CRAIG-Apparatur – unterteilt in vier Fraktionen – durch Eindampfen im Vakuum bei 25° und anschliessende Gefriertrocknung aufgearbeitet. Die Fraktionen wurden dünnstichtchromatographisch untersucht und ihre antibakterielle Aktivität *in vitro* bestimmt (*Brucella bronchiseptica* ATCC 4617; Circulin-Standard: 900 mcg/mg; Cyclisierungs-Rohprodukt: 35 mcg/mg). Die beiden aktivsten Fraktionen 70–105 (104 mcg/mg) und 106–150 (181 mcg/mg) wurden vereinigt und im gleichen Lösungsmittelsystem einer zweiten Verteilung über 352 Stufen unterworfen. Die FOLIN-Kurve zeigte einen breiten Hauptgipfel im Bereich der Röhren 140–200. Nach der Aufarbeitung wies diese Fraktion (460 mg) eine Aktivität von 260 mcg/mg auf, während die übrigen Entnahmen nur zwischen 0 und 30 mcg/mg lagen. Die Hauptfraktion wurde erneut im gleichen System verteilt, wobei durch Teilentnahmen von wenig oder nichtaktivem Material nach 192, 604 und 1000 Stufen

die Substanz immer mehr angereichert wurde. Nach 1000 Stufen wurden die dritte Verteilung abgeschlossen und die Gipelfraktion 475–515 ( $\lambda_{max} = 495$ ,  $K_{25} = \sim 1$ ) durch schonendes Eindampfen und Lyophilisieren aufgearbeitet; es resultierten 90–100 mg eines leicht gelbbraunen Pulvers mit einer Aktivität von 500 mcg/mg gegen *Brucella bronchiseptica*. – Auf dem Dünnschichtchromatogramm wies dieses Präparat nun *einen* deutlichen Fleck in Circulin-Position auf, noch verunreinigt durch Nebenkomponenten vor und hinter dem Hauptfleck.

b) *Umfällen über die freie Base*: Die lyophilisierte Verteilungs-Hauptfraktion wurde in ca. 4 ml Wasser gelöst und in diese Lösung unter Eis-Kochsalz-Kühlung 20 Min.  $\text{NH}_3$  eingeleitet; anschliessend wurde abzentrifugiert, 2mal mit 10-proz. eiskaltem Ammoniak gewaschen, in Wasser suspendiert und 2mal lyophilisiert. Die Base (40 mg) wurde in der berechneten Menge 0,1N HCl gelöst und die Operation des Umfällens über die freie Base wiederholt. Dabei wurden 30 mg farblose Base erhalten.

c) *Überführen der Base in das kristalline Pentaphosphat*: 30 mg Base wurden in 2,0 ml wässriger 1,8-proz.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  gelöst und in der Siedehitze bis zur beginnenden Trübung tropfenweise mit abs. Äthanol versetzt. Die Lösung wurde zuerst langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die Kristallisation begann spontan in der noch warmen Lösung. Anderntags wurde der Niederschlag abfiltriert, mit kaltem abs. Äthanol gewaschen und 24 Std. bei 25° im Vakuum-Exsikkator über konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  getrocknet: 30 mg farbloses, kristallines Pulver.

*Umkrystallisation*: Das obige Präparat wurde in 1 ml heissem abs. Äthanol suspendiert und unter Erhitzen auf dem Dampfbad durch tropfenweisen Zusatz von heissem Wasser in Lösung gebracht. Die Lösung wurde faserfrei filtriert, das Filtrat in der Hitze bis zur bleibenden Trübung mit abs. Äthanol versetzt, die Trübung mit 1–2 Tropfen der verdünnten Phosphorsäure eben zum Verschwinden gebracht und die Lösung langsam abgekühlt. Nach Stehen über das Wochenende bei +4° wurde der Niederschlag wie oben filtriert, gewaschen und getrocknet; es resultierten ca. 25 mg eines rein weissen, in feinen Nadelchen kristallisierten Produktes, dessen analytische Charakterisierung in Tabelle 2 zusammengefasst ist.

#### SUMMARY

The synthesis of the cycloheptapeptide XIII (Figure 2), corresponding to the structure proposed by T. SUZUKI *et al.* for the antibiotic circulin A, and its crystallization as pentaphosphate are reported. This synthetic compound proved to be identical in all respects with the crystalline natural circulin A pentaphosphate.

Chemische Forschungsabteilung der  
F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. A.G., Basel

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. O. STUDER, W. LERGIER, P. LANZ, ERIKA BÖHNI & K. VOGLER, *Helv.* **48**, 1371 (1965).
- [2] F. J. MURRAY & P. A. TETRAULT, *Proc. Soc. Amer. Bacteriol.* **7**, 20 (1948).
- [3] F. J. MURRAY, P. A. TETRAULT, O. W. KAUFMANN, H. KOFFLER, D. H. PETERSON & D. R. COOLINGSWORTH, *J. Bacteriol.* **57**, 305 (1949).
- [4] C. McLEOD, *J. Bacteriol.* **56**, 749 (1948).
- [5] W. GARSON, C. McLEOD, P. A. TETRAULT, H. KOFFLER, D. H. PETERSON & D. R. COOLINGSWORTH, *J. Bacteriol.* **58**, 115 (1949).
- [6] D. H. PETERSON & L. N. REINECKE, *J. biol. Chemistry* **187**, 95 (1949).
- [7] J. H. DOWLING, H. KOFFLER, H. C. REITZ, D. H. PETERSON & P. A. TETRAULT, *Science* **116**, 147 (1952).
- [8] H. KOFFLER, *Abstr. of Papers*, 133rd Meeting, Amer. chem. Soc. **1958**, 25c; J. E. GRADY, H. KOFFLER, J. L. PARSONS, T. KOBAYASHI & P. A. TETRAULT, *Federation Proc.* **17**, 233 (1958).
- [9] H. KOFFLER & T. KOBAYASHI, *Abstr. Commun.*, 4th Intern. Congr. Biochem. **9**, 9 (1958); H. KOFFLER, *Science* **130**, 1419 (1959).

- [10] T. SUZUKI, K. HAYASHI, K. FUJIKAWA & K. TSUKAMOTO, *J. Biochem.* **54**, 555 (1963); **56**, 335 (1964).
- [11] T. SUZUKI, H. INOUE, K. FUJIKAWA & S. NAGASAWA, *J. Biochem.* **54**, 173 (1963).
- [12] T. SUZUKI, K. HAYASHI & K. FUJIKAWA, *J. Biochem.* **54**, 412 (1963).
- [13] T. SUZUKI & K. FUJIKAWA, *J. Biochem.* **56**, 182 (1964).
- [14] K. FUJIKAWA, Y. SUKETA, K. HAYASHI & T. SUZUKI, *Experientia* **27**, 307 (1965).
- [15] K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER & E. BÖHNI, *Helv.* **48**, 1161 (1965).
- [16] G. W. ANDERSON, J. E. ZIMMERMAN & F. M. CALLAHAN, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 1839 (1964).
- [17] B. ISELIN & R. SCHWYZER, *Helv.* **43**, 1760 (1960).
- [18] E. STAHL, Arbeitsvorschrift für Dünnschichtchromatographie, herausgegeben von der Firma C. DESAGA GMBH, Heidelberg.
- [19] TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* **67**, 257 (1955).
- [20] R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **33**, 1975 (1950).
- [21] K. RÖWE, E. FERBER & H. FISCHER, *Z. physiol. Chem.* **313**, 174 (1958).
- [22] Dünnschichtchromatographie, herausgegeben von E. STAHL, Springer-Verlag 1962, S. 24 und 431/432.
- [23] F. SANGER, *Biochem. J.* **39**, 507 (1945).
- [24] K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER, E. BÖHNI & B. FUST, *Helv.* **46**, 2823 (1964).
- [25] J. RUDINGER, *Pure appl. Chemistry* **7**, 335 (1963).
- [26] H. AROLD, *Acta chim. Hung.* **44**, 155 (1964).
- [27] R. O. STUDER & K. VOGLER, *Helv.* **45**, 819 (1962).
- [28] C. S. SMITH & A. E. BROWN, *J. Amer. chem. Soc.* **63**, 2605 (1941).
- [29] R. SCHWYZER & P. SIEBER, *Helv.* **40**, 624 (1957).
- [30] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & ROSE J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* **193**, 265 (1951).

## 112. Über Dibenz[b,f]-azocin-Derivate

von O. Schindler, R. Blaser und F. Hunziker

(10. II. 66)

Die FRIEDEL-CRAFTS-Reaktion von Isocyanaten mit Benzolderivaten, eine erstmals von LEUCKART [1] untersuchte Umsetzung, führt zu N-substituierten Benzamiden [2]. Der Reaktionstyp kann bei intramolekularem Verlauf zu Ringschlüssen verwendet werden: auf diese Weise wurden Phenanthridone [3], 10, 11-Dihydro-11-oxo-dibenz[b,f]-1,4-thiazepine, -oxazepine und 5, 6-Dihydro-6-oxo-dibenz[b,e]-azepine [4] hergestellt.

Es war von Interesse abzuklären, ob die Ringschlussmethode zur Bildung von Dibenzazocinen geeignet ist. Im folgenden wird über den Verlauf der Reaktion mit *o*-Aminodibenzyl (I) [5] und *o*-Amino-*cis*-stilben (V) [5] als Ausgangsmaterialien berichtet.

Mit einem Überschuss an Phosgen wurde aus *o*-Aminodibenzyl (I) das Isocyanat II erhalten. Dieses, ein destillierbares Öl mit der für die Isocyanatgruppierung charakteristischen Absorptionsbande bei  $2300\text{ cm}^{-1}$  (in  $\text{CHCl}_3$ ), wurde mittels des durch Reaktion mit Piperidin erhaltenen krist. Harnstoffs IV charakterisiert. II wurde mit  $\text{AlCl}_3$  in *o*-Dichlorbenzol unter den früher beschriebenen Versuchsbedingungen [4] umgesetzt. Aus den neutralen Anteilen des Reaktionsgemisches liess sich das Lactam III isolieren, das mit einem durch BECKMANN'sche Umlagerung von Dibenzsuberonoxim