

109. Synthesen in der Polymyxinreihe

12. Mitteilung¹⁾

Die Synthese von Polymyxin D₁

von R. O. Studer und W. Lergier

Chemische Forschungsabteilung der F. Hoffmann-La Roche & Co. AG., Basel

Herrn Dr. O. Isler zum 60. Geburtstag gewidmet

(6. V. 70)

Summary. The synthesis of the cycloheptapeptide XI (Figure 1), corresponding to the structure proposed by T. Suzuki *et al.* for the antibiotic Polymyxin D₁ is reported. This synthetic compound proved to be identical in all respects with natural Polymyxin D₁.

1. Einleitung. – Im Jahre 1947 wurde fast gleichzeitig aus verschiedenen Laboratorien über die Isolierung von Polypeptid-Antibiotica aus Kulturen von Bodenbakterien geschrieben. Ainsworth und Mitarbeiter [1] berichteten über «Aerosporin», während sowohl Shepherd und Mitarbeiter [2] als auch Benedict & Langlykke [3] über ein Antibioticum «Polymyxin» publizierten. Da es sich schon sehr bald herausstellte, dass es sich um eine Gruppe nahe verwandter Verbindungen handelt, wurde in gegenseitigem Einverständnis der Gruppenname Polymyxin gewählt. Die einzelnen, sich durch ihre Aminosäurezusammensetzung unterscheidenden Antibiotica wurden durch Zusatz eines Buchstabens bezeichnet. So wurde «Aerosporin» zu Polymyxin A und «Polymyxin» zu Polymyxin D [4].

1949 fanden Bell und Mitarbeiter [5], dass Polymyxin D ein basisches Polypeptid ist, das nach Totalhydrolyse die Aminosäuren L-Threonin, D-Leucin, D-Serin und L- α , γ -Diaminobuttersäure im Verhältnis 3:1:1:5 liefert. Durch Gegenstromverteilung konnten 1966 Suzuki *et al.* [6] Polymyxin D in zwei aktive Komponenten, Polymyxin D₁ und Polymyxin D₂, auftrennen. Beide zeigen das gleiche, schon von Bell und Mitarbeitern gefundene Aminosäureverhältnis. Im Hydrolysat von Polymyxin D₁ wurde zusätzlich (+)-6-Methyloctansäure, in demjenigen von Polymyxin D₂ 6-Methylheptansäure gefunden. Durch Kombination der Peptidfragmente, die sowohl durch saure Partialhydrolyse als auch durch enzymatischen Abbau mit Nagarse und nachfolgende Sequenzanalyse erhalten wurden, konnte die Struktur für Polymyxin D₁ abgeleitet werden (Fig. 1) [6].

Polymyxin D₁ unterscheidet sich damit von Polymyxin E₁ (= Colistin A) [7], [8] und Circulin A [9], [10] durch den Austausch von 2 Aminosäureresten und von Polymyxin B₁ [11], [12] durch den Austausch von 3 Aminosäureresten. Interessant ist besonders die Anwesenheit einer D-Aminosäure in der Seitenkette, die sich dadurch von den Seitenketten der bisher synthetisierten, natürlichen Polymyxine mit ausschliesslich L-Aminosäuren auszeichnet.

¹⁾ 11. Mitteilung [10]. – Die Abkürzungen folgen den Vorschlägen des V. Europ. Peptidsymposiums, Pergamon Press, Oxford 1963. Z = Benzyloxycarbonyl, Boc = *t*-Butyloxycarbonyl, Bu^t = *t*-Butylester, MOA = (+)-6-Methyloctansäure, DMF = Dimethylformamid.

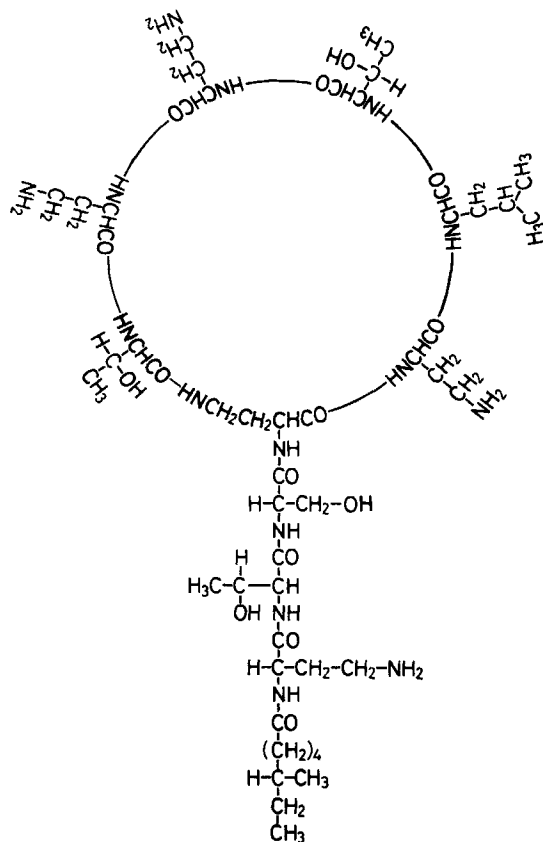


Fig. 1. Struktur des verzweigten Cycloheptapeptides XI = Polymyxin D₁

2. Synthese. – Infolge der engen Verwandtschaft der Polymyxine erfolgte die Synthese von Polymyxin D₁ in Anlehnung an die Synthesen von Polymyxin B₁ [12], Polymyxin E₁ (= Colistin A) [8] und Circulin A [10] über das in Fig. 2 wiedergegebene, geschützte verzweigte Decapeptid. Dieses besitzt in 1-Stellung einen L-Threoninrest und in 3'-Stellung einen D-Serinrest anstelle des im Polymyxin E₁ enthaltenen L-Leucin- bzw. L- α , γ -Diaminobuttersäurerests.

Es konnten verschiedene, schon bei den Synthesen von Polymyxin E₁ [8] und Circulin A [10] verwendete Peptid-Zwischenprodukte verwendet werden (Fig. 3).

Insbesondere das allen drei Cyclopeptiden gemeinsame Bruchstück III (6–7) (Fig. 3) konnte unverändert übernommen werden. Im Tetrapeptid-hydrazid II (1–2–3–4) (Fig. 3) musste gegenüber Colistin A ein L-Leucin durch ein L-Threonin ausgetauscht werden. Dazu wurde das bereits früher beschriebene Tripeptid N ^{γ} -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N ^{γ} -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester [12] mit Boc-L-Threonin und Dicyclohexyl-carbodiimid zum Tetrapeptid verlängert und anschliessend mit Hydrazinhydrat ins Hydrazid übergeführt. Das Bruchstück I wurde aus dem schon beschriebenen Dipeptid N ^{α} -(+)-6-Methyloctanoyl-N ^{γ} -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin-hydrazid [12] durch Azidkupplung mit O-Benzyl-D-Serin-methyl-

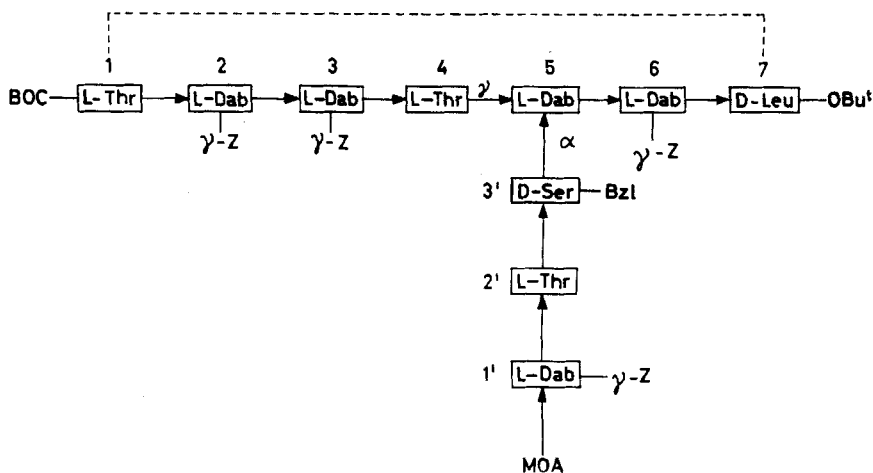
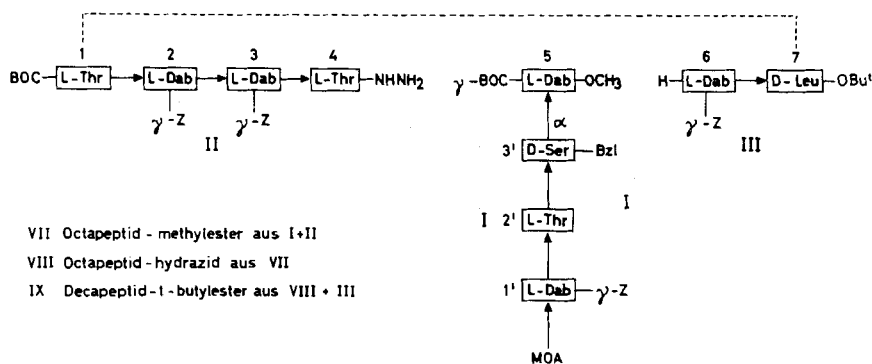


Fig. 2. Struktur des geschützten Decapeptides IX



- VII Octapeptid - methylester aus I+II
- VIII Octapeptid - hydrazid aus VII
- IX Decapeptid - *t*-butylester aus VIII + III

Fig. 3. Aufbauschema für das geschützte Decapeptid

ester [13], anschliessende Überführung mit Hydrazinhydrat ins Hydrazid und nochmalige Azidkupplung mit N^{γ} -Boc-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester erhalten.

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. 3) zum geschützten Octapeptid-methylester VII umgesetzt. Dieser wurde anschliessend mit Hydrazinhydrat ins entsprechende Hydrazid VIII übergeführt und nach dem Azidverfahren mit III zum geschützten Decapeptid-*t*-butylester IX (Fig. 2) verlängert. Nach Abspaltung der beiden Schutzgruppen an den Kettenenden mit Trifluoressigsäure konnte das erhaltene Produkt mit überschüssigem Dicyclohexylcarbodiimid in hoher Verdünnung in Dimethylformamid/Dioxan cyclisiert werden.

Aus dem rohen Cyclisierungsprodukt wurden die Schutzgruppen durch Hydrierung entfernt und das so erhaltene Rohprodukt anschliessend durch zweimalige Gegenstromverteilung gereinigt. Eine endgültige Reinigung wurde durch Umfällen über die freie Base erzielt, wobei auffiel, dass die freie Base von Polymyxin D₁ infolge der zusätzlichen Hydroxylgruppen von Threonin und Serin viel wasserlöslicher ist als die

anderen Polymyxin-Basen. Im Gegensatz zu den anderen Polymyxinen konnte bisher noch kein kristallines Salz von Polymyxin D₁ erhalten werden.

3. Vergleich des Endproduktes mit natürlichem Polymyxin D₁²⁾. -- Die physikalisch-chemischen Daten des Tetrahydrochlorides des cyclischen Decapeptides XI sind in Tab. 1 zusammengestellt und mit denjenigen von natürlichem Polymyxin D₁ verglichen. Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse belegt die Identität der beiden Produkte.

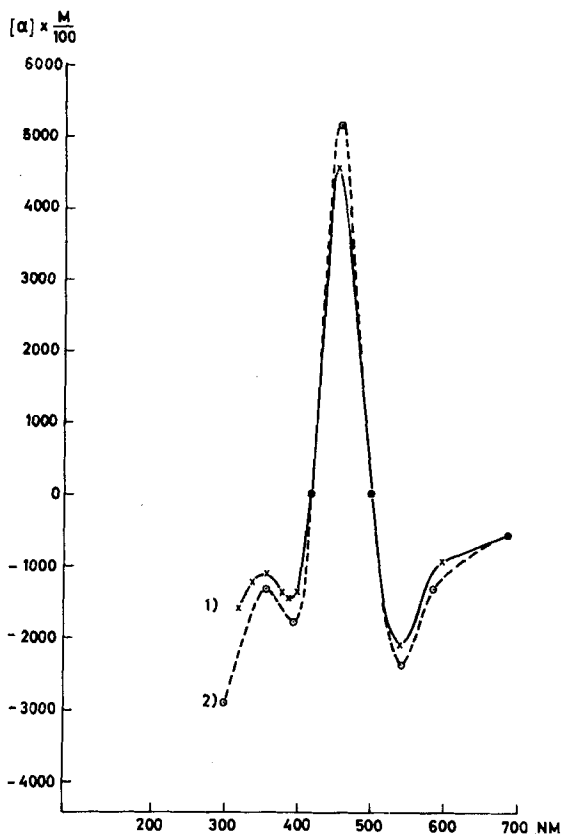


Fig. 4. Rotationsdispersionskurven der frischen Nickelkomplexe von natürlichem und synthetischem Polymyxin D₁

1) natürliches Polymyxin D₁, 2) synth. Polymyxin D₁

Die Rotationsdispersionskurven der Nickelkomplexe, die bei der Identifizierung von Polymyxin B₁ [12] [15] und Polymyxin E₁ [8] besonders wichtig waren, zeigten eine sehr gute Übereinstimmung (Fig. 4).

Die antibakterielle Aktivität des Cycloheptapeptides wurde gegen verschiedene Erreger *in vitro* mit derjenigen von natürlichem Polymyxin D₁ nach der schon früher

²⁾ Herrn Prof. T. Suzuki, Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka (Japan), danken wir für die freundliche Überlassung eines Präparates von Polymyxin D₁.

Erläuterungen zur Tabelle 1 :

1. Die Dünnschichtchromatographie wurde auf Kieselgel-Fertigplatten *Merck* nach der allgemein üblichen Arbeitstechnik durchgeführt.
2. Wir benutzen das CAMAG HVE-System der Firma *Camag*, Muttenz. Die Wanderstrecke wird im Verhältnis zu derjenigen des Histidins, das gleichzeitig mitlief, angegeben.
3. Die Drehungsmessungen wurden in einem photoelektrischen Polarimeter Mod. 141 der Firma *Perkin Elmer*, Überlingen/Bodensee, aufgenommen. Beide Präparate wurden vor der Messung unter identischen Bedingungen getrocknet.
4. Die Bestimmung der quantitativen Aminosäure-Verhältnisse im Totalhydrolysat erfolgte mit einem Unichrom-Aminosäureanalysator (*Beckman*, München) nach dem von *Spackman, Stein & Moore* [14] entwickelten Verfahren.
5. Ca. 3 μ Mol Synthese-Endprodukt wurden, wie früher beschrieben [10], dinitrophenyliert. Im Hydrolysat des DNP-Peptides konnten, ausser γ -DNP-Dab, keine DNP-Aminosäuren nachgewiesen werden.
6. Die Nickelkomplexe wurden durch Zusammengeben von äquimolaren Mengen Peptid und Nickelsulfat sowie Einstellen des pH auf 9,4 hergestellt [8]. Die Peptidkonzentration in der Endlösung betrug ca. 0,1%. Die Messungen erfolgten sofort nach Bildung des Komplexes, nach 24 Std. und nach 7 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur.

Die ORD.-Spektren wurden in unserer physikalisch-chemischen Abteilung von Dr. *K. Noack* mit einem automatischen, selbstabgleichenden Spektralarimeter aufgenommen.

Tabelle 1. *Analytische Charakterisierung der Tetrahydrochloride von natürlichem und synthetischem Polymyxin D₁*

Charakterisierung	synthetisch	natürlich
1. Dünnschichtchromatographie, Kieselgel, Ninhydrin	einheitlich	3 schwache Nebenflecke
a) <i>n</i> -Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24	Rf 0,46	Hauptfleck: Rf 0,46
b) Aceton/2N Ammoniak/Eisessig/Wasser 150:20:10:50	Rf 0,51	Rf 0,51
2. Hochspannungs-Papierelktrophorese, 125 V cm ⁻¹	einheitlich	einheitlich
a) 3,75% Ameisensäure + 2,5% Eisessig in Wasser, pH, 1,6	0,83 His	0,83 His
b) 0,4% Pyridin + 0,8% Eisessig in Wasser, pH 4,4	0,90 His	0,90 His
c) 2% Pyridin + 0,2% Eisessig in Wasser, pH 6,0	1,25 His	1,25 His
3. $[\alpha]_D^{25}$	- 43,7° (<i>c</i> = 0,568, H ₂ O)	- 42,1° (<i>c</i> = 0,374, H ₂ O)
4. Quantitative Aminosäureanalyse nach Totalhydrolyse		
ber.: Dab Thr Ser Leu	gef.: Dab Thr Ser Leu	
5,0 3,0 1,0 1,0	5,07 3,14 1,02 1,00	
5. Dinitrophenylierung und Hydrolyse des DNP-Peptides	nur γ -DNP-Dab	nicht bestimmt
6. ORD. der Nickelkomplexe (frisch und gealtert)	identisch mit Naturprodukt	identisch mit Syntheseprodukt

beschriebenen Methodik verglichen [15]³⁾ (Tab. 2). Als Standard wurde der Polymyxin-B-Standard FDA mit einer Aktivität von 8300 E/mg verwendet. Innerhalb der Fehlergrenzen erweist sich das synthetische Produkt als gleich aktiv wie Polymyxin D₁.

Tabelle 2. Antibakterielle Aktivität in vitro von synthetischem und natürlichem Polymyxin D₁ (Tetrahydrochloride)

Mikroorganismus	Mittlere Aktivität E/mg ^{a)}
<i>Brucella bronchiseptica</i> ATCC 4617	
Synthetisches Polymyxin D ₁	14194 ± 1536
Natürliches Polymyxin D ₁	16164 ± 3354
<i>Escherichia coli</i> 10536	
Synthetisches Polymyxin D ₁	10375 ± 2699
Natürliches Polymyxin D ₁	10464 ± 1448
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10131	
Synthetisches Polymyxin D ₁	11638
Natürliches Polymyxin D ₁	11775

^{a)} Bezogen auf Polymyxin-B-Standard FDA mit 8300 E/mg.

4. Diskussion. – Auf Grund aller vorliegenden Daten kann geschlossen werden, dass unser Syntheseprodukt mit natürlichem Polymyxin D₁ übereinstimmt und dass diesem somit die von *Suzuki et al.* vorgeschlagene Struktur [6] (Fig. 1) zukommt. Polymyxin D₁, welches in der Seitenkette eine D-Aminosäure besitzt, gleicht damit dem früher synthetisierten Cyclodecapeptid 7α (1'-D-Dab) [16], welches in der 1-Stellung der Seitenkette eine D-α,γ-Diaminobuttersäure aufweist und als Stereoisomeres von Polymyxin B₁ anzusehen ist. Die Rotationsdispersionskurven der Ni-Komplexe von Polymyxin D₁ und dem Analogen 7α (1'-D-Dab) sind untereinander sehr ähnlich und deutlich verschoben gegenüber denjenigen der Polymyxine, welche nur L-Aminosäurereste in der Seitenkette aufweisen (Polymyxin B₁, Polymyxin E₁, Circulin A). Die Methode erweist sich deshalb als empfindlich für den Nachweis der optischen Konfiguration der Aminosäuren in der Seitenkette.

Experimenteller Teil⁴⁾

1. Boc-L-threonyl-N^γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-N^γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-L-threonin-methylester (IV). 3,2 g (5 mM) N^γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-N^γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-L-threonin-methylester-hydrochlorid [12] werden in 25 ml DMF gelöst und bei 0° mit 0,7 ml (5 mMol) Triäthylamin versetzt. Nach 5 Min. Rühren wird filtriert und das Filtrat mit 1,1 g (5 mMol) Boc-L-threonin [17] sowie bei –10° mit 1,1 g (5,3 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Die Mischung wird 1 Std. bei –10° gerührt und über Nacht im Eiskasten aufbewahrt. Nach Filtration vom Harnstoff wird mit Wasser gefällt, abgentscht und das Produkt auf der Nutsche mit eiskalter 5-proz. Zitronensäure, eiskalter 10-proz. NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen. Die Substanz wird aus Äthanol/Wasser umkristallisiert: 3 g (74% d. Th.). Smp. 195–197°, [α]_D²⁵ = –11,8° (c = 2, DMF).

C₃₈H₅₄N₆O₁₃ (802,8) Ber. C 56,85 H 6,78 N 10,47% Gef. C 57,01 H 6,95 N 10,28%

2. Boc-L-threonyl-N^γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-N^γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-L-threonin-hydrazid (II). 3,3 g (4,1 mMol) Boc-L-threonin-N^γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-N^γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-L-

³⁾ Die Bestimmungen der mikrobiologischen Aktivität wurden in unserer mikrobiologischen Abteilung unter der Leitung von Frl. Dr. E. Böhni durchgeführt.

⁴⁾ Die Smp. wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert. Die Analysenmuster wurden 16 Std. über P₂O₅ bei 0,01 Torr und 100° getrocknet. Für die sorgfältige Durchführung der synthetischen Arbeiten danken wir Herrn K. Schweizer.

threonin-methylester (I) werden in 40 ml Methanol 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: 3,2 g (96%). Smp. 205–206°, $[\alpha]_D^{23} = -18,2^\circ$ ($c = 2$, DMF).

$C_{37}H_{54}N_8O_{12}$ (802,8) Ber. C 55,35 H 6,78 N 13,96% Gef. C 55,42 H 6,78 N 13,65%

3. *N^α-(+)-6-Methyloctanoyl-N^γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-L-threonyl-O-benzyl-D-serin-methylester (V)*. 5,1 g (10 mMol) *N^α-(+)-6-Methyloctanoyl-N^γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-L-threonin-hydrazid* [12] werden in 100 ml 60-proz. Essigsäure und 7 ml (21 mMol) 3N HCl gelöst, auf -10° gekühlt und mit einer Lösung von 0,76 g (11 mMol) Natriumnitrit in 5 ml Wasser versetzt. Nach 5 Min. Rühren bei -10° wird das Azid mit Eiswasser gefällt, abgenutscht, mit eiskalter 5-proz. NaHCO₃-Lösung und kaltem Wasser gewaschen und scharf abgepresst. In der Zwischenzeit werden 3,2 g (13 mMol) O-Benzyl-D-serin-methylester-hydrochlorid [13] in 20 ml DMF gelöst, bei 0° mit 1,85 ml (13 mMol) Triäthylamin versetzt, 5 Min. bei 0° gerührt und dann von Triäthylamin-hydrochlorid abgenutscht. In das eiskalte Filtrat wird das Azid eingetragen und bis zur vollständigen Lösung unter Eiskühlung gerührt. Nach Stehen über Nacht im Eisschrank wird das entstandene Gel mit Äther verrieben und abgenutscht. Das Produkt wird aus Metanol/Wasser umgefällt: 5,2 g (76%). Smp. 172–173°, $[\alpha]_D^{23} = -10,3^\circ$ ($c = 2$, DMF).

$C_{36}H_{52}N_4O_3$ (684,8) Ber. C 63,14 H 7,65 N 8,18% Gef. C 63,34 H 7,68 N 8,42%

4. *N^α-(+)-6-Methyloctanoyl-N^γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-L-threonyl-O-benzyl-D-serin-hydrazid (VI)*. 27 g (40 mMol) geschützter Tripeptidmethylester V werden in 300 ml Methanol unter Erwärmen gelöst, bei Raumtemperatur mit 20,8 ml Hydrazinhydrat versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das entstandene Gel wird mit Eiswasser verdünnt, abgenutscht, mit Wasser und Äther gewaschen, getrocknet und aus DMF/Äthanol umkristallisiert: 25,4 g (94%). Smp. 223–224°, $[\alpha]_D^{23} = -10,7^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{35}H_{52}N_6O_8$ (684,8) Ber. C 61,39 H 7,65 N 12,27% Gef. C 60,96 H 7,69 N 12,27%

5. *N^α-(+)-6-Methyloctanoyl-N^γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-L-threonyl-O-benzyl-D-seryl-N^γ-Boc-L-α,γ-diaminobuttersäure-methylester (I)*. 2,7 g (4 mMol) Tripeptid-hydrazid VI werden in 60 ml Eisessig suspendiert, mit 2,8 ml 3N HCl versetzt und bis zur vollständigen Lösung gerührt. Unter Zusatz von wenig Wasser wird auf -10° gekühlt und mit 276 mg (4 mMol) NaNO₂ in 2 ml Wasser versetzt. Nach 10 Min. Rühren bei -10° wird das Azid durch Zusatz von eiskaltem Wasser gefällt, sofort abgenutscht, mit kalter 5-proz. NaHCO₃-Lösung und Eiswasser gewaschen und scharf abgepresst. In der Zwischenzeit werden 1,1 g (4 mMol) *N^γ-Boc-L-α,γ-diaminobuttersäure-methylester-hydrochlorid* [12] in 5 ml DMF gelöst, in der Kälte mit 0,56 ml (4 mMol) Triäthylamin versetzt, 5 Min. gerührt, das Triäthylamin-hydrochlorid abfiltriert und mit 5 ml DMF nachgewaschen. In das eiskalte Filtrat wird das Azid eingetragen und bis zur vollständigen Lösung unter Eiskühlung gerührt. Nach Stehen über Nacht im Eisschrank wird das entstandene Gel mit Wasser verrieben, abgenutscht, mit eiskalter 5-proz. Zitronensäure, 5-proz. NaHCO₃-Lösung und Wasser gewaschen und getrocknet. Das Produkt wird aus Äthanol/Wasser umgefällt: 3 g (84%). Smp. 167–168°, $[\alpha]_D^{23} = -16,8^\circ$ ($c = 1$, DMF).

$C_{45}H_{68}O_{12}N_6$ (885,0) Ber. C 61,07 H 7,74 N 9,50% Gef. C 61,36 H 7,82 N 9,70%

6. *N^α-(+)-6-Methyloctanoyl-N^γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-L-threonyl-O-benzyl-D-seryl-N^γ-[Boc-L-threonyl-N^γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-N^γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-L-threonyl]-L-α,γ-diaminobuttersäure-methylester (VII)*. 20,5 g (23 mMol) *N^α-(+)-6-Methyloctanoyl-N^γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-L-threonyl-O-benzyl-D-seryl-N^γ-Boc-L-α,γ-diaminobuttersäure-methylester (I)* werden mit 90 ml Trifluoressigsäure 40 Min. bei Raumtemperatur geschüttelt, wobei vollständige Lösung eintritt. Die Trifluoressigsäure wird abgedampft, der Rückstand mit Äther versetzt, abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet. Darauf wird die Substanz in Methanol gelöst, die Lösung mit 6 ml (24 mMol) 4N HCl in Methanol versetzt und abgedampft. Der Rückstand wird in Methanol gelöst, die Lösung mit Äther/Petroläther versetzt, der entstandene Niederschlag abgenutscht, mit Petroläther gewaschen und getrocknet. Das Ninhydrin-positive, plattenchromatographisch reine Tetrapeptid-hydrochlorid wird direkt weiter verwendet.

2,24 g (2,7 mMol) Boc-L-threonyl-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 (10,8 mMol) 1N HCl versetzt. Anschliessend wird die Lösung tropfenweise mit 3,2 ml

(3,2 mMol) 1N NaNO₂-Lösung versetzt und 5 Min. bei –12° gerührt. Dann 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 2,15 g (2,7 mMol) des obigen Tetrapeptid-hydrochlorids in 20 ml DMF gelöst und bei 0° mit 0,38 ml (2,7 mMol) Triäthylamin versetzt. Nach 5 Min. Rühren wird filtriert und das Azid in das eiskalte Filtrat eingetragen. Die Mischung wird bis zur vollständigen Lösung des Azids gerührt und über Nacht im Eiskasten aufbewahrt. Am anderen Morgen wird das entstandene Gel mit Äther verrieben und abgenutscht. Das Produkt wird aus DMF/Äthanol umgefällt: 2,1 g (50%). Smp. 203–205°, $[\alpha]_D^{25} = -23,9^\circ$ ($c = 1$, DMF).

C₇₇H₁₁₀N₁₂O₂₂ (1555,8) Ber. C 59,45 H 7,13 N 10,80% Gef. C 59,27 H 7,15 N 10,63%

7. *N*^α-(+)-6-Methyloctanoyl-*N*γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-L-threonyl-O-benzyl-D-seryl-*N*γ-[Boc-L-threonyl-*N*γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-*N*γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-L-threonyl]-L-α,γ-diaminobuttersäure-hydrazid (VIII). 15,7 g (10 mMol) Octapeptidester VII werden in 135 ml DMF unter Erwärmen gelöst und bei Raumtemperatur mit 5,5 ml Hydrazinhydrat versetzt. Nach Stehen der Lösung über Nacht wird mit Wasser gefällt, abgenutscht, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das Produkt wird aus DMF/Wasser umgefällt: 14 g (89%). Smp. 224–225°, $[\alpha]_D^{25} = -18,1^\circ$ ($c = 1$, DMF).

C₇₆H₁₁₀N₁₄O₂₁ (1555,8) Ber. C 58,67 H 7,13 N 12,60% Gef. C 58,67 H 7,32 N 12,40%

8. *N*^α-(+)-6-Methyloctanoyl-*N*γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-L-threonyl-O-benzyl-D-seryl-*N*γ-[Boc-L-threonyl-*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-leucin-*t*-butylester (IX). 2,28 g (1,47 mMol) Octapeptid-hydrazid IX werden in 45 ml DMF gelöst, auf –12° gekühlt, langsam mit 5,88 ml (5,88 mMol) 1N HCl und anschliessend mit 1,74 ml (1,74 mMol) 1N NaNO₂-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. NaHCO₃-Lösung und Eiswasser gewaschen und scharf abgepresst. Darauf wird das Azid in eine eiskalte Lösung von 0,7 g (1,68 mMol) *N*γ-Z-L-α,γ-diaminobutyryl-D-leucin-*t*-butylester [8] in 15 ml DMF eingetragen und bis zur vollständigen Lösung unter Eiskühlung gerührt. Die Mischung wird über Nacht im Eiskasten aufbewahrt. Dann wird das entstandene Gel mit Äther verrieben, abgenutscht und aus DMF/Wasser umgefällt: 2,3 g (80%). Smp. 206–208°, $[\alpha]_D^{25} = -11,7^\circ$ ($c = 1$, DMF).

C₉₈H₁₄₁N₁₆O₂₆ (1945,3) Ber. C 60,51 H 7,31 N 10,80% Gef. C 60,26 H 7,37 N 10,94%

9. *Abspaltung der Schutzgruppen an den Kettenenden 1 und 7 zu X und Cyclisierung zu XI*. 2,6 g (1,34 mMol) des geschützten Decapeptids X werden mit 7 ml Trifluoressigsäure 15 Min. bei Raumtemperatur gerührt, 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.

4,5 g dieses Produktes werden in 6,5 l DMF unter leichtem Erwärmen gelöst und unter kräftigem Rühren bei Raumtemperatur zu einer Lösung von 208 g Dicyclohexyl-carbodiimid in 26 l Dioxan innerhalb ca. 10 Std. getropft. Die Lösung wird 3½ 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, 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, abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute an Rohprodukt 6,5 g. Auf gleiche Weise werden noch 7 g cyclisiert.

10. *Entfernung der Schutzgruppen*. 6,5 g Rohprodukt aus der Cyclisierung werden in 60 ml Eisessig gelöst und über Pd/C hydriert. Nach beendeter Hydrierung wird vom Katalysator abgenutscht und zur Trockne verdampft. Der entstandene Schaum wird mit Äther verrieben, abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet: 5,4 g.

11. *Reinigung des Cyclisierungsproduktes*. – a) *Multiplikative Verteilung*: Das Hydrierungs-Rohprodukt aus ca. 8,2 g geschütztem Decapeptid wurde einer ersten Verteilung über 200 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-Ciocalteu*-Reagens [18] und Bestimmung der optischen Dichten bei 750 nm. Zusätzlich wurden aliquote Proben der Pik-Maxima dünn-schichtchromatographisch und mikrobiologisch untersucht. Der Gipfel mit Maximum um Röhrchen 80 ($G = \sim 0,66$) wies bereits ca. 40% der mikrobiologischen Aktivität auf und zeigte dünn-schichtchromatographisch einen deutlichen Fleck in der Lage des Flecks des Naturproduktes. Die vereinigten Gläscheninhalte 70–109 wurden bei 20° eingedampft und 2mal aus Wasser lyophilisiert. Man erhält ca. 630 mg eines weissen, lockeren Pulvers.

Mit obigem Präparat wurde eine ~~zweite~~-*Craig*-Verteilung im gleichen Lösungsmittelgemisch über 500 Stufen durchgeführt. Dabei konnten kleine Anteile der benachbarten Fraktionen aus der ersten Verteilung weitgehend abgetrennt werden. Für den Hauptgipfel ergab sich bei der zweiten Verteilung eine Verteilungszahl von $G = 0,61$. Der Inhalt der Gläschen innerhalb der Wendepunkte (170–200) wurde wie oben vereinigt und aufgearbeitet; es resultierten 300 mg eines weissen, dünn-schichtchromatographisch schon weitgehend einheitlichen Lyophilisates.

b) *Umfällen über die freie Base*: Durch die Einführung zweier zusätzlicher hydrophiler Gruppen (Threonin, Serin) ist die Wasserlöslichkeit der Polymyxin-D₁-Base gegenüber derjenigen von Polymyxin B₁ stark erhöht worden. Um nicht auf den sehr wirksamen Reinigungsschritt der Basenfällung verzichten zu müssen, haben wir die frühere Vorschrift wie folgt modifiziert: In die Lösung von 300 mg Hauptfraktion 170–200 aus der zweiten Verteilung in 5 ml Wasser wurde während ca. 45 Min. Ammoniak-Gas eingeleitet; die zu Beginn 0° betragende Temperatur wurde dabei langsam auf –15° gesenkt. Dann wurde die ausgefällte Substanz abzentrifugiert, das Überstehende dekantiert und die Base in ca. 4 ml 25-proz. Ammoniak bei 0° suspendiert; da sich dabei ein beträchtlicher Teil der Base löst, muss zur Vervollständigung der Fällung wiederum – unter Senken der Temperatur – NH₃ eingeleitet werden (10–15 Min.). Nach erneutem Zentrifugieren und Dekantieren wiederholt man diesen «Waschprozess» noch 2mal. Der letzte Basenniederschlag wurde noch 3mal aus Wasser lyophilisiert und zur vollständigen Entfernung der NH₃-Reste 5 Tage im Vakuum über konz. Schwefelsäure bei 0° getrocknet. Darauf wurde die Base in der berechneten Menge 0,1N HCl gelöst und die Lösung 3mal lyophilisiert; es resultierten 190 mg reines Tetrahydrochlorid.

Da es bisher noch nicht gelang, das freie Polymyxin D₁ in ein kristallisiertes Tetraorthosphat – entsprechend dem Pentaorthosphat beim B₁ – überzuführen, sind die Vergleiche mit dem natürlichen Polymyxin D₁ mit den Tetrahydrochloriden durchgeführt worden (Tabelle 2).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. C. Ainsworth, A. M. Brown & G. Brownlee, *Nature* 160, 263 (1947).
- [2] P. G. Stansly, R. G. Shepherd & H. J. White, *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 87, 43 (1947).
- [3] R. G. Benedict & A. F. Langlykke, *J. Bacteriol.* 54, 24 (1947).
- [4] Symposium 1948, *Ann. New York Acad. Sci.* 51, 855 (1949).
- [5] P. H. Bell, J. F. Bone, J. P. English, C. E. Fellows, K. S. Howard, M. M. Rogers, R. G. Shepherd, R. Winterbottom, A. C. Brombush, S. Kushner & Y. Subbarow, *Ann. New York Acad. Sci.* 51, 897 (1949).
- [6] K. Hayashi, Y. Seketa, K. Tsukamoto & T. Suzuki, *Experientia* 22, 354 (1966).
- [7] S. Wilkinson & L. A. Lowe, *Nature* 204, 185 (1964); T. Suzuki, K. Hayashi, K. Fujikawa & K. Tsukamoto, *J. Biochemistry (Japan)* 57, 226 (1965).
- [8] R. O. Studer, W. Lergier, P. Lanz, E. Böhni & K. Vogler, *Helv.* 48, 1371 (1965).
- [9] K. Fujikawa, Y. Suketa, K. Hayashi & T. Suzuki, *Experientia* 21, 307 (1965).
- [10] R. O. Studer, W. Lergier & K. Vogler, *Helv.* 49, 974 (1966).
- [11] T. Suzuki, K. Hayashi, K. Fujikawa & K. Tsukamoto, *J. Biochemistry (Japan)* 56, 335 (1964).
- [12] K. Vogler, R. O. Studer, P. Lanz, W. Lergier & E. Böhni, *Helv.* 48, 1161 (1965).
- [13] E. Wünsch & G. Fürst, *Z. physiol. Chem.* 329, 109 (1962).
- [14] D. M. Spackman, W. H. Stein & S. Moore, *Analyt. Chemistry* 30, 1190 (1956).
- [15] K. Vogler, R. O. Studer, P. Lanz, W. Lergier, E. Böhni & B. Fust, *Helv.* 46, 2823 (1964).
- [16] R. O. Studer, W. Lergier & K. Vogler, *Helv.* 46, 612 (1963).
- [17] K. Hofmann, R. Schmiechen, R. D. Wells, Y. Wolman & N. Yanaihara, *J. Amer. chem. Soc.* 87, 611 (1965).
- [18] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall, *J. biol. Chemistry* 193, 265 (1951).