

- [25] *A. N. Nesmeyanov, B. G. Dzantiev, V. V. Pozdeev & E. F. Simonov*, Radiokhimiya 4, 116 (1962).  
 [26] *V. V. Pozdeev, A. N. Nesmeyanov & B. G. Dzantiev*, Radiokhimiya 4, 401 (1962).  
 [27] *T. G. Majury & E. W. R. Steacie*, Discuss. Faraday Soc. 14, 45 (1953).  
 [28] *A. S. Gordon & J. R. McNesby*, J. chem. Physics 31, 853 (1959).  
 [29] *A. C. Cope, C. R. Ganellin, H. W. Johnson, T. V. van Auken & H. J. S. Winkler*, J. Amer. chem. Soc. 85, 3276 (1963).  
 [30] *A. C. Cope & B. A. Pawson*, J. Amer. chem. Soc. 87, 3649 (1965).  
 [31] *P. Jordan, E. Büchler & K. May*, zu erscheinen im J. Radioanal. Chem.

## 197. Synthese von [2,7-Cystin]-Gramicidin S, einem künstlichen homodet-heterodet-bicyclischen Decapeptid

von **Urs Ludescher** und **Robert Schwyzler**

Institut für Molekularbiologie und Biophysik,  
Eidg. Technische Hochschule Zürich, 8049 Zürich

(10. VI. 72)

*Summary.* The first synthesis of a homodetic-heterodetic-bicyclic polypeptide, [2,7-cystine]-gramicidin S, is described. For the protection of the C-terminal carboxyl and the cysteine sulfhydryl functions, the 2-(toluene-*p*-sulfonyl)-ethyl- (Tsa) and the acetamidomethyl- (Acm) groups, respectively, were used. Stepwise synthesis from the C-terminus, using N<sup>α</sup> Boc-amino acids, and selective removal of protecting groups yielded the two pentapeptide derivatives: Boc·Val-Cys(Acm)-Leu-phe-Pro·OH and H·Val-Cys(Acm)-Leu-phe-Pro·OTsa. They were condensed with dicyclohexyl-carbodiimide and 1-hydroxybenzotriazole to give the crystalline decapeptide Boc·[Val-Cys(Acm)-Leu-phe-Pro]<sub>2</sub>·OTsa. Removal of the Tsa group by β-elimination at pH 11.5 yielded the crystalline free acid, which was further converted (by treatment with di-*p*-nitrophenyl sulfite followed by TFA) to TFA, H·[Val-Cys(Acm)-Leu-phe-Pro]<sub>2</sub>·ONp. Cyclization of the active ester in warm pyridine gave a mixture of (2,7-bis-S-acetamidomethyl-cysteine)-gramicidin S (27% yield) and (2,7-cysteine)-gramicidin S (4%). The former compound was readily converted to the latter by treatment with I<sub>2</sub> in MeOH. In the bicyclic peptide, the decapeptide ring is contained in a β-type secondary structure, identical with that in gramicidin S; the disulfide bridge shows P-helical chirality and gives rise to a negative Cotton effect at 271 nm [3].

**Einleitung.** – Noch bevor die für Gramicidin S vorgeschlagene β-Faltblattstruktur [1] in Lösung durch NMR.-Studien erhärtet worden war [2] [3], schien es uns sinnvoll zu versuchen, den Cyclodecapeptidring zwischen den Stellungen 2 und 7 (beides Ornithinreste) mit einer Cystin-Disulfidgruppe zu überbrücken. Im [2,7-Cystin]-Gramicidin S<sup>1)</sup> wäre die Sekundärstruktur des Peptidruckgates voraussichtlich im Sinne der β-Faltblattstruktur stabilisiert. Mit dieser Verbindung ergäbe sich daher die Möglichkeit, die physikalisch-chemischen Eigenschaften dieser Sekundärstruktur und die chiroptischen Eigenschaften der Cystin-Disulfidgruppe zu studieren,

<sup>1)</sup> Nomenklatur und Abkürzungen nach den Regeln der «IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature», z. B. Biochemistry 5, 2485 (1966); 6, 362 (1967); European J. Biochemistry 7, 375 (1967). Zusätzliche Abkürzungen: Acm = Acetamidomethyl-; Boc = *t*-Butoxycarbonyl-; DCCI = Dicyclohexyl-carbodiimid; DCHA = Dicyclohexylamin; DMF = Dimethylformamid; HOBT = 1-Hydroxy-benzotriazol; Np = *p*-Nitrophenyl-; phe = *D*-Phenylalanin (γ<sup>1</sup>-); Su- = 1-Succinimidyl-; TFA = Trifluoressigsäure; Tsa = 2-(Toluol-*p*-sulfonyl)-äthyl.

was inzwischen geschehen ist [3] [4]. Ferner könnten ähnliche, stabilisierte homodet-heterodet-bicyclische Peptide mit andern Aminosäuren synthetisiert und zum Studium spezieller Nachbargruppeneffekte, wie sie z. B. zwischen den Seitenketten von Aminosäuren in den mechanistischen Oberflächenbereichen von Enzymen wirksam sein sollen, herangezogen werden.

**Strategie.** – Die Synthese von [2,7-Cystin]-Gramicidin S (Schema) stellt im wesentlichen drei Aufgaben: 1) Aufbau des offenkettigen Decapeptides, 2) Cyclisieren der Peptidkette, 3) Schliessen der intramolekularen Disulfidbrücke.

Analoge Cyclodecapeptide lassen sich auch direkt durch dimerisierende Cyclisierung des Pentapeptid-*p*-nitrophenylesters herstellen [5], doch entsteht dabei immer ein Gemisch von Cyclopenta- und Cyclodecapeptid, dessen Zusammensetzung von der Konzentration der Cyclisierungslösung abhängt [6]. Um eindeutige Resultate zu erzielen, wurde der Weg über das lineare Decapeptid gewählt. Zur Synthese des offenkettigen Decapeptides wurde vorerst das geschützte Pentapeptid VIII stufenweise vom Carbonylende her aufgebaut. Aus diesem Pentapeptidzwischenprodukt wurden, einerseits durch Verseifung der Carboxylschutzgruppe und andererseits durch Abspaltung der Aminoschutzgruppe, die Fragmente für die Kondensation zum geschützten linearen Decapeptid XI gewonnen, das nach Entfernung der Schutzgruppen mit der Nitrophenylester-Methode cyclisiert [7] wurde. Um Racemisierung bei der Fragmentkondensation und bei der Cyclisierung zu vermeiden, wurde als carboxylendständige Aminosäure des Pentapeptides wiederum Prolin gewählt [7]. Die beiden Hauptprobleme der Synthese waren der Schutz der Cystein-Seitenkette und der endständigen Prolin-Carboxylgruppe.

Für die Cystein-Sulphydrylgruppe kamen die bekannten Schutzgruppen Benzyl, Diphenylmethyl und Trityl, sowie die erst kürzlich eingeführte und noch wenig erprobte Acetamidomethylgruppe [8] in Frage. Die Benzylgruppe fiel zum vorneherein aus der Wahl, da sie sich nur unter Inkaufnahme von Nebenreaktionen durch Natrium in flüssigem Ammoniak wieder abspalten lässt. Vorversuche mit der Diphenylmethylgruppe zeigten, dass die Peptidcyclisierung durch diese sterisch ungünstige Schutzgruppe stark erschwert wird; deshalb wurde auf die Verwendung der Diphenylmethyl- und der Tritylgruppe verzichtet. Die Wahl fiel auf die noch wenig erprobte Acetamidomethylgruppe, die sich nach den Angaben von *Veber et al.* [8] durch Quecksilber(II)-Ionen bei pH 4 wieder abspalten lässt. Im Laufe der Synthese erwies sich diese Wahl als glücklich, da bekannt wurde, dass sich S-Acetamidomethylcystein enthaltende Peptide durch Behandlung mit Jod in Methanol direkt in die entsprechenden symmetrischen Cystinpeptide überführen lassen [9].

Für den Schutz der endständigen Prolin-Carboxylgruppe war die Verwendung eines konventionellen Esters, wie zum Beispiel des Methylesters, etwas riskant, da bei der Wiederabspaltung einer solchen Schutzgruppe durch alkalische Hydrolyse die Gefahr einer Racemisierung am Cystein und eventuell sogar eines Angriffes auf die S-Acetamidomethylgruppe bestand (nach den Angaben von *Veber et al.* [8] ist die S-Acetamidomethylgruppe in wässriger Lösung bis etwa pH 13 stabil). Da für die Synthese des Pentapeptides der stufenweise Aufbau mit N<sup>α</sup>-Boc-geschützten Aminosäuren gewählt wurde, kam die Verwendung eines acidolytisch spaltbaren Esters nicht in Frage. An einen Aufbau des Peptides mit ungeschützter endständiger Carbo-

xylgruppe konnte wegen der gewählten Kupplungsmethode nicht gedacht werden. So fiel die Wahl auf die von *Miller & Stirling* [10] beschriebene, aber bis anhin in der Peptidchemie erst an wenigen Modellverbindungen erprobte 2-(Toluol-*p*-sulfonyl)-äthyl-Schutzgruppe, die sich unter relativ milden alkalischen Bedingungen wieder abspalten lässt.

**Taktik der Synthese.** – Zum Schutz der  $\alpha$ -Aminofunktion wurde während der ganzen Synthese der Boc-Rest verwendet, der durch Chlorwasserstoff in Essigester oder durch Trifluoressigsäure unter Bedingungen spaltbar ist, welche die S-Acetamidomethyl- und die 2-(Toluol-*p*-sulfonyl)-äthyl-Gruppe nicht angreifen.

Als Kupplungsmethode für den schrittweisen Aufbau des Pentapeptides VIII wie auch für die Verknüpfung zweier Pentapeptidfragmente zum linearen Decapeptid XI wurde die erst kürzlich von *König & Geiger* [11] ausgearbeitete Kondensation mit Dicyclohexyl-carbodiimid (DCCI) in Gegenwart von 1-Hydroxy-benzotriazol gewählt. Nach den Angaben der Autoren führt die Methode auch in sterisch ungünstigen Fällen in hoher Ausbeute zu auch optisch sehr reinen Peptiden. Der gute Erfolg, den wir von Anfang an verzeichneten, machte die Erprobung anderer Kupplungsmethoden überflüssig.

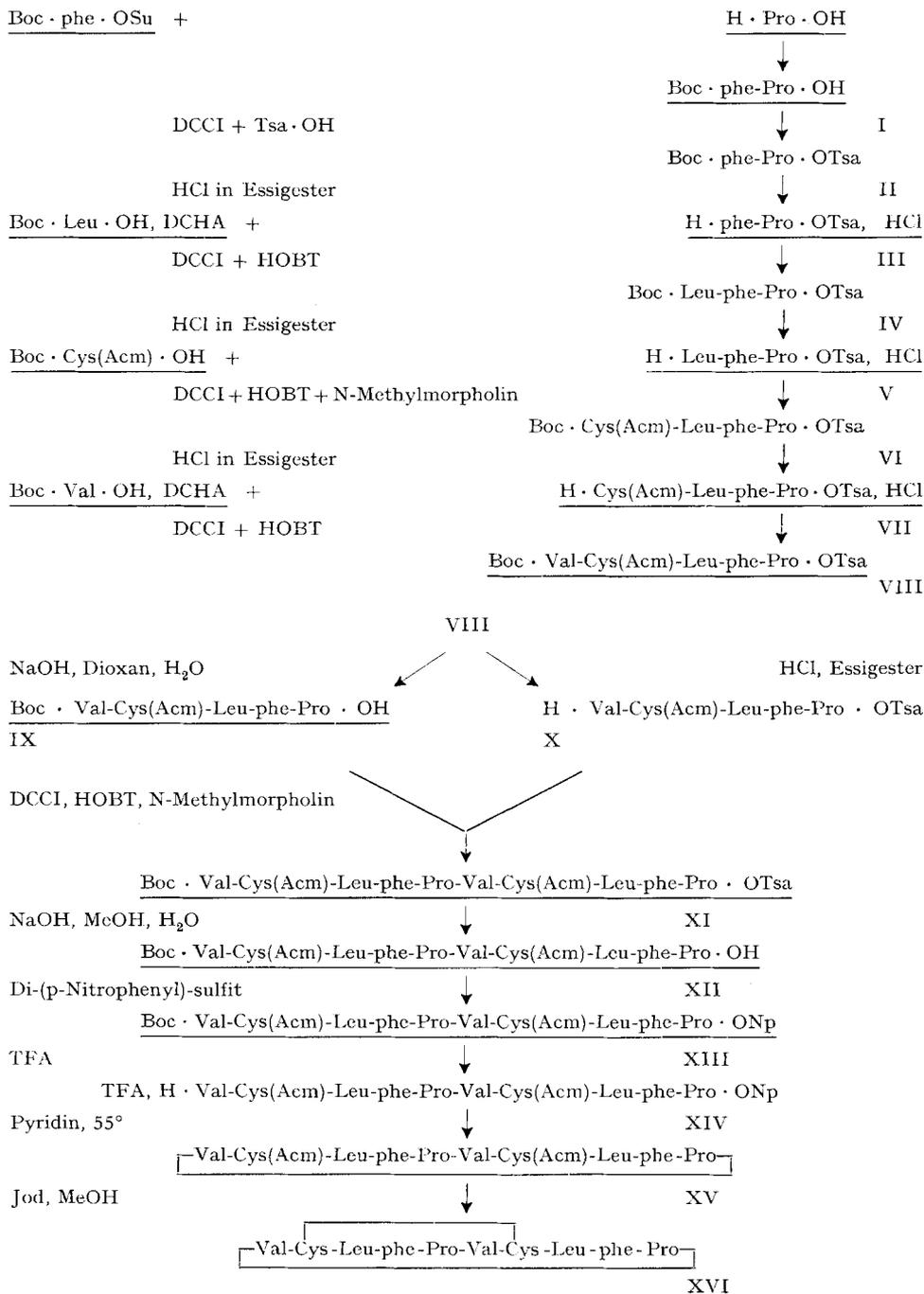
**Verlauf der Synthese.** – (Schema). – Bei der Herstellung des geschützten Dipeptides Boc · phe-Pro · OTSA (II) wurde vom allgemeinen Schema abgewichen und nicht Boc · phe · OH mit H · Pro · OTsa, sondern Boc · phe · OSu mit H · Pro · OH gekuppelt und anschliessend das aminogeschützte Dipeptid verestert. Auf diese Weise liess sich eine Reaktionsstufe einsparen. Der weitere Aufbau bis zum geschützten Pentapeptid VIII verlief glatt, indem jeweils die aminoternale Boc-Schutzgruppe des geschützten Peptides durch Behandlung mit Chlorwasserstoff in Essigester abgespalten und die neue Boc-geschützte Aminosäure mit DCCI unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazol an den Peptidester gekuppelt wurde. Dipeptid, Tripeptid und Tetrapeptid konnten in ihrer geschützten Form nur als Öle isoliert werden. Zur analytischen Charakterisierung der Zwischenprodukte wurden deshalb die kristallinen Peptidester-hydrochloride oder freien Peptidester herangezogen. Das geschützte Pentapeptid VIII liess sich hingegen mühelos kristallisieren.

Aus VIII konnten sehr leicht die beiden Fragmente für die Kondensation zum Decapeptid XI gewonnen werden, einerseits durch Verseifung der Carboxylschutzgruppe und andererseits durch Abspaltung der Aminoschutzgruppe. Die Kondensation der beiden Pentapeptidfragmente zum geschützten Decapeptid XI verlief zufriedenstellend, und das Produkt wurde nach der Reinigung durch Gelfiltrations-Chromatographie in guter Ausbeute isoliert.

Die Carboxylschutzgruppe des Decapeptides XI liess sich unter relativ milden Bedingungen alkalisch verseifen. Reste unverseiften Esters wurden mit Hilfe eines schwach basischen Ionenaustauschers von der freien Säure abgetrennt. Der Umsatz zum aktiven Ester XIII verlief mit *Di*-(*p*-nitrophenyl)-sulfit [12] bedeutend schneller und mit besserer Ausbeute als mit DCCI/*p*-Nitrophenol [13]. Da sich der aktive Ester XIII in Chlorwasserstoff/Essigester nicht löste, wurde die Abspaltung der Aminoschutzgruppe mit Trifluoressigsäure vorgenommen. Das so erhaltene Salz des Decapeptid-*p*-nitrophenylesters XIV wurde in heissem Pyridin nach dem Verdünnungsprinzip cyclisiert [7]. Nach Aufarbeitung und Reinigung des Cyclisierungsproduktes

Schema

(Produkte mit unterstrichener Formel konnten kristallisiert werden)



durch Gelfiltrations-Chromatographie wurden zwei Verbindungen isoliert, die im Dünnschichtchromatogramm verschiedene Laufeigenschaften zeigten und beide mit Ninhydrin-Reagens negativ, mit *Reindel-Hoppe*-Reagens jedoch positiv reagierten. Die weiteren Untersuchungen ergaben, dass das eine dieser Produkte das erwartete [2,7-Bis-S-acetamidomethyl-cystein]-Gramicidin S (XV) war (ca. 87% des isolierten Materials), das andere jedoch schon das oxydierte Endprodukt [2,7-Cystin]-Gramicidin S (XVI) darstellte (ca. 13% des isolierten Materials).

[2,7-Bis-acetamidomethyl-cystein]-Gramicidin S (XV) liess sich auf einfache Weise nach der von *Kamber & Rittel* [14] für S-Tritylcystein enthaltende Peptide beschriebenen Methode in einem Schritt in das bicyclische [2,7-Cystin]-Gramicidin S überführen. Zur Vermeidung der Bildung von Polymeren wurde die Lösung des S-geschützten Cyclodecapeptides langsam in eine methanolische Jodlösung eingetropft. Nach Zerstörung des überschüssigen Jods mit Natriumthiosulfatlösung und Eindampfen des Methanols in der Kälte wurde das Produkt mit Wasser ausgefällt, abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Umkristallisation aus Methanol/Äther ergab ein hochschmelzendes Hydrat in Form von farblosen, feinen Nadeln, das bei der Elementaranalyse nur unter Zusatz von Katalysator vollständig verbrannt werden konnte, und auch nach längerem Trocknen unter drastischen Bedingungen infolge des immer noch zurückgehaltenen Restwassers bei der dampfdruckosmetrischen Molekulargewichtsbestimmung nur ein annähernd richtiges Molekulargewicht lieferte. Das Molekulargewicht und die Sequenz von [2,7-Cystin]-Gramicidin S konnten jedoch durch Massenspektrometrie eindeutig bestätigt werden.

### Experimenteller Teil

*Allgemeines.* Schmelzpunkte wurden auf einem Apparat nach Dr. *Tottoli* (der Firma *Büchi, Flawil*) bestimmt und sind unkorrigiert. Zur Dünnschichtchromatographie verwendete man Silicagel-Fertigplatten F 254 der Firma *Merck*. Drehwerte wurden mit einem photoelektrischen Polariometer der Firma *Zeiss* gemessen. Analysenproben hat man während 4 Std. bei einer Temperatur von 40° und einem Druck von 0,01 Torr getrocknet.

*Boc·phe·Pro·OH (I).* 2,54 g (22 mMol) Prolin und 2,23 g (22 mMol) N-Methylmorpholin wurden in 20 ml Pyridin gelöst. Die Lösung wurde mit 7,24 g (20 mMol) Boc·phe·OSu [15] versetzt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das Pyridin wurde im Vakuum destilliert und der Rückstand bei 0° in einer Mischung von Essigester und 0,1N Schwefelsäure gelöst. Die organische Phase wurde mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Umkristallisation des Rückstandes aus Äther/Petroläther ergab 6,68 g (94%) Boc·phe·Pro·OH, Smp. 179–180°,  $[\alpha]_D^{24} = -55,0^\circ$  ( $c = 1,0$  in Äthanol).

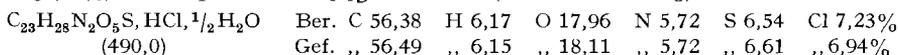
$C_{19}H_{26}N_2O_5$  (362,4) Ber. C 62,97 H 7,23 N 7,73% Gef. C 63,13 H 7,10 N 7,57%

*2-(Toluol-*p*-sulfonyl-äthanol* [16]. 35,43 g (0,2 Mol) Toluol-4-sulfinsäure-natriumsalz und 48,30 g (0,6 Mol) 2-Chloräthanol wurden in 300 ml DMF während 48 Std. bei 90° gehalten. Die Lösung wurde im Hochvakuum bei 40° eingedampft. Der Rückstand wurde in 500 ml Methylenechlorid aufgenommen und Unlösliches abfiltriert. Die Methylenechloridlösung wurde mit zwei kleinen Portionen Wasser (das Produkt ist wasserlöslich!) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde mit Diisopropyläther überschichtet und zur Kristallisation in den Kühlschrank gestellt. Umkristallisieren aus Butylacetat ergab 16,9 g (42%) 2-(Toluol-*p*-sulfonyl)-äthanol, Smp. 53–55°.

*HCl, H·phe·Pro·OTsa (III).* 9,06 g (25 mMol) I und 5,60 g (28 mMol) 2-(Toluol-*p*-sulfonyl)-äthanol wurden in 40 ml absolutem Pyridin gelöst. Die Lösung wurde auf 0° abgekühlt, unter Rühren mit 5,77 g (28 mMol) DCCI in 10 ml Pyridin versetzt und 4 Std. bei 0° sowie 36 Std. bei Zimmertemp. weitergerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und das Pyridin im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen und bei 0°

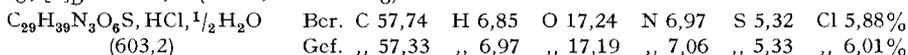
je dreimal mit 0,1 N Schwefelsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat- und Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Verdampfen des Essigesters im Vakuum blieb ein farbloses Öl zurück, das nicht kristallisierte. Dünnschichtchromatographie auf Silicagel mit Aceton/Chloroform 7:3 ergab, mit Jod-Dampf oder Trifluoressigsäure/Ninhydrin entwickelt, einen einzigen Fleck.

Das ölige *Dipeptid II* wurde mit 120 ml ca. 2,5 N Chlorwasserstoff in Essigester versetzt. Nach 20 Min. wurde die Lösung in der Kälte im Vakuum auf das halbe Volumen eingengt und mit 300 ml abs. Äther versetzt. Das ausgefallene Hydrochlorid wurde abfiltriert, mit Äther gewaschen und über Natriumhydroxid im Vakuum getrocknet. Umkristallisation aus Isopropylalkohol ergab 10,10 g (82%) III, Smp. 152–153°,  $[\alpha]_D^{24} = -106,0^\circ$  ( $c = 1,0$  in Eisessig).



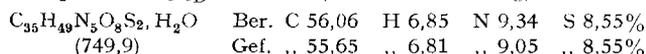
*HCl, H·Leu-phe-Pro·OTsa (V)*. 980 mg (2 mMol) III und 825 mg (2 mMol) Boc·Leu·OH, DCHA wurden unter Zusatz von 541 mg (4 mMol) 1-Hydroxy-benzotriazol [11] in 15 ml DMF gelöst. Das Reaktionsgemisch wurde auf  $-10^\circ$  abgekühlt, mit einer Lösung von 515 mg (2,5 mMol) DCCI in 5 ml DMF versetzt, 4 Std. bei  $-10^\circ$  und 48 Std. bei Zimmertemp. gerührt. Die Lösung wurde durch Filtration vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff und Dicyclohexylammoniumchlorid befreit und im Hochvakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in Essigester gelöst und bei  $0^\circ$  je dreimal mit 0,1 N Schwefelsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat- und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Verdampfen des Essigesters im Vakuum blieb ein farbloses Öl zurück, das nicht kristallisierte. Dünnschichtchromatographie auf Silicagel mit Aceton/Chloroform 7:3 ergab nach Entwicklung mit Jod-Dampf oder Trifluoressigsäure/Ninhydrin einen einzigen Fleck.

Das ölige *Tripeptid IV* wurde mit 4 ml ca. 2,5 N Chlorwasserstoff in Essigester versetzt. Nach 20 Min. wurde das Hydrochlorid mit 50 ml abs. Äther ausgefällt, abfiltriert, mit Äther gewaschen und über Natriumhydroxid im Vakuum getrocknet. Umfällen aus Chloroform/Diisopropyläther ergab 765 mg (63%) V, Smp. 96–97°, das direkt in der nächsten Stufe weiterverwendet wurde. Dünnschichtchromatographie auf Silicagel mit *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 100:15:35 ergab nach Entwicklung mit Jod-Dampf oder Ninhydrin einen einzigen Fleck. Für die analytische Charakterisierung wurde eine Probe aus Essigester/Äther umkristallisiert, wobei der Smp. auf 101–102° stieg;  $[\alpha]_D^{25} = -27,5^\circ$  ( $c = 1,0$  in Eisessig).

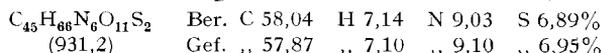


*HCl, H·Cys(Acm)-Leu-phe-Pro·OTsa (VII)*. 4,51 g (7,5 mMol) V wurden in 20 ml DMF gelöst und mit 0,76 g (7,5 mMol) N-Methylmorpholin versetzt. Nach Zugabe von 2,19 g (7,5 mMol) Boc·Cys(Acm)·OH [8] und 1,62 g (12 mMol) 1-Hydroxy-benzotriazol wurde das Reaktionsgemisch auf  $-10^\circ$  abgekühlt, mit einer Lösung von 1,70 g (8,25 mMol) DCCI in 5 ml DMF versetzt und 4 Std. bei  $-10^\circ$ , dann 48 Std. bei Zimmertemp. gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Hochvakuum verdampft. Der Rückstand wurde in Essigester gelöst und bei  $0^\circ$  je dreimal mit 0,1 N Schwefelsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat- und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Verdampfen des Essigesters im Vakuum blieb ein farbloses Öl zurück, das nicht kristallisierte. Dünnschichtchromatographie auf Silicagel mit Aceton/Chloroform 7:3 ergab nach Entwicklung mit Jod-Dampf oder Trifluoressigsäure/Ninhydrin einen einzigen Fleck.

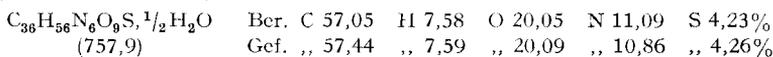
Das ölige *Tetrapeptid VI* wurde in 20 ml ca. 2,5 N Chlorwasserstoff in Essigester gelöst. Nach 20 Min. wurde das Hydrochlorid mit 200 ml abs. Äther ausgefällt, abfiltriert, mit Äther gewaschen und über Natriumhydroxid im Vakuum getrocknet. Umfällen aus Chloroform/Diisopropyläther ergab 5,21 g (89%) VII, Smp. 116–117°, das im Dünnschichtchromatogramm auf Silicagel mit *n*-Butanol/Eisessig/Wasser 100:15:35 nach Entwicklung mit Jod-Dampf oder Ninhydrin noch Spuren einer Verunreinigung zeigte. Dieses Produkt wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt. Eine Probe des Hydrochlorids wurde mit einem kleinen Überschuss von 3proz. Ammoniak in Chloroform behandelt und der freie Tetrapeptidester aus Äthanol/Diisopropyläther umkristallisiert: Smp. 75–76°,  $[\alpha]_D^{25} = -26,4^\circ$  ( $c = 1,04$  in Eisessig).



*Boc·Val-Cys(Acm)-Leu-phe-Pro·OTsa (VIII)*. 4,61 g (6 mMol) VII und 2,40 g (6 mMol) Boc·Val·OH, DCHA wurden in 50 ml DMF gelöst. Nach Zugabe von 1,35 g (10 mMol) 1-Hydroxy-benzotriazol wurde das Reaktionsgemisch auf  $-10^{\circ}$  gekühlt, mit einer Lösung von 1,45 g (7 mMol) DCCI in 10 ml DMF versetzt, 2 Std. bei  $-10^{\circ}$  und 48 Std. bei Zimmertemp. gerührt. Die Lösung wurde durch Filtration vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff und Dicyclohexylammoniumchlorid befreit und im Hochvakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in Essigester aufgenommen und bei  $0^{\circ}$  je dreimal mit 0,1N Schwefelsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat- und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde der Essigester im Vakuum verdampft. Umkristallisation des Rückstandes aus Methanol/Diisopropyläther ergab 5,18 g (93%) VIII, Smp. 122–123°,  $[\alpha]_D^{25} = -39,0^{\circ}$  ( $c = 1,00$  in Äthanol).

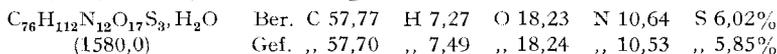


*Boc·Val-Cys(Acm)-Leu-phe-Pro·OH (IX)*. 931 mg (1 mMol) VIII wurden in 9 ml Dioxan und 6 ml Wasser gelöst und mit Hilfe eines Autotitrators beim konstanten pH-Wert von 11,5 während 1 Std. durch Zugabe von 0,2N Natronlauge verseift. Die Lösung wurde zur Entfernung unreaktierten Esters mit Äther extrahiert, bei  $0^{\circ}$  mit 1N Schwefelsäure bis pH 2 angesäuert und mit drei Portionen Essigester ausgezogen. Der Essigester wurde zweimal mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum verdampft. Umkristallisation des Rückstandes aus Äthanol/Wasser ergab 596 mg (79%) IX, Smp. 138–139° (Zers.),  $[\alpha]_D^{20} = -48,7^{\circ}$  ( $c = 1,01$  in Äthanol).

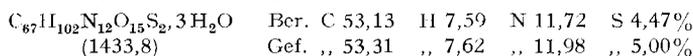


*HCl·H·Val-Cys(Acm)-Leu-phe-Pro·OTsa (X)*. 931 mg (1 mMol) VIII wurden in 4 ml abs. Essigester gelöst und mit 5 ml ca. 2,5N Chlorwasserstoff in Essigester versetzt. Nach 30 Min. wurde das Hydrochlorid mit 50 ml abs. Äther ausgefällt, abfiltriert, mit Äther gewaschen und über Natriumhydroxid im Vakuum getrocknet: 841 mg (97%).

*Boc·[Val-Cys(Acm)-Leu-phe-Pro]<sub>2</sub>·OTsa (XI)*. 758 mg (1 mMol) IX, 868 mg (1 mMol) X, 101 mg (1 mMol) N-Methylmorpholin und 270 mg (2 mMol) 1-Hydroxy-benzotriazol wurden in 10 ml DMF gelöst. Die Lösung wurde auf  $-10^{\circ}$  gekühlt, mit einer Lösung von 247 mg (1,2 mMol) DCCI in 2 ml DMF versetzt, 2 Std. bei  $-10^{\circ}$  und 48 Std. bei Zimmertemp. gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert und das Lösungsmittel im Hochvakuum verdampft. Der Rückstand wurde in Essigester gelöst und bei  $0^{\circ}$  je dreimal mit 0,1N Schwefelsäure, ges. Natriumhydrogencarbonat- und ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wurde der Essigester im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde im kleinstmöglichen Volumen DMF gelöst und an einer Sephadex-LH-20-Säule (2,5 × 100 cm) mit DMF als Elutionsmittel durch Gelfiltration gereinigt. Umkristallisation aus Methanol/Diisopropyläther ergab 1,07 g (67%) XI, Smp. 150–151°,  $[\alpha]_D^{25} = -107,5^{\circ}$  ( $c = 1,00$  in Äthanol).



*Boc·[Val-Cys(Acm)-Leu-phe-Pro]<sub>2</sub>·OH (XII)*. 790 mg (0,5 mMol) XI wurden in 10 ml Methanol und 5 ml Wasser gelöst und mit Hilfe eines Autotitrators beim konstanten pH-Wert von 11,5 während 40 Min. durch Zugabe von 0,1N Natronlauge verseift. Das Methanol wurde in der Kälte im Vakuum abdestilliert, die wässrige Lösung bei  $0^{\circ}$  vorsichtig mit 1N Schwefelsäure bis pH 2 angesäuert und mit drei Portionen Essigester ausgezogen. Der Essigester wurde zweimal mit ges. Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum verdampft. Der Rückstand, der noch unverseiften Ester enthielt, wurde in möglichst wenig 70proz. wässrigerem Methanol gelöst und auf eine kleine Säule (0,8 × 30 cm) mit schwach basischem Ionenaustauscher DEAE-Sephadex A 25 (5 g, Acetatform) aufgetragen. Der unverseifte Ester wurde mit 70proz. wässrigem Methanol eluiert. Anschliessend wurde das verseifte Produkt mit 70proz. wässrigem Methanol unter Zusatz von 10% Eisessig eluiert. Das Eluat wurde in der Kälte im Vakuum vom Methanol befreit und lyophilisiert. Umkristallisation des Lyophilisates aus Methanol/Äther ergab 554 mg (75%) XII, Smp. 160–162° (Zers.), Sintern bei 140°.



*Boc*·[*Val-Cys(Acm)-Leu-phe-Pro*]<sub>2</sub>·*ONp* (XIII). 717 mg (0,5 mMol) XII wurden in 5 ml Pyridin gelöst, mit 811 mg (2,5 mMol) Di-(*p*-nitrophenyl)-sulfid [12] versetzt und 24 Std. bei Zimmertemp. stehengelassen. Das Pyridin wurde bei 30° im Hochvakuum verdampft, der Rückstand in Essigester gelöst, bei 0° je dreimal mit 0,1*N* Schwefelsäure und ges. Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Der Essigester wurde im Vakuum verdampft und der Rückstand mehrmals mit Äther/Petroläther 1:1 verrieben, bis 639 mg (80%) fast farblose, feste Substanz zurückblieben. Dünnschichtchromatographie auf Silicagel mit Chloroform/Methanol 6:1 ergab nach Entwicklung mit Jod-Dampf oder Trifluoressigsäure/Ninhydrin einen einzigen Fleck. Eine Probe wurde für die Elementaranalyse aus Essigester/Diisopropyläther umkristallisiert: Smp. 148–149°.

$C_{73}H_{105}N_{13}O_{17}S_2, 5H_2O$	Ber. C 55,11	H 7,29	N 11,45	S 4,03%
(1590,9)	Gef. ,, 54,88	,, 6,83	,, 11,50	,, 4,53%

*TFA, H*·[*Val-Cys(Acm)-Leu-phe-Pro*]<sub>2</sub>·*ONp* (XIV). 639 mg (0,4 mMol) XIII wurden in 10 ml Trifluoressigsäure gelöst und während einer Stunde bei Zimmertemp. stehengelassen. Die Lösung wurde in der Kälte im Vakuum auf etwa das halbe Volumen eingeeengt und mit 50 ml abs. Äther versetzt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert, mit Äther gewaschen und im Vakuum über Natriumhydroxid getrocknet: 565 mg (92%).

*Cyclo-[Val-Cys(Acm)-Leu-phe-Pro]*<sub>2</sub>, [2,7-Bis-*S*-acetamidomethyl-cystein]-Gramicidin *S* (XV). 565 mg (0,37 mMol) XIV wurden in 40 ml absolutem DMF unter Zugabe von 10 Tropfen Eisessig gelöst und während 6 Std. unter Rühren in 300 ml abs. Pyridin bei 55° eingetropf. Die Lösung wurde über Nacht bei 55° gerührt, das Lösungsmittel im Hochvakuum verdampft und der Rückstand in 300 ml Chloroform gelöst. Das bei der Cyclisierung entstandene *p*-Nitrophenol wurde mit ges. Natriumhydrogencarbonatlösung ausgewaschen. Die Chloroformlösung wurde je dreimal mit 0,1*N* Schwefelsäure und ges. Natriumchloridlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde im kleinstmöglichen Volumen Äthanol gelöst und an einer Sephadex-LH-20-Säule (2,5 × 100 cm) mit Äthanol als Elutionsmittel durch Gelfiltration gereinigt. Es wurden zwei verschiedene ninhydrin-negative und *Reindel-Hoppe*-positive Produkte isoliert, die beide aus Methanol/Äther umkristallisiert werden konnten.

Erstes Produkt: 128 mg (27%) XV, Smp. 181–182°.

$C_{62}H_{92}N_{14}O_{15}S_2, 2H_2O$	Ber. C 57,39	H 7,46	N 12,95%
(1297,7)	Gef. ,, 57,21	,, 7,23	,, 12,66%

Die Elementaranalyse bereitete Schwierigkeiten, da sich das Produkt nur unter Katalysatorzusatz vollständig verbrennen liess. Aminosäurenanalyse (Hydrolyse 48 Std., 110°, 12*N* HCl/Eisessig 1:1): 1/2 (Cys)<sub>2</sub> 0,77, Leu 1,02, Phe 0,93, Pro (Bezugswert) 1,00, Val 1,05.

Das zweite Produkt (18,5 mg; 4%) war identisch mit [2,7-Cystin]-Gramicidin *S*.

[2,7-Cystin]-Gramicidin *S* (XVI). 60 mg (0,046 mMol) XV wurden in 8 ml Methanol gelöst und während 2 Std. unter Rühren in eine Lösung von 120 mg (0,46 mMol) Jod in 20 ml Methanol eingetropf. Nach 5 Std. bei Zimmertemp. wurde das Reaktionsgemisch auf 0° abgekühlt und durch vorsichtiges Zutropfen von 1*N* Natriumthiosulfatlösung entfärbt. Das Methanol wurde in der Kälte im Vakuum bis zur beginnenden Trübung der Lösung abgesogen und das Peptid durch Zugabe eines Überschusses von Wasser ausgefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und mehrmals aus Methanol/Äther umkristallisiert, 34 mg (65%) farblose, feine Nadeln, Smp. 325° (Zers.),  $[\alpha]_D^{25} = -227^\circ$  ( $c = 0,81$  in Methanol).

$C_{56}H_{80}N_{10}O_{10}S_2, H_2O$	Ber. C 59,24	H 7,28	N 12,34	S 5,65%
(1135,5)	Gef. ,, 58,85	,, 7,06	,, 11,90	,, 6,00%

Die Elementaranalyse bereitete Schwierigkeiten, da sich das Produkt nur unter Katalysatorzusatz vollständig verbrennen liess. Aminosäurenanalyse (Hydrolyse 48 Std., 110°, 12*N* HCl/Eisessig 1:1): 1/2 (Cys)<sub>2</sub> 0,79, Leu 1,00, Phe 0,99, Pro (Bezugswert) 1,00, Val 1,02.

Auch die Molekulargewichtsbestimmung (dampfdruckosmetrisch in Methanol) bereitete Mühe, da sich das im Peptid gebundene Wasser auch durch längeres Trocknen über Phosphor-pentoxid bei höherer Temperatur im Hochvakuum nicht vollständig entfernen liess. In Abhängigkeit der Trocknungszeit und -temperatur erhielt man folgende Werte für das Molekulargewicht:

Trocknungszeit	Temperatur	Druck	Molekulargewicht
4 h	40°	0,01 Torr	798 ± 5
12 h	40°	0,01 Torr	946 ± 5
48 h	60°	0,01 Torr	1037 ± 10
Berechnetes Molekulargewicht			1117,5

Molekulargewicht und die Sequenz wurden durch Massenspektrometrie bestätigt, wobei folgende charakteristische Signale erhalten wurden:  $M = 1116$ ;  $M - HS = 1083$ ;  $M - HSSH = 1050$ ;  $M - HSSH - C_3H_7 = 1007$ ;  $M - HSSH - C_3H_7 - Phe - Pro = 763$ .

Folgenden Damen und Herren sind wir für ihre Hilfe zu Dank verpflichtet: Prof. G. W. Kenner und Dr. R. Johnstone (University of Liverpool) für die Massenspektren; Dr. W. Padowetz (CIBA-GEIGY AG, Basel) und W. Manser (Org.-chem. Mikrolabor ETH) für die Mikroanalysen; Fräulein H. Schneider für die Aminosäureanalysen; C. Züst (Laboratorien für Organische Chemie ETH) für die Molekulargewichtsbestimmungen.

Finanzielle Unterstützung verdanken wir der Eidgenössischen Stiftung zur Förderung der schweizerischen Volkswirtschaft durch wissenschaftliche Forschung und dem Schweiz. Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (Gesuche No. 4883 und 3.374.70).

#### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] D. C. Hodgkin & B. M. Oughton, *Biochem. J.* **65**, 752 (1957); R. Schwyzer, *Chimia* **12**, 53 (1958); Ciba Found. Symp. Amino Acids Peptides Antimetab. Activity 1958, 171; Record chem. Progr. (Kresge-Hooker Sci. Lib.) **20**, 147 (1959).
- [2] R. Schwyzer & U. Ludescher, *Biochemistry* **7**, 2519 (1968); A. Stern, W. A. Gibbons & L. C. Craig, *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.* **67**, 734 (1968).
- [3] U. Ludescher, Dissertation No. 4697, ETH-Zürich 1971.
- [4] U. Ludescher & R. Schwyzer, *Helv.* **54**, 1637 (1971).
- [5] R. Schwyzer & P. Sieber, *Helv.* **41**, 2186 (1958); **43**, 1910 (1960).
- [6] M. Waki & N. Izumiya, *J. Amer. chem. Soc.* **89**, 1278 (1967).
- [7] R. Schwyzer & P. Sieber, *Chimia* **10**, 265 (1956); *Angew. Chem.* **68**, 518 (1956); *Helv.* **40**, 624 (1957); R. Schwyzer, B. Iselin, W. Rittel & P. Sieber, *Helv.* **39**, 872 (1956).
- [8] D. F. Veber, J. D. Milkowski, R. G. Denkewalter & R. Hirschmann, *Tetrahedron Letters* **1968**, 3057.
- [9] B. Kamber, *Helv.* **54**, 927 (1971), und vorzeitige pers. Mitt.
- [10] A. W. Miller & C. J. M. Stirling, *J. chem. Soc. (C)* **1968**, 2612.
- [11] W. König & R. Geiger, *Chem. Ber.* **103**, 788 (1970).
- [12] B. Iselin, W. Rittel, P. Sieber & R. Schwyzer, *Helv.* **40**, 373 (1957).
- [13] D. F. Elliott & D. W. Russell, *Biochem. J.* **66**, 49P (1957); M. Rothe & F. W. Kunitz, *Liebigs Ann. Chem.* **609**, 88 (1957); M. Bodanszky & V. du Vigneaud, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 5688 (1959).
- [14] B. Kamber & W. Rittel, *Helv.* **51**, 2061 (1968).
- [15] G. W. Anderson, J. E. Zimmermann & F. M. Callahan, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 1839 (1964).
- [16] A. T. Kader & C. J. M. Stirling, *J. chem. Soc.* **1964**, 258.