

Peptide. VI

## Synthese eines Pentapeptids mit modifizierter potentieller Circulin B-Sequenz<sup>1)</sup>

Von H. AROLD und O. BARTH<sup>2)</sup>

Mit 1 Abbildung

### Inhaltsübersicht

Es wird die Synthese des vollständig geschützten Pentapeptids BOC—Orn(Z)—D—Leu—Ile—Orn(Z)—Orn(Z)—OMe beschrieben. Der Aufbau gelingt vorteilhaft durch stufenweise Synthese vom Carboxylende her unter Benutzung der Carbodiimid-, gemischten Anhydrid und Nitrophenylester-Methode.

---

Im Zusammenhang mit unseren Arbeiten zur Synthese des Circulins B schien es nützlich, auch analoge Sequenzen darzustellen, die an Stelle der in den Antibiotika der Polymyxin-Gruppe stets vorhandenen L- $\alpha$ , $\gamma$ -Diaminobuttersäure deren Homologes, das Ornithin enthalten. Da Ornithin als Baustein der Peptidantibiotika Gramacidin S, J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, den Tyrocidinen A und B, sowie den Bacitracinen vorkommt, sollte auch in den Circulinen der Ersatz der  $\alpha$ , $\gamma$ -Diaminobuttersäure durch Ornithin zu möglicherweise antibiotisch wirkenden Substanzen führen.

In einer früheren Arbeit<sup>3)</sup> konnten wir zeigen, daß die von KOFFLER<sup>4)</sup> für das Circulin B angegebene Struktur als cyclisches Dekapeptid offenbar nicht der wirklichen Struktur entspricht. Das synthetische Produkt mit diesem Aufbau erwies sich als biologisch vollständig inaktiv.

---

<sup>1)</sup> Mitt. I—V: J. prakt. Chem. [4], **21**, 27 (1963); *ibid.* **21**, 53 (1963); *ibid.* **21**, 59 (1963); Acta Chim. Acad. Sci. Hung. **44**, 155 (1965); Z. Chemie **6**, 316 (1966).

<sup>2)</sup> Diplomarbeit O. BARTH, Jena 1965.

<sup>3)</sup> Z. Chemie **6**, 316 (1966).

<sup>4)</sup> H. KOFFLER, Science [Washington] **130**, 1419 (1959).

Durch neuere analytische Untersuchungen<sup>5)</sup> sowohl als auch durch die synthetischen Arbeiten von VOGLER<sup>6)</sup> scheint es erwiesen, daß alle Antibiotika der Polymyxin-Gruppe einem einheitlichen Bauprinzip gehorchen. Danach handelt es sich bei ihnen um „sigmoide“ Dekapeptide, deren Ringanteil aus sieben Aminosäuren gebildet wird (Abb. 1). Die Ringverknüpfung erfolgt über die  $\gamma$ -Aminogruppe der  $\alpha,\gamma$ -Diaminobuttersäure in Stellung 1, über deren  $\alpha$ -Aminogruppe das lineare Tripeptid (1'–3') gebunden ist. Die  $\alpha$ -Aminogruppe des endständigen  $\alpha,\gamma$ -Diaminobuttersäurerestes trägt den Acylrest der Fettsäure.

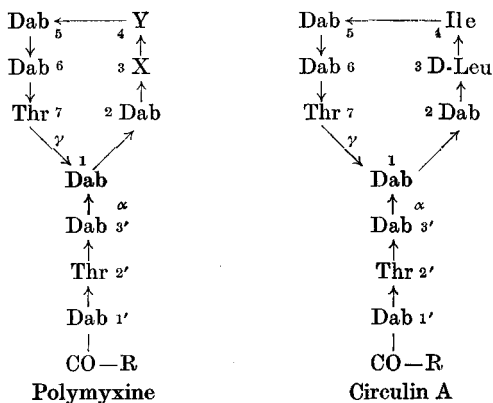
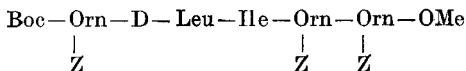


Abb. 1

Die einzelnen bisher bekannten Vertreter dieser Gruppe unterscheiden sich lediglich durch die verschiedenen Aminosäuren X und Y, sowie durch die verschiedenen Acylreste, die an die endständige Dab gebunden erscheinen. Für das Circulin A konnte diese Struktur durch Synthese bewiesen werden. Die Strukturaufklärung und der Konstitutionsbeweis steht indes für das Circulin B noch aus.

Im folgenden wird über die Synthese des vollständig geschützten Pentapeptids.



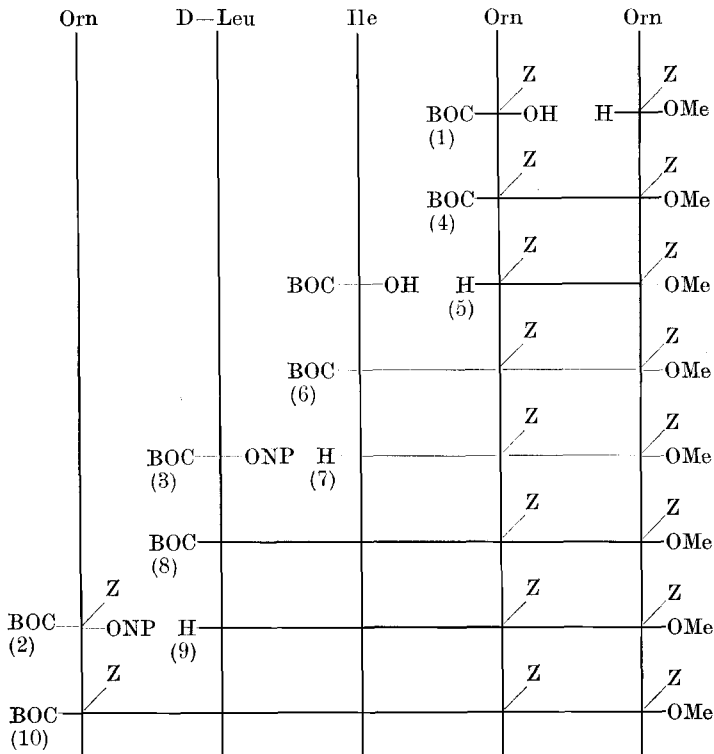
berichtet, wie es der Sequenz 2–6 des cyclischen Anteils der Circuline entspricht. Die  $\alpha,\gamma$ -Diaminobuttersäure ist dabei durch das Ornithin ersetzt worden.

<sup>5)</sup> K. FUJIKAWA, Y. SUKETA, K. HAYASHI u. T. SUZUKI, *Experientia* [Basel] **21**, 307 (1965); T. SUZUKI, K. HAYASHI, K. FUJIKAWA u. K. TSUKAMOTO, *J. Biochem.* [Tokyo] **56**, 335 (1964); S. WILKINSON u. L. A. LOWE, *Nature* [London] **202**, 974 (1964).

<sup>6)</sup> K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER u. E. BÖHNI, *Helv. chim. Acta* **48**, 1161 (1965); R. O. STUDER, W. LERGIER, P. LANZ, E. BÖHNI u. K. VOGLER, *ibid.* **48**, 1372 (1965); R. O. STUDER, W. LERGIER u. K. VOGLER, *ibid.* **49**, 974 (1966).

Der Ablauf der Synthese ist aus dem Schema 1 ersichtlich. Als günstige Schutzgruppenkombination erweist sich die Benutzung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe für die  $\delta$ -Aminogruppe des Ornithins in Verbindung mit der tert.-Butyloxycarbonyl-Gruppe für alle  $\alpha$ -Aminogruppen. Das dazu notwendige  $N^\alpha$ -BOC- $N^\delta$ -Z-Ornithin (1) ist aus  $N^\delta$ -Z-Ornithin<sup>7-11</sup>) und BOC-Azid<sup>12</sup>) als öliges, aber chromatographisch reines Produkt in ausgezeichneter Ausbeute leicht zugänglich. Diese Verbindung kann als kristalliner p-Nitrophenylester (2) gut charakterisiert werden. Durch Reaktion von 1 mit  $N^\delta$ -Z-Ornithinmethylester<sup>7)9</sup>) mittels DCCI entsteht das kristalline Di-peptid BOC-Orn(Z)-Orn(Z)-OMe (4). Daraus wird mit 1,5 N HCl in Methanol die BOC-Gruppe abgespalten und 5 in Form seines Hydrochlorids

Schema 1



7) R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.* **42**, 99 (1948).

8) B. C. BARRAS u. D. T. ELMORE, *J. chem. Soc.* **1957**, 3134.

9) J. T. HARRIS u. T. S. WORK, *Biochem. J.* **46**, 592 (1950)

10) N. IZUMIYA, H. UCHIO u. T. KAMATA, *Bull. Chem. Soc. Japan* **33**, 66 (1960).

11) J. NOGUCHI, T. HAYAKAWA u. M. HIRAOKA, *Nippon Kagaku Zasshi* **82**, 604 (1961).

12) R. SCHWYZER, P. SIEBER u. H. KAPPELER, *Helv. chim. Acta* **42**, 2622 (1959).

erhalten. Dieses wird mit dem aus BOC—Ile<sup>14</sup>) und Chlorkohlensäureisobutylester hergestellten gemischten Anhydrid zum kristallinen Tripeptid BOC—Ile—Orn(Z)—Orn(Z)—OMe (6) umgesetzt. Die BOC-Gruppe wird daraus durch Behandlung mit Trifluoressigsäure entfernt, das gebildete Trifluoracetat durch Verrühren mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung in die freie Base 7 übergeführt und diese mit BOC—D—Leu—ONP (3) zum Tetrapeptid BOC—D—Leu—Ile—Orn(Z)—Orn(Z)—OMe (8) umgesetzt. Nach Abspaltung der BOC-Gruppe mit Trifluoressigsäure wird aus 9 und BOC—Orn(Z)—ONP (2) das geschützte Pentapeptid BOC—Orn(Z)—D—Leu—Ile—Orn(Z)—Orn(Z)—OMe (10) als kristalline Verbindung erhalten. Nach Abspaltung der BOC-Gruppe erweist es sich als chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich.

### Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte sind in der offenen Kapillare bestimmt und nicht korrigiert. Die angegebenen Werte für die spezifische Drehung sind in einem visuellen Polarimeter ermittelt und mit einem Fehler von  $\pm 1,5^\circ$  behaftet. Die Reinheitsprüfung der Substanzen erfolgte dünnschichtchromatographisch an Kieselgel G (Merck) in mehreren Laufmitteln sowie papierelektrophoretisch bei pH 2,4 und 20 Volt/cm.

#### N<sup>α</sup>-tert.-Butyloxycarbonyl-N<sup>δ</sup>-benzyloxycarbonyl-L-ornithin (1)

16,6 g (62,3 mMol) N<sup>δ</sup>-Z—Ornithin werden in 125 ml Dioxan und 62,5 ml 1 N NaOH suspendiert, die Lösung von 18 g (125 mMol) tert.-Butyloxycarbonylazid in 25 ml Dioxan zugegeben und unter Rühren bei 45° langsam 125 ml 1 N NaOH zugetropft. Es wird noch 42 Stunden bei dieser Temperatur weitergerührt. Danach wird nach Zugabe von 125 ml Wasser dreimal mit Essigester extrahiert. Die wäßrige Phase wird auf 0° abgekühlt, mit fester Zitronensäure auf pH 3 angesäuert und mit vorgekühltem Essigester dreimal extrahiert. Der Extrakt wird mit gesätt. Kochsalzlösung neutral gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum bei 25° abgedampft. Das BOC—Orn(Z) hinterbleibt als schwach gelber Sirup. Ausbeute 22,1 g (97% d. Th.).

#### N<sup>α</sup>-tert. Butyloxycarbonyl-N<sup>δ</sup>-benzyloxycarbonyl-L-ornithin-p-nitrophenylester (2)

6,0 g (16,4 mMol) BOC—Orn(Z) und 2,78 g (20 mMol) p-Nitrophenol werden in 30 ml Essigester gelöst, auf -5° abgekühlt und 3,38 g (16,4 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) in wenig Essigester gelöst zugegeben. Man hält 2 Stunden bei dieser Temperatur und läßt über Nacht im Eisschrank bei 3—5° stehen. Danach wird vom Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, mit Essigester nachgewaschen und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wird aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 5,8 g (72,5%); Schmp. 109—110°.  $[\alpha]_D = -19,5^\circ$  (c = 2; DMF).

C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub> (487,5) ber.: C 59,13; H 5,99; N 8,62;  
gef.: C 59,38; H 6,31; N 8,62.

<sup>13</sup>) G. HILLMANN, Z. Naturforsch. **1**, 682 (1946).

<sup>14</sup>) A. W. ANDERSON u. A. C. MCGREGOR, J. Amer. chem. Soc. **79**, 6180 (1957).

**tert.-Butyloxycarbonyl-D-leucin-p-nitrophenylester (3)**

6,0 g (26 mMol) BOC—D—Leu<sup>12</sup>) werden zusammen mit 4,3 g (31 mMol) p-Nitrophenol in 40 ml Essigester gelöst, bei  $-5^{\circ}$  5,35 g (26 mMol) DCCI in wenig Essigester gelöst zugegeben und die Mischung über Nacht im Eisschrank belassen. Vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff wird abgesaugt, mit Essigester nachgewaschen und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird aus Äthanol/Wasser umkristallisiert. Ausbeute 6,3 g (68,8%). Schmp.  $93-94^{\circ}$ .

$C_{17}H_{24}N_2O_6$  (352,4) ber.: C 75,94; H 6,87; N 7,95;  
gef.: C 76,30; H 6,99; N 8,07.

**N<sup>α</sup>-tert.-Butyloxycarbonyl-N<sup>δ</sup>-benzyloxycarbonyl-L-ornithyl-N<sup>δ</sup>-benzyloxycarbonyl-L-ornithinmethylester (4)**

Aus 6,33 g (20 mMol) Orn(Z)—OMe · HCl wird nach HILLMANN<sup>13</sup>) der freie Ester hergestellt. Dieser wird in 15 ml Tetrahydrofuran gelöst, die Lösung von 7,32 g (20 mMol) BOC—Orn(Z) (1) in 25 ml Tetrahydrofuran zugegeben, die Mischung auf  $-10^{\circ}$  abgekühlt und die vorgekühlte Lösung von 4,12 g (20 mMol) DCCI in 15 ml Tetrahydrofuran zugegeben. Man hält 2 Stunden bei dieser Temperatur und anschließend 40 Stunden bei  $5^{\circ}$ . Danach wird vom Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, mit Tetrahydrofuran nachgewaschen und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird dreimal mit Petroläther durchgerührt, in Essigester aufgenommen, je dreimal mit 10proz. Zitronensäurelösung, gesätt. NaCl-Lösung, 5proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und gesätt. NaCl-Lösung ausgeschüttelt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und die Lösung im Vakuum eingedampft. Der ölige Rückstand kristallisiert aus Essigester/Petroläther. Ausbeute 9,3 g (74%). Schmp.  $97-99^{\circ}$ . Zur Analyse wird noch dreimal aus dem gleichen Lösungsmittelgemisch umkristallisiert. Schmp.  $111^{\circ}$ ;  $[\alpha]_D^{20} = +4,8^{\circ}$  (c = 2; Essigester).

$C_{32}H_{44}N_4O_9$  (628,7) ber.: C 61,14; H 7,05; N 8,90;  
gef.: C 60,95; H 7,01; N 8,83.

**N<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-L-ornithyl-N<sup>δ</sup>-benzyloxycarbonyl-L-ornithinmethylesterhydrochlorid (5)**

6,0 g (9,5 mMol) BOC—Orn(Z)—Orn(Z)—OMe (4) werden in 9,5 ml absolutem Methanol gelöst, 10,5 ml 2,88 N HCl in Methanol zugegeben und die Mischung 1 Stunde bei Zimmertemperatur belassen. Danach wird im Vakuum eingedampft und das Eindampfen mit absolutem Methanol noch dreimal wiederholt. Sirupöser gelblicher Rückstand. Ausbeute 4,62 g (86%).

**tert.-Butyloxycarbonyl-L-isoleucyl-N<sup>δ</sup>-benzyloxycarbonyl-L-ornithyl-N<sup>δ</sup>-benzyloxycarbonyl-L-ornithinmethylester (6)**

Zu einer Lösung von 1,89 g (8,17 mMol) BOC—Ile<sup>14</sup>) in 30 ml Tetrahydrofuran werden 0,83 g (8,17 mMol) Triäthylamin zugegeben, auf  $-15^{\circ}$  abgekühlt und unter Rühren 0,99 g (8,17 mMol) Chlorkohlensäureisobutylester zugetropft. Nach 10 Minuten wird die ebenfalls auf  $-15^{\circ}$  gekühlte Lösung von Orn(Z)—Orn(Z)—OMe (aus 4,58 g Hydrochlorid 5 und 0,83 g Triäthylamin) in 20 ml Tetrahydrofuran zugegeben. Die Mischung wird noch 3 Stunden bei  $-10^{\circ}$ , über Nacht bei  $0^{\circ}$  und anschließend 2 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten. Danach wird abgesaugt, der Rückstand mit Tetrahydrofuran nachgewaschen und das Fil-

trat im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wird in einer Mischung aus Essigester und *n*-Butanol (8:2) aufgenommen, mit 10proz. Zitronensäurelösung, Wasser, 5proz.  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung und Wasser ausgeschüttelt, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum bis auf 20 ml eingengt. Das Tripeptid wird durch Zusatz von Petroläther ausgefällt, abgesaugt, mit Petroläther nachgewaschen und getrocknet. Ausbeute 4,12 g (67,9%). Schmp. 158–161°. Zur Analyse wird noch zweimal aus Essigester/Petroläther umkristallisiert. Schmp. 162 bis 163°;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -24,5^\circ$  ( $c = 2$ ; Methanol).

$\text{C}_{38}\text{H}_{56}\text{N}_5\text{O}_{10}$  (742,9) ber.: C 61,43; H 7,60; N 9,43;  
gef.: C 61,09; H 7,32; N 9,58.

### L-Isoleucyl-N<sup>δ</sup>-benzyloxycarbonyl-L-ornithyl-N<sup>δ</sup>-benzyloxycarbonyl-L-ornithinmethylester-Trifluoacetat (7)

2,8 g (3,77 mMol) BOC—Ile—Orn(Z)—Orn(Z)—OMe (6) werden mit 10 ml eiskalter Trifluoressigsäure übergossen und 1 Stunde bei Zimmertemperatur belassen. Danach wird im Vakuum eingedampft und der Rückstand mit absolutem Äther verrieben, wobei sich das kristalline Trifluoacetat abscheidet. Es wird abgesaugt und mit absolutem Äther nachgewaschen. Ausbeute 2,7 g (94,8%); Schmp. 179–181°. Durch Umkristallisation aus absolutem Methanol/Äther ändert sich der Schmelzpunkt nicht.

### tert.-Butyloxycarbonyl-D-leucyl-L-isoleucyl-N-benzyloxycarbonyl-L-ornithyl-N-benzyloxycarbonyl-L-ornithinmethylester (8)

2,6 g Ile—Orn(Z)—Orn(Z)—OMe-Trifluoacetat werden mit 200 ml 1 M  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung bei 0–5° etwa 2 Stunden gerührt, anschließend abgesaugt, der Rückstand im Mörser mit etwas  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung verrieben, erneut abgesaugt und mit Wasser neutral gewaschen. Ausbeute 1,85 g (84%) nach dem Trocknen im Vakuum über  $\text{P}_2\text{O}_5$ . 1,85 g vorstehender Verbindung werden in 30 ml Dimethylformamid gelöst, die Lösung von 1,53 g BOC—D—Leu—ONP (3) in 10 ml Dimethylformamid und einige Tropfen Eisessig zugegeben. Die Mischung bleibt 24 Stunden im Eisschrank und noch 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Es werden 100 ml *n*-Butanol zugegeben, mit 1 N Ammoniak, Wasser, 10proz. Zitronensäure bei –5° und Wasser ausgeschüttelt, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum auf 25 ml eingengt. Dabei scheidet sich bereits das Tetrapeptid ab. Die Fällung wird durch Zugabe von Petroläther vervollständigt, nach dem Stehen im Eisschrank abgesaugt und mit Petroläther nachgewaschen. Ausbeute 2,11 g (85,4%); Schmp. 169–174°. Zur Analyse wird noch zweimal aus Dimethylformamid/Wasser umkristallisiert. Schmp. 174,5–175,5°;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +7,5^\circ$  ( $c = 2$ ; DMF).

$\text{C}_{44}\text{H}_{66}\text{N}_6\text{O}_{11}$  (855,1) ber.: C 61,80; H 7,78; N 9,83;  
gef.: C 61,54; H 8,01; N 9,85.

### D-Leucyl-L-isoleucyl-N<sup>δ</sup>-benzyloxycarbonyl-L-ornithyl-N<sup>δ</sup>-benzyloxycarbonyl-L-ornithinmethylester-Trifluoacetat (9)

1,28 g (1,5 mMol) BOC—D—Leu—Ile—Orn(Z)—Orn(Z)—OMe (8) werden in 11 ml eiskalter Trifluoressigsäure gelöst, 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehengelassen und die überschüssige Trifluoressigsäure im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wird durch Verreiben mit absolutem Äther teilweise kristallin. Der Äther wird abdekantiert und der Rückstand aus absolutem Methanol/Äther umkristallisiert. Ausbeute 0,66 g (50,7%). Schmp. 205–207° (Zers.).

**N<sup>α</sup>-tert.-Butyloxycarbonyl-N<sup>δ</sup>-benzyloxycarbonyl-L-ornithyl-D-leucyl-L-isoleucyl-N<sup>δ</sup>-benzyloxycarbonyl-L-ornithyl-N<sup>δ</sup>-benzyloxycarbonyl-L-ornithinmethylester (10)**

650 mg (0,748 mMol) D—Leu—Ile—Orn(Z)—Orn(Z)—OMe-Trifluoracetat (9) werden zusammen mit 546 mg (1,12 mMol) BOC—Orn(Z)—ONP (2) in 25 ml Dimethylformamid gelöst und 0,076 g (0,75 mMol) Triäthylamin zugegeben. Die Mischung bleibt 50 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Nach Zusatz von 80 ml n-Butanol wird bis zur Entfernung des p-Nitrophenols mit 1 N Ammoniak gewaschen, auf  $-5^{\circ}$  abgekühlt, mit 10proz. Zitronensäurelösung ausgeschüttelt und mit gesätt. NaCl-Lösung neutral gewaschen. Die Lösung wird über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und im Vakuum auf 15 ml eingeengt. Durch vorsichtige Zugabe von Petroläther wird das Pentapeptid ausgefällt. Ausbeute an Rohprodukt 596 mg (72%). Schmp. 155—160°. Nach dreimaliger Umkristallisation aus Dimethylformamid/Wasser ist die Verbindung analysenrein. Ausbeute 415 mg (65,1%). Schmp. 159—160°;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +7,5^{\circ}$  (c = 2; DMF).

C<sub>57</sub>H<sub>82</sub>N<sub>8</sub>O<sub>11</sub> (1103,4) ber.: C 62,05; H 7,49; N 10,15;  
gef.: C 62,03; H 7,67; N 9,87.

Jena, Institut für Organische Chemie und Biochemie der Friedrich-Schiller-Universität.

Bei der Redaktion eingegangen am 30. Oktober 1967.