

## SYNTHESE DES DEPSIPEPTIDES VALINOMYCIN NACH DER FESTPHASENMETHODE

G. LOSSE und H. KLENGEL

Sektion Chemie der Technischen Universität Dresden, DDR

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. K. Mothes zum 70. Geburtstag gewidmet

(Received in Germany 17 September 1970; Received in the UK for publication 22 September 1970)

**Zusammenfassung**—Die lineare Vorstufe H-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-),OH\* des Cyclododeca-depsipeptides Valinomycin wurde auf drei parallelen Wegen aufgebaut: (1) in homogener Phase durch stufenweise N-terminale Verlängerung von H-L-Val-D-Hyv-OBzl mit Boc-Aminoacyl-hydroxysäuren; (2) nach demselben Prinzip durch Festphasensynthese an Hydroxymethyl-polystyrol sowie (3) durch zweimalige Fragmentkondensation von H-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-O-Ⓢ mit Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OH. Nach allen drei Synthesewegen resultierten identische Dodeca-depsipeptide, die nach der Cyclisierung authentische Valinomycinpräparate ergaben.

**Abstract**—The linear sequence H-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-),OH of the cyclododeca-depsipeptide valinomycin was synthesized using three parallel methods: (1) homogeneous phase by stepwise N-terminal lengthening of H-L-Val-D-Hyv-OBzl with Boc-aminoacyl-hydroxy-acids; (2) on the same principle by solid-phase-synthesis on hydroxymethyl-polystyrene as well as; (3) by twofold fragment-condensation of H-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-O-Ⓢ with Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OH. In all three ways identical dodecadepsipeptides resulted, which, after cyclization, yielded authentic preparations of valinomycin.

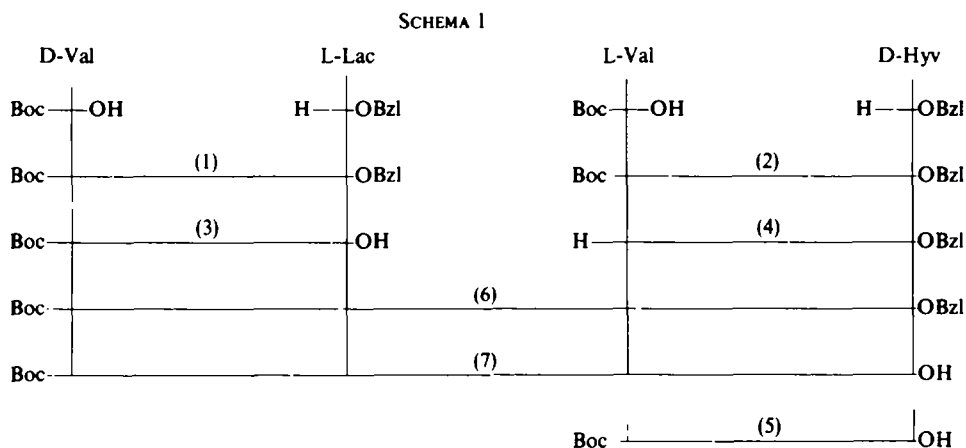
DIE ENNIATIN- und Valinomycin-Antibiotika besitzen als Cyclodepsipeptide mit regulär alternierender Sequenz eine hohe Molekülsymmetrie und sind daher für die Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen unter topochemischen Aspekten besonders geeignet.<sup>1</sup> Ausserdem gibt diese Verbindungsklasse Hinweise auf die Richtung ihres Wirkungsmechanismus, weil ein direkter Zusammenhang zwischen den antibiotischen Eigenschaften und ihrer Fähigkeit besteht, den aktiven K<sup>+</sup>-Iontentransport durch biologische Membranen auszulösen.<sup>1-4</sup>

Die regulär alternierend aufgebauten Depsipeptide und eine Reihe ihrer Analoga wurden bisher ausschliesslich auf konventionellem Wege durch Fragmentkondensation aus Z-Aminoacyl-hydroxysäuren und Aminoacyl- $\alpha$ -hydroxysäure-t-butylestern hergestellt.<sup>1, 5, 6</sup> Um rationellere Aufbaumöglichkeiten zu gewinnen, haben wir jetzt die Festphasenmethode auf die Synthese dieser Substanzklasse übertragen. Als Untersuchungsobjekt diente hierzu das Cyclododecadepsipeptid Valinomycin, das von seiner Struktur her besonders gute Voraussetzungen für die Anwendung dieses Synthesepinzips aufweist.

\* Abkürzungen nach den Regeln der IUPAC-IUB-Commission on Biochem. Nomenclature. *Z. physiol. Chem.* **348**, 256 (1967); *J. Biol. Chem.* **241**, 2491 (1966); **242**, 555 (1967). Darüber hinaus wurden folgende Abkürzungen benutzt: OSu = N-Hydroxysuccinimidester; DCCI = N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid; CDI = Carbonyldiimidazol; Ⓢ = polymerer Träger; Boc = t-Butyloxycarbonyl; OBzl = Benzylester; Hyv = (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH-CH-CO-; Lac = CH<sub>3</sub>-CH-CO-; TFA = Trifluoressigsäure.



Das Antibiotikum wurde auf 3 parallelen Wegen aufgebaut (Schema II A, II B und III). Schema I zeigt zunächst die Darstellungswege der Ausgangsverbindungen H-L-Val-D-Hyv-OBzl (4), Boc-D-Val-L-Lac-OH (3), Boc-L-Val-D-Hyv-OH (5) sowie Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OH (7). Die Esterbindung wurde in allen Fällen mit Carbonyldiimidazol, die Amidbindung in 7 mit Carbonyldiimidazol oder mit DCCI geknüpft. Die Abspaltung der N-Boc-Gruppe erfolgte mit 1N HCl/Eisessig, die der Benzylestergruppe hydrogenolytisch. Der Versuch, durch Umsetzung von Boc-Aminosäuren und Hydroxysäure-N-hydroxysuccinimid-estern mittels CDI bzw Benzolsulfochlorid in Pyridin direkt für die Synthese einsetzbare Boc-Aminoacyl-hydroxysäure-N-hydroxysuccinimid-ester zu gewinnen, gelang nicht und führte nur in einigen Modellfällen zum Ziel.



In Weg II A haben wir zunächst das konventionelle Arbeitsverfahren in homogener Phase angewendet, dabei jedoch erstmals bei Depsipeptiden eine Strategie gewählt, wie sie für die Festphasenmethode charakteristisch ist. Zum Schutz der endständigen Funktionen setzten wir die Kombination der N-Boc- mit der C-Benzylestergruppe ein. Als Kupplungskomponenten dienten anstelle einzelner geschützter Amino- bzw. Hydroxysäuren Zweierfragmente mit vorgebildeter Esterbindung, wodurch zur Kettenverlängerung lediglich Peptidknüpfungsschritte nötig sind. Dazu wurde Boc-L-Val-D-Hyv-OBzl (2) acidolytisch von der Boc-Gruppe befreit sowie dann schrittweise alternierend mit Boc-D-Val-L-Lac-OH (3) und Boc-L-Val-D-Hyv-OH (5) N-terminal unter Anwendung von Carbonyldiimidazol als Knüpfungsreagens bis zum geschützten linearen Dodeca-depsipeptid verlängert. Racemisierung ist hierbei nicht zu erwarten, da die Carboxylgruppe der Hydroxysäure aktiviert wird.<sup>7</sup> Nach Acidolyse der N-Boc-Gruppe und hydrogenolytischer Abspaltung des C-Benzylrestes erfolgte die Cyclisierung über die D-Hyv-D-Val-Bindung. Dieser Weg diente uns zum vorbereitenden Studium der Entblockierungs- und besonders der Knüpfungsschritte für den Festphasenaufbau II B. Er ermöglichte es ausserdem, alle zur analytischen Kontrolle der Synthese an fester Phase wichtigen Zwischenstufen in die Hand zu bekommen.



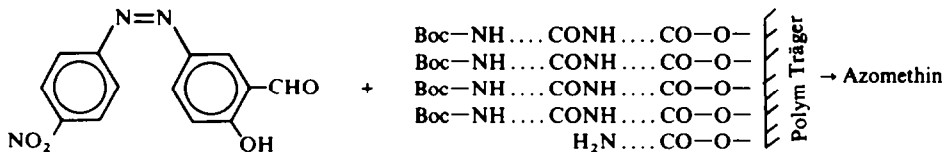
*Schema IIB* zeigt den Aufbau des Peptids nach dem gleichen Prinzip in fester Phase. Boc-L-Val-Hyv-OH (5) wurde zunächst durch Carbonyldiimidazol (20°, 72 h in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) mit Hydroxymethyl-polystyrol (HO-Ⓢ)<sup>8</sup> verestert. Wir zogen die Methode der Ankuppelung an das Harz der üblichen Arbeitsweise<sup>9</sup> mit Chlormethyl-polystyrol/*t*-Base in Äthanol bzw Essigester vor, da sie schonender arbeitet und eine Umesterung innerhalb der anzuknüpfenden Boc-Aminoacyl-hydroxysäure ausschliesst. Um Sequenzabbrüche beim nächsten Verlängerungsschritt zu vermeiden, erschien es zweckmässig, die Festphasensynthese mit der Anesterung einer sterisch gehinderten Carboxylkomponente zu starten. Wir entschieden uns daher für 5 gegenüber 3 als C-terminalem Bauelement. Nach Abspaltung der N-Boc-Gruppe (1 N HCl/Eisessig, 1 h) erfolgte die Kettenverlängerung durch alternierenden Einsatz der N-geschützten Fragmente 3 und 5. Jeder Verlängerungsschritt konnte dabei durch Abspaltung der betreffenden Sequenz mit HBr/TFA von kleinen aliquoten Harzanteilen und chromatographischen Vergleich mit den auf dem Weg IIA gewonnenen, authentischen Zwischenverbindungen genau kontrolliert werden. Als ein weiteres

TABELLE I. ANALYTISCHE KONTROLLE VON SYNTHESEWEG II B

	Entblockierte Zwischenprodukte aus Weg IIA (Standard)			Harzgebundene Sequenz IIB nach Abspaltung mit HBr/TFA		
	<i>R<sub>f</sub></i> -Wert*			<i>R<sub>f</sub></i> -Wert*		
	A	B	C	A	B	C
HBr · H-L-Val-D-Hyv-OH	0.49	0.20		0.49	0.18	
HBr · H-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OH	0.55	0.50		0.56	0.50	
HBr · H-L-Val-D-Hyv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OH	0.70	0.72		0.71	0.70	
HBr · H-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv) <sub>2</sub> OH	0.57	0.72	0.39		0.72	0.38
HBr · H-L-Val-D-Hyv-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv) <sub>2</sub> OH					0.73	0.35
HBr · H-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv) <sub>3</sub> OH	0.64	0.72	0.49		0.73	0.50

\* Dünnschichtchromatographie: Kieselgel G (Merck), 0.25 mm Schichtdicke, lufttrocken  
 Laufmittel: A n-Butanol/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:1  
 B Chloroform/Methanol 2:1  
 C Chloroform/Methanol/H<sub>2</sub>O 40:10:0.1

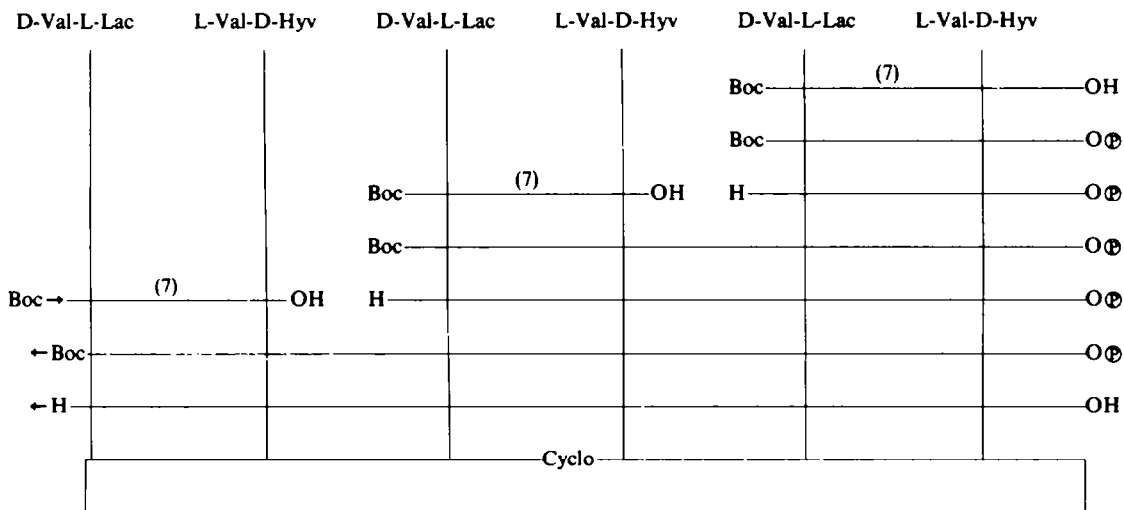
zweckmässiges analytisches Kontrollverfahren des Kettenwachstums bei Festphasensynthesen hat sich eine von uns vorgenommene Weiterentwicklung der Methode von Esko<sup>10</sup> erwiesen. Wie wir fanden,<sup>11</sup> lassen sich freie, durch unvollständigen Umsatz mit N-geschützter Kupplungskomponente auftretende Rest-Aminogruppen des vorausgegangenen Syntheseschrittes gut und rein visuell mit Azoaldehyden wie z.B. 2-Hydroxy-5-(*p*-nitrophenylazo)-benzaldehyd(1) (*p*-Nitrophenylazo-salizylaldehyd) nachweisen. Liegt ein unvollständiger Umsatz vor, zieht der Farbstoff unter Azomethinbildung und Farbvertiefung von orange nach rot auf den Träger auf. Bei praktisch quantitativ verlaufenden, d.h. zu chromatographisch einheitlichen Produkten führenden Kupplungsschritten bleibt diese Indikatorreaktion dagegen aus. Der Nachweis kann mit wenigen aus den Syntheseansätzen entnommenen Milligrammen qualitativ in Anlehnung an die Methode von Esko<sup>10</sup> geführt werden.



Für die Kettenverlängerung selbst setzten wir bis zur Hexapeptidstufe Kupplungskomponente **3** und **5** zusammen mit DCCI in 3-fachem Überschuss ein. Dabei traten nach chromatographischem Befund niedere Sequenzstufen nur zu etwa 5% als Verunreinigung auf. Von der Hexapeptidstufe an zeigten die analytischen Kontrollverfahren bei dieser Arbeitsmethode jedoch wiederholt unbefriedigende Umsätze an, die auch durch Kuppelung mit extrem hohem Überschuss nicht zu beseitigen waren. Bei Verwendung von CDI, gemeinsam mit der Kupplungskomponente in 3-fachem Überschuss angewendet, resultierten dagegen günstigere Ergebnisse. Wir erhielten so nach Abspaltung mit HBr/TFA rohes Dodeka-depsipeptid, das nach dünn-schicht-chromatographischem Befund ca 25% niedere Sequenzen enthielt.

Ein IIB ähnlicher Syntheseweg, beginnend mit der Anesterung von Boc-D-Val-L-Lac-OH an Chlormethylpolystyrol, Kettenverlängerung mit DCCI und Cyclisierung über die L-Lac-L-Val-Bindung wurde vor kurzem von Merrifield<sup>12</sup> veröffentlicht.

SCHEMA III



*Aufbau III* zeigt, dass in der Festphasensynthese auch grössere N-geschützte Fragmente zur Anesterung an das Harz wie auch zur Kettenverlängerung eingesetzt werden können. Bauelement ist hier die Tetradsipeptidsequenz D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv, welche im Valinomycin als cyclischem Sequenztrimeren dreimal aufeinander folgt. Das Boc-Tetradsipeptid (7) wurde analog Weg IIB mit CDI an

Hydroxymethyl-polystyrol gekuppelt und nach Abspaltung der N-Schutzgruppe noch zweimal zur Fragmentkondensation bis zur Dodekadepsipectidstufe eingesetzt. Als Kupplungsreagens diente DCCI, das zusammen mit der Carboxylkomponente in 4-fachem Überschuss eingesetzt wurde. Die analytische Kontrolle erfolgte wie bei IIB chromatographisch und mit p-Nitrophenylazo-salicylaldehyd. Bei der Ver-

TABELLE 2. ANALYTISCHE KONTROLLE VON SYNTHESWEG III

	Entblockierte Zwischenprodukte aus Weg IIA (Standard) $R_f$ -Wert <sup>a</sup>			Harzgebundene Sequenz III nach Abspaltung mit HBr/TFA $R_f$ -Wert <sup>a</sup>		
	A	B	C	A	B	C
	HBr · H-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OH	0.55	0.50		0.55	0.49
HBr · H-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv) <sub>2</sub> OH	0.57	0.72	0.39	0.57	0.69	0.40
HBr · H-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv) <sub>3</sub> OH	0.64	0.72	0.49		0.73	0.49

\* Dünnschichtchromatographie: Kieselgel G (Merck), 0.25 mm Schichtdicke, lufttrocken  
 Laufmittel: A n-Butanol/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:1  
 B Chloroform/Methanol 2:1  
 C Chloroform/Methanol/H<sub>2</sub>O 40:10:0.1

längerung zum Dodeka-depsipectid trat auch hier kein 100% iger Umsatz ein, so dass das nach der Abspaltung mit HBr/TFA erhaltene Endprodukt zu etwa 10% mit Oktapeptid verunreinigt war.

Die Reinigung der auf Weg IIA erhaltenen beidseitig geschützten Zwischenprodukte sowie des geschützten Endproduktes erfolgte durch Chromatographie an Kieselgel (Merck) und Elution mit Cyclohexan/Methylenchlorid/Dioxan, wobei dünn-schichtchromatographisch einheitliche Produkte gewonnen wurden. Die freien linearen Dodeka-depsipectide aus den Harzsynthesen (Weg IIB und III) konnten durch Umfällen aus Äther/Petroläther angereichert bzw. gereinigt werden. Durch Chromatographie an Sephadex LH 20 und Elution mit Dioxan liessen sie sich dagegen nicht rein erhalten.

Die Cyclisierung der aus den drei Synthesewegen resultierenden freien linearen Dpsipectide H-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv)<sub>3</sub>-OH wurde jeweils mittels SOCl<sub>2</sub> in Benzol/Triäthylamin bei einer Konzentration von 10<sup>-4</sup> Mol/l ausgeführt.

Die Reinigung der Cyclisierungsprodukte erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel und anschliessendes Umkristallisieren aus Nitromethan. Tabelle 3 zeigt die Endwerte der 3 Valinomycinsynthesen. In Tabelle 4 sind die biologischen Aktivitäten der gewonnenen Präparate angeführt.

Aus diesen Beispielen geht hervor, dass in der Festphasensynthese grössere Fragmente als Bauelemente für die Anesterung und als Kupplungskomponenten durchaus verwendbar sind. Damit eignet sich die Methode auch grundsätzlich zum gezielten Aufbau von Sequenzpolymeren mit Amid- oder Estercharakter und regulär alternierenden Teilbezirken.

TABELLE 3. ENDWERTE DER VALINOMYCINSYNTHESEN

	Rohausbeute lineare Sequenz %	Ausb Cyclisie- rung %	$[\alpha]_D^{20}$	Schmp	Dünnschicht- Chromatographie $R_f$ -Wert <sup>c</sup>				Valingehalt pro Mol Valinomycin (Ber 6-0)	Elementar- Stickstoff (Ber: N, 7.56)
					A	B	C	D		
Weg IIA	12.0 <sup>a</sup>	23.7 <sup>d</sup>	+ 32.0 <sup>e</sup> (c = 1.0, Benzol)	186-187 <sup>e</sup>	0.64	0.90	0.57	0.80	6.3	7.60
Weg IIB	56.1 <sup>b</sup>	15.6 <sup>d</sup>		183-185 <sup>e</sup>	0.62	0.91	0.54	0.83	6.4	7.78
Weg III	65.8 <sup>c</sup>	23.8 <sup>d</sup>		184.5-186 <sup>e</sup>	0.62	0.90	0.56	0.81	6.3	7.76

<sup>a</sup> bezogen auf H-L-Val-D-Hyv-OBzl (4)

<sup>b</sup> bezogen auf mit HBr/TFA abspaltbare Depsipeptidmenge in Boc-L-Val-D-Hyv-O $\oplus$

<sup>c</sup> bezogen auf mit HBr/TFA abspaltbare Depsipeptidmenge in Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-O $\oplus$

<sup>d</sup> bezogen auf lineare Vorstufe

<sup>e</sup> Schicht: Kieselgel G (Merck), 0.25 mm, lufttrocken

Laufmittel: A n-Butanol/Eisessig/H<sub>2</sub>O 4:1:1

B Chloroform/Methanol 2:1

C Chloroform/Methanol/H<sub>2</sub>O 40:10:0.1

D n-Propanol/H<sub>2</sub>O 7:3

TABELLE 4. BIOLOGISCHE AKTIVITÄT

Minimale wachstumshemmende Konzentration in  $\mu\text{g/ml}$ 

	<i>Mycobacterium phlei</i> <sup>a</sup>	<i>Candida albicans</i> <sup>b</sup>
Weg IIA	7	42
Weg IIB	7	42
Weg III	7	42

<sup>a</sup> Stammlösung: 100  $\mu\text{g}$  Valinomycin/ml in Aceton/H<sub>2</sub>O 4:6;  
Verdünnungsstufen mit H<sub>2</sub>O

<sup>b</sup> Stammlösung: 84  $\mu\text{g}$  Valinomycin/ml in Aceton/H<sub>2</sub>O 4:6;  
Verdünnungsstufen mit H<sub>2</sub>O

## EXPERIMENTELLER TEIL

## 1. Ausgangsstoffe

D- $\alpha$ -Hydroxyisovaleriansäure. Durch Spaltung der racemischen Verbindung<sup>13</sup> nach Shchukina und Mitarbeiter.<sup>14</sup> Ausb 76.0% d.Th.

Schmp. 63-65°;  $[\alpha]_D^{20}$  -20.0° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>).

D- $\alpha$ -Hydroxyisovaleriansäure-benzylester. Durch Veresterung der Säure mit HCl/Benzylalkohol.<sup>15, 16</sup> Ausb 75.0% d.Th.

Sdp. 0.1 92°C;  $[\alpha]_D^{20}$  +23.3° (unverdünnt).

L-Milchsäurebenzylester. Durch Veresterung von L-Milchsäure<sup>17</sup> mit HCl/Benzylalkohol.<sup>15, 16</sup> Ausb 41.1% d.Th.

Sdp. 0.03 77-80°;  $[\alpha]_D^{20}$  -20.6° (unverdünnt).

Boc-L-Val-D-Hyv-OBzl (2). Die Lösung von 1.52 g (7 mMol) Boc-L-Valin<sup>18</sup> in 6 ml wasserfreiem THF wurde bei 0° unter Rühren mit 1.07 g (6.6 mMol) CDI<sup>19</sup> versetzt und nach einer Stunde unter weiterer Kühlung 0.9 g (4.3 mMol) D- $\alpha$ -Hydroxyisovaleriansäure-benzylester in 4 ml wasserfreiem THF zugegeben.

Nach 8 Std bei 0° und 48 Std bei Raumtemp wurde im Vak abgedampft.

Der Rückstand wurde in Et<sub>2</sub>O aufgenommen, die organische Phase mit Wasser, 10%-iger Zitronensäurelösung, Wasser, gesättigter NaHCO<sub>3</sub> und Wasser gewaschen, über MgSO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel im Vak abgedampft (im folgenden als übliche Aufarbeitung bezeichnet). Die Reinigung der beidseitig geschützten Rohprodukte aus Syntheseweg IIA und der cyclischen Endprodukte erfolgte durch Chromatographie an Kieselgel (Merck, Aktivität II) unter stufenweiser Elution mit folgenden Lösungsmittelsystemen: 1. Cyclohexan, 2. Cyclohexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 9:1, 3. Cyclohexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 8:2, 4. Cyclohexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:1, 5. Cyclohexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Dioxan 49:49:2, 6. Cyclohexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Dioxan 47:47:6, 7. Cyclohexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Dioxan 44:44:12, 8. Cyclohexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Dioxan 40:40:20, 9. Cyclohexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Dioxan 25:25:50.

Nach der Reinigung der Rohsubstanz verblieben 1.36 g (80.5% d.Th.) Boc-L-Val-D-Hyv-OBzl, farbloses Öl.  $[\alpha]_D^{20} - 8.5^\circ$  (c = 1.0, Dioxan).

Dünnschichtchromatographie (zur Dünnschichtchromatographie wurde in allen Fällen Kieselgel G, Merck, Schichtdicke 0.25 mm, lufttrocken verwendet): Chloroform/EtOAc 8:2 (Laufmittel E)  $R_f$  0.79; Benzol/EtOAc/EtOH 90:10:2 (Laufmittel F)  $R_f$  0.50. (Anal. Gef: C, 65.25; H, 8.20; N, 3.36 · C<sub>22</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>6</sub> erfordert: C, 64.84; H, 8.16; N, 3.44 %).

H-L-Val-D-Hyv-OBzl (4). 6.9 g (17 mMol) Boc-L-Val-D-Hyv-OBzl (2) wurden 1 Std mit 50 ml 1N HCl/AcOH bei Raumtemp geschüttelt, dann im Vak bei maximal +30° Badtemp eingengt, der Rückstand mit Et<sub>2</sub>O und 30 ml eiskalter 0.5 N HCl aufgenommen und die Ätherphase noch zweimal mit je 10 ml 0.5 N eiskalter HCl extrahiert. Die vereinigten wässrigen Extrakte wurden unter Kühlung mit 10%-iger Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf ca pH 8.5 eingestellt, zweimal mit Et<sub>2</sub>O extrahiert, die Extrakte mit Wasser gewaschen, mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet und im Vak eingengt: 4.4 g (84.0% d.Th.) H-L-Val-D-Hyv-OBzl, gelbliches Öl. Hydrochlorid:  $[\alpha]_D^{20} + 24.5^\circ$  (c = 2.0, MeOH). Dünnschichtchromatographie: nBuOH/AcOH/H<sub>2</sub>O 4:1:1 (Laufmittel A)  $R_f$  0.63; nBuOH/AcOH/Pyridin/H<sub>2</sub>O 15:10:3:2  $R_f$  0.70 (Laufmittel G). (N-Bestimmung: Gef N, 3.92; C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>ClNO<sub>4</sub> erfordert: N, 4.09 %).

Boc-L-Val-D-Hyv-OH (5). 8.6 g (21 mMol) Boc-L-Val-D-Hyv-OBzl (2), gelöst in 100 ml frisch destilliertem, wasserfreiem THF, wurden in Gegenwart von 0.5 g 5-proz. Pd/C hydrogenolysiert, filtriert und zur Trockne eingengt. Das zurückbleibende, gelbliche Öl kristallisierte nach ca. 30 min. Es wurde in Et<sub>2</sub>O aufgenommen, zweimal mit gesättigter NaHCO<sub>3</sub> extrahiert, die wässrige Phase mit Zitronensäure angesäuert, mit Et<sub>2</sub>O:EtOAc dreimal extrahiert, mit Wasser gewaschen und mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Ausb: 5.9 g (88.5% d.Th.) farblose Kristalle (Schmp. 135–142°C), nach Umkristallisation aus EtOAc/Petroläther 5:1 g (76.4%) feine Nadeln.  $[\alpha]_D^{20} + 2.0^\circ$  (c = 1.0, Benzol); Schmp. 142–143°. (Anal. Gef: C, 56.54; H, 8.28; N, 4.55. C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>6</sub> erfordert: C, 56.76; H, 8.58; N, 4.41 %).

Boc-D-Val-L-Lac-OBzl (1). 6.53 g (29.8 mMol) Boc-D-Valin,<sup>18</sup> 4.59 g (28.3 mMol) CDI und 4.55 g (25.3 mMol) L-Milchsäurebenzylester wurden in 12 ml wasserfreiem THF wie für Boc-L-Val-D-Hyv-OBzl (2) beschrieben umgesetzt. Nach üblicher Aufarbeitung und der Reinigung durch Chromatographie verblieben 7.76 g (80.5% d.Th.) farbloses Öl.  $[\alpha]_D^{20} - 9.5^\circ$  (c = 2.0, Benzol). Dünnschichtchromatographie: Laufmittel E,  $R_f$  0.75; Laufmittel F,  $R_f$  0.44. (Anal. Gef: C, 63.21; H, 7.51; N, 3.86; C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>6</sub> erfordert: C, 63.30; H, 7.70; N, 3.69 %).

Boc-D-Val-L-Lac-OH (3). Boc-D-Val-L-Lac-OBzl (1) wurde wie für Boc-L-Val-D-Hyv-OBzl (2) beschrieben hydrogenolysiert und aufgearbeitet. 6.0 g Benzylester ergaben 3.6 g rohe Säure (78.8% d.Th.). Nach Umkristallisation aus abs Et<sub>2</sub>O/Petroläther 3:1 g farblose Kristalle (67.5% d.Th.); Schmp. 95–96°;  $[\alpha]_D^{20} - 0.5^\circ$  (c = 1.0 in Benzol). (Anal. Gef: C, 53.75; H, 8.36; N, 5.08; C<sub>13</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>6</sub> erfordert: C, 53.96; H, 8.03; N, 4.84 %).

Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OBzl (6). (a) *Synthese mittels CDI*. Die Lösung von 3.35 g (12 mMol) Boc-D-Val-L-Lac-OH (3) in 10 ml wasserfreiem THF wurde bei –5° unter Rühren mit 1.86 g (11.5 mMol) CDI versetzt, nach 90 Min 3.06 g (10 mMol) H-L-Val-D-Hyv-OBzl (4) in 5 ml THF zugegeben, nach 10 Std Rühren bei 0° und weiteren 12 Std bei Raumtemp im Vak abgedampft und wie üblich aufgearbeitet. Nach der Reinigung durch Chromatographie verblieben 4.8 g (83.2% d.Th.) Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OBzl (6), zähes gelbliches Öl.  $[\alpha]_D^{20} - 10.0^\circ$  (c = 2.0, EtOH). Dünnschichtchromatographie: Laufmittel E,  $R_f$  0.73; Laufmittel F,  $R_f$  0.18. (Anal. Gef: C, 62.30; H, 8.19; N, 4.73; C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> erfordert: C, 62.26; H, 8.01; N, 4.84 %).

(b) *Synthese mittels DCCI*. 4.4 g (14.3 mMol) H-L-Val-D-Hyv-OBzl (4) und 4.33 g (15 mMol) Boc-D-Val-L-Lac-OH (3) wurden in 35 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst, 3.1 g (15 mMol) DCCI bei 0° unter Rühren zugegeben, 1 Std bei 0° gerührt und 60 Std bei Raumtemp stengelassen. Nach Zugabe einiger Tropfen AcOH wurde abgesaugt, im Vak abgedampft und wie üblich aufgearbeitet. Die Chromatographie an Kieselgel ergab 8.0 g



(96.7% d.Th.) Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OBzl (6), zähes farbloses Öl.  $[\alpha]_D^{20} - 10.0^\circ$  ( $c = 1.0$ , EtOH). Dünnschichtchromatographie: Laufmittel E,  $R_f$  0.74; Laufmittel F,  $R_f$  0.20. (Anal. Gef: C, 61.90; H, 8.40; N, 4.69;  $C_{30}H_{46}N_2O_9$  erfordert: C, 62.26; H, 8.01; N, 4.84%).

Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OH (7). 5.6 g (9.7 mMol) Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OBzl (6) wurden wie für Boc-L-Val-D-Hyv-OBzl (2) beschrieben hydriert und aufgearbeitet. Ausb 3.8 g (80.4% d.Th.) (7), farblose, amorphe Substanz.  $[\alpha]_D^{27} - 12.5^\circ$  ( $c = 2.0$  in abs EtOH); dünnschichtchromatographisch einheitlich: nPrOH/H<sub>2</sub>O 7:3 (Laufmittel D)  $R_f$  0.70; CHCl<sub>3</sub>/MeOH 2:1 (Laufmittel B)  $R_f$  0.79. (Anal. Gef: C, 56.85; H, 8.59; N, 5.95;  $C_{23}H_{40}N_2O_9$  erfordert: C, 56.54; H, 8.24; N, 5.74%).

L-Milchsäure-N-hydroxysuccinimidester. 1.80 g (20 mMol) L-Milchsäure und 2.30 g (20 mMol) N-Hydroxysuccinimid wurden in 25 ml wasserfreiem THF gelöst, auf  $-10^\circ$  gekühlt, unter N<sub>2</sub> die Lösung von 4.12 g (20 mMol) DCCI in 10 ml THF zugetropft und 12 Std bei  $-5^\circ$  gerührt. Der N,N'-Dicyclohexylharnstoff wurde abgesaugt, mit EtOAc gewaschen und das Filtrat fast bis zur Trockne eingeengt. Nach dem Absaugen und Waschen mit Et<sub>2</sub>O verblieben 3.6 g, nach Umkristallisation (Substanz in 30 ml Dioxan gelöst, filtriert und in 300 ml Et<sub>2</sub>O/Petroläther getropft) 3.3 g (58.6% d.Th.) farblose Kristalle. Schmp. 133–135°.  $[\alpha]_D^{20} + 3.0^\circ$  ( $c = 2.0$  in Dioxan). (Anal. Gef: C, 44.87; H, 4.99; N, 7.22;  $C_7H_9NO_5$  erfordert: C, 44.92; H, 4.84; N, 7.50%). IR-Spektrum: IR  $\nu_{max}^{KBr}$  (cm<sup>-1</sup>): 3535, 1080 (OH), 1795, 1740 (C=O), 1215 (C—O—N). Die Substanz ist nicht beständig. Nach 4 Tagen im Exsikkator bei  $-15^\circ$  sinkt der Schmelzpunkt auf 118–132°.

D- $\alpha$ -Hydroxyisovaleriansäure-N-hydroxysuccinimidester. 0.83 g (7 mMol) D- $\alpha$ -Hydroxyisovaleriansäure, 0.81 g (7 mMol) N-Hydroxysuccinimid und 1.44 g DCCI (7 mMol) wurden wie für den Milchsäureester beschrieben 48 Std umgesetzt. Nach der üblichen Aufarbeitung (organische Phase: EtOAc) und Umkristallisieren aus EtOAc/Petroläther verblieben 0.98 g (64.5% d.Th.) farblose Kristalle. Schmp. 109–110°.  $[\alpha]_D^{23} - 12.0^\circ$  ( $c = 2.0$  in Dioxan). (Anal. Gef: C, 50.51; H, 6.41; N, 6.54; Molgew (kryosk Benzol): 216;  $C_9H_{13}NO_5$  (Molgew 215.20) erfordert: C, 50.23; H, 6.09; N, 6.51%). IR-Spektrum: IR  $\nu_{max}^{CHCl_3}$  (cm<sup>-1</sup>): 3590, 1090 (OH), 1795, 1750 (C=O), 1205 (C—O—N).

Boc-Gly-D-Hyv-OSu. 1.75 g (10 mMol) Boc-Glycin wurden in einer Mischung von 3 ml Pyridin und 7 ml Dioxan bei 0° gelöst, nach Zugabe von 1.28 ml (10 mMol) Benzolsulfochlorid 20 Min bei 0° gerührt, 1.31 g (6 mMol) D- $\alpha$ -Hydroxyisovaleriansäure-N-hydroxysuccinimidester zugeben, noch 5 Std im Eisbad gerührt und nach 12 Std bei Raumtemp wie üblich aufgearbeitet. Nach Umkristallisation aus EtOAc/Petroläther 1.57 g (70.5% d.Th.) farblose Kristalle. Schmp. 126–127°.  $[\alpha]_D^{23} + 37.2^\circ$  ( $c = 2.0$ , Dioxan). IR-Spektrum: IR  $\nu_{max}^{CHCl_3}$  (cm<sup>-1</sup>): 3470 (NH), 1750, 1725 (C=O), 1220 (C—O—N), 1170 (C—O—C). (Anal. Gef: C, 51.65; H, 6.77; N, 7.61; Molgew (kryosk Benzol) 371;  $C_{16}H_{24}N_2O_8$  (Molgew 372.37) erfordert: C, 51.60; H, 6.50; N, 7.52%).

## 2. Synthese in homogener Phase (Weg IIA)

H-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OBzl. 6.35 g (11 mMol) Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OBzl (6) wurden in der für die Synthese von H-L-Val-D-Hyv-OBzl (4) angegebenen Weise acidolysiert und aufgearbeitet: Ausb: 5.1 g (97.1% d.Th.) freies Amin, gelbliches Öl. Hydrochlorid:  $[\alpha]_D^{20} - 29.5^\circ$  ( $c = 2.0$ , EtOH). Dünnschichtchromatographie: Laufmittel A,  $R_f$  0.59; CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 40:10:0.1 (Laufmittel C)  $R_f$  0.86; Laufmittel G, 0.70. (N-Bestimmung: Gef: N, 5.63;  $C_{25}H_{39}ClN_2O_7$  erfordert: N, 5.45%).

Boc-L-Val-D-Hyv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OBzl. 5.1 g (10.6 mMol) H-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OBzl wurden mit 4.12 g (13 mMol) Boc-L-Val-D-Hyv-OH (5) mit Hilfe von 2.01 g (12.5 mMol) CDI in der für die Synthese von Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OBzl beschriebenen Weise umgesetzt. Nach üblicher Aufarbeitung und Reinigung durch Chromatographie Ausb 5.47 g (66.3% d.Th.) geschütztes Hexadepsipeptid, farbloses zähes Öl.  $[\alpha]_D^{20} - 3.8^\circ$  ( $c = 2.0$ , EtOH). Dünnschichtchromatographie: Laufmittel E,  $R_f$  0.65; Laufmittel F,  $R_f$  0.06. (Anal. Gef: C, 62.24; H, 8.50; N, 5.83.  $C_{40}H_{63}N_3O_{12}$  erfordert: C, 61.75; H, 8.16; N, 5.40%).

H-L-Val-D-Hyv-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OBzl. Die Acidolyse von 6.0 g (8 mMol) Boc-Hexadepsipeptidbenzylester und anschließende Aufarbeitung nach der für die Synthese von H-L-Val-D-Hyv-OBzl angegebenen Methode ergaben 4.7 g (86.7% d.Th.) Hexadepsipeptidbenzylester, gelbliches Öl.  $[\alpha]_D^{20} + 13.3^\circ$  ( $c = 1.0$ , Dioxan). Dünnschichtchromatographie: Laufmittel A,  $R_f$  0.67; Laufmittel G,  $R_f$  0.74. (N-Bestimmung: Gef: N, 5.97;  $C_{35}H_{53}N_3O_{10}$  erfordert: N, 6.20%).

Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OBzl. Die Umsetzung von 2.7 g (9.2 mMol) Boc-D-Val-L-Lac-OH(3), 1.4 g (8.7 mMol) CDI und 4.7 g (6.9 mMol) des oben angeführten Hexadepsipeptidbenzylesters nach der für Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OBzl (6) beschriebenen Methode ergab nach der Reinigung durch Chromatographie 3.9 g (59.6% d.Th.) geschütztes Octadepsipeptid, farblos amorph.  $[\alpha]_D^{20} - 5.0^\circ$  ( $c = 2.0$ ,

EtOH). Dünnschichtchromatographie: Laufmittel E,  $R_f$  0-48; Laufmittel F,  $R_f$  0. (Anal Gef: C, 60-37; H, 8-27; N, 6-12.  $C_{48}H_{76}N_4O_{15}$  erfordert: C, 60-73; H, 8-07; N, 5-90%).

*H-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-)\_2OBzl*. 2.0 g (2.11 mMol) Boc-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-)\_2OBzl wurden 1 Std mit 13 ml 1 N HCl/AcOH bei Raumtemp behandelt, dann im Vak eingengt (max. +30°), der Rückstand in Et<sub>2</sub>O gelöst, im Vak eingengt und dieser Vorgang noch zweimal wiederholt. Nach zweimaligem Umfällen aus Et<sub>2</sub>O/Petroläther verblieben 1.77 g (94.8% d.Th.) farbloses amorphes Oktadepsipeptid-benzylesterhydrochlorid. Hydrochlorid:  $[\alpha]_D^{20}$  -22.5° (c = 2.0, EtOH). Dünnschichtchromatographie: Laufmittel A,  $R_f$  0-63; Laufmittel C,  $R_f$  0-91; Laufmittel G,  $R_f$  0-74. (N-Bestimmung: Gef: N, 6-10;  $C_{43}H_{69}ClN_4O_{13}$  erfordert: N, 6-34%).

*Boc-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-)\_3OBzl*. 1.10 g (2.24 mMol) Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OH (7) und 0.33 g (2.05 mMol) CDI wurden in der für die Synthese von Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OBzl (6) angegebenen Weise umgesetzt und mit 1.65 g (1.86 mMol) HCl · H-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-)\_2OBzl zum Dodekadsipeptidderivat gekuppelt. Die übliche Aufarbeitung und Reinigung durch Chromatographie ergab 1.43 g (57.1% d.Th.) farblose, amorphe Substanz.  $[\alpha]_D^{20}$  -9.3° (c = 1.4, EtOH). Dünnschichtchromatographie: Laufmittel E,  $R_f$  0-26. (Anal Gef: C, 59-70; H, 8-38; N, 6-49;  $C_{66}H_{106}N_6O_{21}$  erfordert: C, 60-07; H, 8-10; N, 6-37%).

*H-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-)\_3OH*. 700 mg Boc-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-)\_3OBzl wurden zur Abspaltung der Boc-Gruppe 120 Min mit 1 N HCl/AcOH behandelt, anschliessend in Gegenwart von 0.5 g 5-proz Pd/C in THF hydriert, die Lösung zur Trockne eingengt und der Rückstand aus CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O/Petroläther fraktioniert gefällt: 540 mg (85.6% d.Th.) Dodekadsipeptid-hydrochlorid. Hydrochlorid:  $[\alpha]_D^{20}$  +9.3° (c = 1.0, CHCl<sub>3</sub>). Dünnschichtchromatographie: Laufmittel A,  $R_f$  0-64; Laufmittel C,  $R_f$  0-72; Laufmittel G,  $R_f$  0-73. (N-Bestimmung: Gef: N, 7-31;  $C_{54}H_{93}ClN_6O_{19}$  erfordert: N, 7-20%).

*Valinomycin*. 490 mg (0.42 mMol) HCl · H-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-)\_3OH wurden mit SOCl<sub>2</sub> in das Säurechlorid überführt und wie von Schemjakin<sup>20</sup> angegeben cyclisiert. Nach Einengen und üblicher Aufarbeitung verblieben 480 mg Rohprodukt, das durch Chromatographie an Kieselgel (Elution mit Cyclohexan/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Dioxan 1:1:2) gereinigt wurde: 110 mg (23.7% d.Th.) Valinomycin. Nach Umkristallisation aus Nitromethan 90 mg. Schmp. 186-187° (Lit: 186-5-187°;<sup>12</sup> 187°<sup>21</sup> und 190°).<sup>22</sup> (Anal Gef: C, 58-86; H, 8-19.  $C_{54}H_{90}N_6O_{18}$  erfordert: C, 58-36; H, 8-16%). Die optische Drehung, der Valingehalt, Elementar-Stickstoff und  $R_f$ -Werte der Dünnschichtchromatographie sind in Tabelle 3 aufgeführt.

### 3. Synthese an fester Phase

Polymerer Träger: Ein Copolymerisat aus Styrol und 2% Divinylbenzol, Korngrösse 30 µm-80 µm, wurde mit Monochlordimethyläther (85-proz)/SnCl<sub>4</sub> chlormethyliert<sup>23</sup> und durch Verseifung der Chlormethylgruppen<sup>8, 24</sup> in Hydroxymethylpolystyrol übergeführt.

TABELLE 5. AUSGANGSWERTE FÜR DIE MATRIX: WEG II B UND III

Chlorgehalt nach Chlormethylierung		Restchlor nach Verseifung		Hydroxyl- gruppen	Beladung nach Anesterung der C-terminalen Komponente	Davon mit HBr/TFA abspaltbar
%	mÄqu pro g Harz	%	mÄqu pro g Harz			
3-16	0-89	0-60	0-17	0-72	0-13-0-18	0-10-0-12

#### Weg IIB

*Boc-L-Val-D-Hyv-O* ⊕. 1.78 g (5.6 mMol) Boc-L-Val-D-Hyv-OH (5) und 0.91 g (5.6 mMol) CDI wurden in 50 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1 Std bei 0° umgesetzt, 10.0 g (7.2 m Äquiv OH-Gruppen) Hydroxymethyl-polystyrol zugegeben, 72 Std bei Raumtemp gerührt und nacheinander je dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, MeOH, AcOH und MeOH gewaschen.

Der Depsipeptidgehalt wurde nach Hydrolyse (72 Std, 105°, Dioxan/konz HCl 1:1) durch Valinbestimmung<sup>25</sup> zu 0.18 mMol/g Harz (Tabelle 5) ermittelt. Nach der gleichen Methode wurde der davon mit

HBr/TFA (90 Min, Raumtemp, anschliessend Hydrolyse) abspaltbare Anteil zu 0-12 mMol/g Harz (66-7% des Gesamtgehalts an Depsipeptid) (Tabelle 5) bestimmt (Ausbeuteangaben in Tabelle 3 sind auf diesen Anteil bezogen).

*Boc-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv)<sub>3</sub>-O*⊕. 10-0 g Boc-L-Val-D-Dyv-O⊕, (entsprechend 1-8 mMol Didepsipeptid) wurden 60 Min mit 1 N HCl/AcOH zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe geschüttelt, nacheinander je dreimal mit AcOH, abs EtOH und DMF gewaschen, die Aminogruppe durch Schütteln mit 35 ml einer 10%-Lösung von Et<sub>3</sub>N in DMF (15 Min) in Freiheit gesetzt, zweimal mit DMF und dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen, 15 Min mit einer Lösung von 1-56 g (5-4 mMol) Boc-D-Val-L-Lac-OH (3) in 20 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> geschüttelt, 1-11 g (5-4 mMol) DCCI zugegeben und 12 Std geschüttelt. Nach der Kupplung wurde dreimal mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, zweimal mit EtOH, dreimal mit AcOH, zweimal mit EtOH und abschliessend mit AcOH gewaschen. Dieser Reaktionszyklus wurde unter abwechselnder Kupplung mit je 1-77 g (5-4 mMol) Boc-L-Val-D-Hyv-OH (5) und 1-56 g (5-4 mMol) Boc-D-Val-L-Lac-OH (3) sowie 1-11 g (5-4 mMol) DCCI bis zum Aufbau der Hexadepsipeptid-sequenz und dann mit 1-72 g (5-4 mMol) Boc-D-Val-L-Lac-imidazolid (Boc-Didepsipeptid + CDI, 1 Std in 20 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) und 1-97 g (5-4 mMol) Boc-L-Val-D-Hyv-imidazolid bis zum Aufbau der Dodekadepsipeptid-sequenz wiederholt.

*Abspaltung des H-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv)<sub>3</sub>OH vom polymeren Träger.* In die Suspension des Harzes in wasserfreier TFA wurde bei Raumtemp 90 Min lang unter Schütteln trockener HBr eingeleitet, abgesaugt, mit TFA und CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gewaschen und die vereinigten Filtrate im Vak bei maximal 30° eingengt. Ausb: 0-816 g, entspr 56-1% des von Boc-L-Val-D-Hyv-O⊕ mit HBr/TFA abspaltbaren Anteils (Tabelle 3). Das Rohprodukt wurde durch Umfällen aus Et<sub>2</sub>O/Petroläther von Verunreinigungen niederer Sequenzstufen gereinigt: Ausb: 0-592 g.  $[\alpha]_D^{20} + 10-0^\circ$  (c = 1-0, CHCl<sub>3</sub>). (N-Bestimmung: Gef: N, 6-51. C<sub>54</sub>H<sub>93</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>19</sub> erfordert: N, 6-94%).

*Valinomycin.* 150 mg des linearen Depsipeptidderivats wurden nach der bei Syntheseweg IIA beschriebenen Methode cyclisiert (Rohausb 136 mg) und aufgearbeitet. Ausb: 23 mg (15-6% d.Th., bezogen auf lineare Vorstufe), nach Umkristallisieren aus CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> 12 mg. Schmp. 183-185°. Mischschmelzpunkt mit authentischem Valinomycin nicht erniedrigt (Tabelle 3).

#### Weg III

*Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-O*⊕. 0-821 g (1-68 mMol) Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OH (7), 0-271 g (1-68 mMol) CDI und 3 g Hydroxymethyl-polystyrol (2-1 m Äquiv OH-Gr) wurden wie unter Weg IIB beschrieben umgesetzt und gewaschen. Die Beladung mit Tetradepsipeptid wurde wie unter Weg IIB beschrieben zu 0-13 mMol/g Harz, der davon mit HBr/TFA (90 Min, Raumtemp) abspaltbare Anteil zu 0-10 mMol/g Harz (77-0% des Gesamtgehalts an Depsipeptid) bestimmt (Ausbeuteangaben in Tabelle 3 sind auf diesen Anteil bezogen).

*Boc-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv)<sub>3</sub>-O*⊕. Zur Synthese wurden 2-4 g Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-O⊕ (entspr 0-31 mMol Tetradepsipeptid, Tabelle 5) angesetzt. Die Abspaltung der N-Schutzgruppe, Freisetzung der Aminogruppe und die Waschoptionen erfolgten wie unter Weg IIB beschrieben. Es wurde mit 0-79 g Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-OH (7) und 0-33 g DCCI (je 1-6 mMol) in 8 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> zweimal bis zum Aufbau der Dodekadepsipeptid-sequenz gekuppelt.

*Abspaltung des H-(D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv)<sub>3</sub>OH vom polymeren Träger.* Die Abspaltung erfolgte wie unter Weg IIB beschrieben. Ausb: 0-191 g, entspr 65-8% des mit HBr/TFA von Boc-D-Val-L-Lac-L-Val-D-Hyv-O⊕ abspaltbaren Anteils (Tabelle 3). Das Rohprodukt enthielt Octa- und Spuren von Tetradepsipeptid, die durch fraktionierte Fällung aus Et<sub>2</sub>O/Petroläther entfernt wurden: Ausb 0-162 g, farblos amorph.  $[\alpha]_D^{20} + 10-0^\circ$  (c = 1-0 in CHCl<sub>3</sub>). (C<sub>54</sub>H<sub>93</sub>BrN<sub>6</sub>O<sub>19</sub> erfordert: N, 6-94; Gef: N, 7-20%).

*Valinomycin.* 96 mg Dodekadepsipeptid wurden wie für Syntheseweg II angegeben zyklisiert und aufgearbeitet. Ausb: 21 mg (23-8% d.Th., bezogen auf lineare Vorstufe), nach Umkristallisation aus CH<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> 18 mg. Schmp. 184-5-186°. Mischschmelzpunkt mit authentischem Valinomycin nicht erniedrigt (Tabelle 3).

#### 4. Analytische Kontrolle der Harzsynthese

Der Verlauf der Synthese am polymeren Träger wurde mit Hilfe von zwei Methoden überprüft.

*Dünnschichtchromatographie.* Abspaltung der Teilsequenzen vom polymeren Träger (HBr/TFA, 2 Std, 20°), Einengen des Filtrats, Dünnschichtchromatographie und Vergleich mit den entsprechenden durch Acidolyse und Hydrogenolyse entblockierten Zwischenstufen aus der konventionellen Synthese (Weg IIA). Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 und 2 angeführt.

*Azoaldehydtest.* 3-10 mg zu prüfendes Harz wurden mit einer Lösung von 10 mg 2-Hydroxy-5-(phenylazo-)benzaldehyd (I) (5-Phenyl-azo-salicylaldehyd, Schmp. 128°)<sup>26</sup> bzw 10 mg 2-Hydroxy-5-(p-nitrophenylazo-)benzaldehyd (I) (p-Nitrophenyl-azo-salicylaldehyd, Schmp. 198°)<sup>27</sup> in 2 ml abs EtOH versetzt und

5 Std stehengelassen. Der Feststoff wurde abgetrennt und mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gewaschen, bis das Filtrat farblos war. Freie noch kupplungsfähige Aminogruppen wurden durch eine orangerote nicht auswaschbare Färbung des Polymeren angezeigt.

Alle Zwischenstufen der Festphasensynthesen ergaben einen negativen Test, das heisst freie Aminogruppen waren nach den Kupplungsschritten nicht vorhanden.

*Danksagung* – Wir danken Frau Schurig und Frau Arlt, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Epidemiologie der Medizinischen Akademie Dresden (Direktor Prof. Dr. W. Ahrens) für die Ausführung der mikrobiologischen Aktivitätsprüfungen.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup> Zusammenfassung: M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov und V. T. Ivanov; *Angew. Chem.* **81**, 523 (1969)
- <sup>2</sup> C. Moore und B. C. Pressman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**, 562 (1964)
- <sup>3</sup> M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, V. K. Antonov, A. M. Shkrob, I. I. Mikhaleva, A. V. Evstratov und G. G. Malenkov, *Ibid.* **29**, 779 (1967)
- <sup>4</sup> H. K. Wipf, L. A. Pioda, Z. Stefanac und W. Simon, *Helv. Chim. Acta* **51**, 377 (1968)
- <sup>5</sup> E. Schröder und K. Lübke, *The Peptides*, Vol. I, p. 287, Academic Press, New York (1965)
- <sup>6</sup> G. Losse und H. Raue, *Tetrahedron* **25**, 2677 (1969)
- <sup>7</sup> M. M. Shemyakin, E. I. Vinogradova, M. Yu. Feigina, N. A. Aldanova, Yu. A. Ovchinnikov, A. A. Kiryushkin, *Zh. Obshch. Khim.* **34**, 1782 (1964)
- <sup>8</sup> M. Bodanszky und J. T. Sheehan, *Chem. & Ind.*, 1597 (1966)
- <sup>9</sup> Zusammenfassung: J. M. Stewart und J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, W. H. Freeman, San Francisco (1969); G. Losse und K. Neubert, *Z. Chem.* **10**, 48 (1970)
- <sup>10</sup> K. Esko, S. Karlsson und J. Porath, *Acta Chem. Scand.* **22**, 3342 (1968)
- <sup>11</sup> G. Losse und R. Ulbrich, Techn. Universität Dresden, unveröffentlicht
- <sup>12</sup> B. F. Gisin, R. B. Merrifield und D. C. Tosteson, *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 2691 (1969)
- <sup>13</sup> A. Lipp, *Liebigs Ann.* **205**, 1 (1880)
- <sup>14</sup> L. A. Shchukina, R. G. Vdovina, Yu. B. Shvetsov und A. V. Karpova, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Otd. Khim. Nauk* 310 (1962)
- <sup>15</sup> G. Losse und H. Raue, *Chem. Ber.* **98**, 1522 (1965)
- <sup>16</sup> G. Losse und G. Bachmann, *Ibid.* **97**, 2671 (1964)
- <sup>17</sup> H. Borsook, H. M. Huffmann und Yun-Pu Liu, *J. Biol. Chem.* **102**, 449 (1933)
- <sup>18</sup> E. Schnabel, *Liebigs Ann.* **702**, 188 (1967)
- <sup>19</sup> H. A. Staab und K. Wendel, *Chem. Ber.* **96**, 3374 (1963)
- <sup>20</sup> M. M. Shemyakin, N. A. Aldanova, E. I. Vinogradova und M. Yu. Feigina, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* 2143 (1966)
- <sup>21</sup> H. Brockmann und G. Schmidt-Kastner, *Chem. Ber.* **88**, 57 (1955)
- <sup>22</sup> M. M. Shemyakin, A. A. Aldanova, E. I. Vinogradova und M. Yu. Feigina, *Tetrahedron Letters* 1921 (1963)
- <sup>23</sup> G. Losse, W. Grenzer und K. Neubert, *Z. Chem.* **8**, 21 (1968)
- <sup>24</sup> H. Beyerman und R. A. in 't Veld, *Rec. Trav. Chim.* **88**, 1019 (1969)
- <sup>25</sup> S. Moore und W. H. Stein, *J. Biol. Chem.* **211**, 907 (1954)
- <sup>26</sup> E. Tummeley, *Liebigs Ann.* **251**, 174 (1889)
- <sup>27</sup> J. Th. Hewitt und H. V. Mitchell, *J. Chem. Soc.* **91**, 1251 (1907)