

Synthese des Streptogramin-B-analogen Cyclodepsipeptids *cyclo*[-(Boc)Ser-D-Abu-Pro-(Me)Phe-Pip-Phg-O-]

Horst Kessler*^a, Bernhard Kutscher^a, Gerhard Mager^a und Ernst Grell^b

Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt (Main)^a,

Niederurseler Hang, D-6000 Frankfurt (Main) 50

Max-Planck-Institut für Biophysik^b,

Heinrich-Hoffmann-Straße 7, D-6000 Frankfurt (Main) 70

Eingegangen am 11. März 1983

Die Synthese von *cyclo*[-(Boc)Ser-D-Abu-Pro-(Me)Phe-Pip-Phg-O-] (1), einem Analogen der Virginiamycin-Antibiotika, wird beschrieben. Es wurde das die Esterbindung enthaltende Dipeptid **11** mit dem Tetrapeptid **12** kondensiert. Die Cyclisierung des linearen, entschützten Hexadepsipeptids **15** erfolgte zwischen Serin und D-2-Aminobuttersäure. **1** ist nach Auskunft des ¹H-NMR-Spektrums konformativ nicht einheitlich. Mit Alkaliionen konnte bisher keine Komplexbildung nachgewiesen werden; antibiotische Wirkung wurde nicht beobachtet.

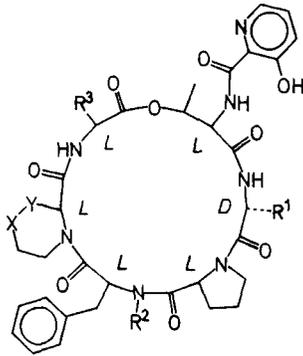
Synthesis of the Streptogramin B Analogue Cyclodepsipeptide *cyclo*[-(Boc)Ser-D-Abu-Pro-(Me)Phe-Pip-Phg-O-]

The synthesis of *cyclo*[-(Boc)Ser-D-Abu-Pro-(Me)Phe-Pip-Phg-O-] (1), an analogue of the virginiamycin antibiotics, is described. The dipeptide **11** containing the ester bond was condensed with the tetrapeptide **12**. Cyclization of the linear, deprotected hexadepsipeptide **15** was performed between serine and D-2-aminobutyric acid. The ¹H NMR spectra of **1** exhibit no unique conformation. So far no evidence has been found for complexation with alkali ions or of antibiotic activity.

Die Antibiotika der Virginiamycin-Familie werden von Streptomyceten produziert und finden verbreitete Anwendung in der Tierernährung. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur teilt man sie in zwei Gruppen ein^{1,2}). Die Verbindungen der A-Gruppe sind mehrfach ungesättigte macrocyclische Lactone; die Verbindungen der B-Gruppe hingegen sind reine Peptidactone aus 6–7 Aminosäureresten und einem 3-Hydroxypicolinsäurerest der über Threonin mit dem Ringgerüst verbunden ist (Abb. 1).

Die biologische Wirkung der Streptogramin-Antibiotika äußert sich in der Hemmung der Proteinbiosynthese sensitiver Bakterien³) und möglicherweise einer Blockierung der Atmung von Rattenlebermitochondrien⁴). Ein ausgeprägter Synergismus zwischen A- und B-Komponenten^{3,5}) und eine Abhängigkeit der antibiotischen Wirkung von der Konzentration an Kalium-, Magnesium- und Ammoniumionen⁶) wird in der Literatur beschrieben.

Bei Leitfähigkeitsmessungen an Lipid-Membranen wurde festgestellt, daß die B-Komponenten den passiven Transport von ein- und zweiwertigen Kationen durch Membranen erleichtern⁷). Es werden unterschiedliche Bindungsstellen für Kationen



	R ¹	R ²	X	Y	R ³
S ₁	C ₂ H ₅	CH ₃	CO	CH ₂	C ₆ H ₅
S ₂	C ₂ H ₅	H	CHOH	CH ₂	C ₆ H ₅
S ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	CO	CHOH	C ₆ H ₅
S ₄	CH ₃	CH ₃	CO	CH ₂	C ₆ H ₅
S ₅	C ₂ H ₅	CH ₃	CHOH	CH ₂	CH ₃

Abb. 1. Allgemeine Struktur der B-Komponenten von Virginiamycin

angenommen^{8,9,10}, für deren weitere Aufklärung Verbindungen von Interesse sind, die sich hauptsächlich durch das Fehlen des 3-Hydroxypicolinsäurerests von den normalen Antibiotika unterscheiden. Eine Abspaltung des 3-Hydroxypicolinsäurerestes ausgehend von den natürlichen Antibiotika unter Erhaltung des Peptidlactonrests erscheint kaum möglich. Daher wurde die chemische Synthese eines analogen Depsipeptids ausgeführt.

Hierbei sollte der Zugang zum Peptidgerüst durch den Ersatz einzelner Aminosäuren gegen sterisch anspruchlosere und synthetisch einfacher zugängliche Aminosäuren erleichtert werden^{11,12}. Gegenüber Virginiamycin S₁ (Abb. 1) werden deshalb Threonin durch Serin und 4-Oxopipicolinsäure durch Pipicolinsäure (Pip) ersetzt. Der Raumbedarf der 3-Hydroxypicolinsäure sollte durch die Boc-Schutzgruppe am Serin simuliert werden. Die Verbindung 1, *cyclo*[-(Boc)Ser-D-Abu-Pro-(Me)Phe-Pip-Phg-O-] (Abb. 2) wurde deshalb als Synthesziel ausgewählt.

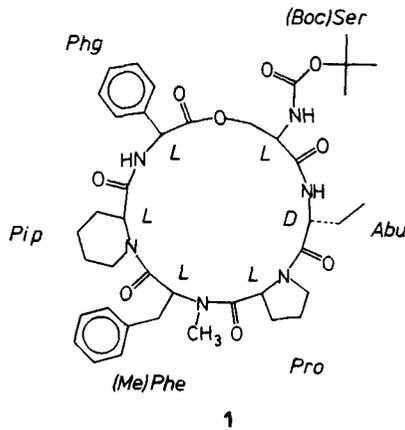


Abb. 2. Zielverbindung *cyclo*[-(Boc)Ser-D-Abu-Pro-(Me)Phe-Pip-Phg-O-] (1)

Synthese

Die Hauptprobleme der Synthese von Streptograminen der B-Gruppe oder deren Analogen sind die Herstellung und Verwendung von ungewöhnlichen, nichtessentiellen Aminosäuren und eine Lactonbindung, die spezielle Schutzgruppen- und Kupplungstechniken erfordert. Bei allen bisher erfolgreichen Depsipeptidsynthesen gelang der Ringschluß nur über eine Amidbindung, nicht jedoch über die Esterbindung¹³⁻¹⁶. Bei der vorliegenden Synthese sollte die Esterbindung deshalb frühzeitig auf der Stufe des Esterdipeptids geknüpft und ein durch Fragmentkondensation hergestelltes Tetrapeptid ankondensiert werden. Neuere Cyclisierungsstudien an Hexapeptiden¹⁷ legten eine Cyclisierung des entschützten Hexapeptids mit N-terminaler D-2-Aminobuttersäure (D-Abu) nahe.

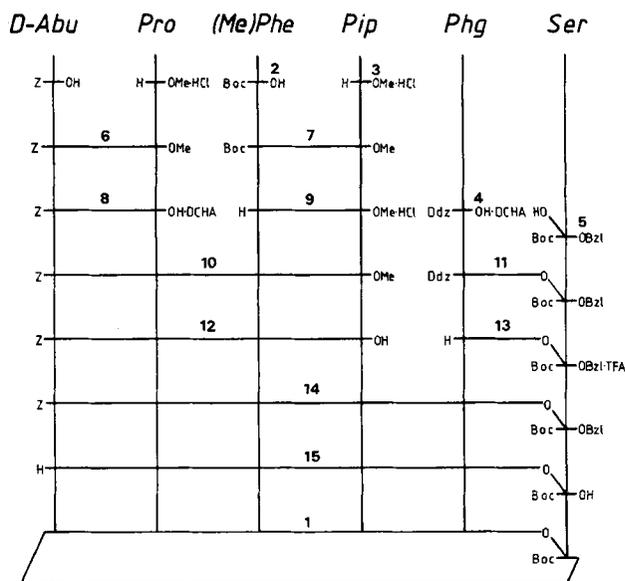


Abb. 3. Syntheschema

Nach dem Syntheschema (Abb. 3) wurde die Esterbindung zwischen Phenylglycin (Phg) und Serin auf der Stufe des Dipeptids hergestellt. Man benötigt drei selektiv abspaltbare Schutzgruppen, deren Auswahl durch die basenlabile Esterbindung eingeschränkt wird. Mit Ddz-Phg-OH (4, Ddz = α,α -Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxy-carbonyl) und Boc-Ser-OBzl (5) wurden geeignete Aminosäurederivate hergestellt und in guter Ausbeute (85 %) mit *n*-Propylphosphonsäureanhydrid (PPA)¹⁸ unter Zusatz von 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP)¹⁹ zum Esterdipeptid Boc-Ser(Ddz-Phg-O)-OBzl (11) gekuppelt. Bei der bekannten Neigung von Phenylglycin zur Racemisierung erwies sich dieses Reagenz als günstiger Kompromiß zwischen ausreichender Reaktivität und geringer Racemisierung²⁰. Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen konnte die Racemisierung von anfangs 35 % auf 10 % gesenkt werden. Der Grad der Racemisie-

rung und damit das Verhältnis der diastereomeren Dipeptidester wurde anhand der 270-MHz- ^1H -NMR-Spektren bestimmt. Als Sonde dienten die Signale der diastereomeren NH- und $\text{C}^{\alpha}\text{H}$ -Gruppe des Phenylglycins. Der so bestimmte Racemisierungsgrad konnte mit den Drehwerten korreliert werden. Eine Trennung der diastereomeren Esterdipeptide durch Dünnschichtchromatographie (DC), Mitteldruck- (MPLC) oder Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) gelang weder mit dem geschützten **11** noch mit dem entschützten Dipeptid **13**. Da eine Trennmöglichkeit auf der Stufe der Cyclopeptide erwartet wurde (s. u.), konnte mit dem Diastereomerengemisch weitergearbeitet werden. Die Abspaltung der Ddz-Schutzgruppe gelingt mit 3proz. Trifluoressigsäure in Methylendichlorid (30 Minuten) zu **13**.

Die restlichen 4 Aminosäuren wurden durch Fragmentkondensation mit dem Tetrapeptid Z-D-Abu-Pro-(Me)Phe-Pip-OH (**12**) eingeführt. Dessen Vorläufer, das geschützte Tetrapeptid Z-D-Abu-Pro-(Me)Phe-Pip-OMe (**10**) wurde aus den Dipeptidfragmenten **8** und **9** durch Kondensation hergestellt. Das geschützte Dipeptid Z-D-Abu-Pro-OMe (**6**) wurde durch Kupplung nach der DCC/HOBT-Methode²¹) mit 90proz. Ausbeute erhalten und durch alkalische Verseifung in das bekannte, C-terminal ungeschützte Dipeptid **8** (DCHA-Salz)¹⁴) umgewandelt (70% Ausbeute). Das Dipeptid Boc-(Me)Phe-Pip-OMe (**7**) wurde mit PPA als Kupplungsreagenz mit 87proz. Ausbeute hergestellt. Abspaltung der Boc-Schutzgruppe mit 2 N HCl in Dioxan (95% Ausbeute) ergibt das entschützte Dipeptid **9**. Die Fragmentkondensation von **8** und **9** zum Tetrapeptid **10** gestaltete sich schwierig¹⁴). Nur mit PPA als Kupplungsreagenz und eine nachfolgende Reinigung durch Gelchromatographie lieferte sauberes Tetrapeptid **10** mit maximal 37proz. Ausbeute. Anschließende alkalische Verseifung ergab das C-terminal freie Tetrapeptid **12**. Das geschützte lineare Hexadepsipeptid **14** wurde durch Fragmentkondensation von **12** und **13** mit PPA als Kupplungsreagenz und Reinigung durch Gelchromatographie mit 54proz. Ausbeute als Diastereomerengemisch (siehe **11**) erhalten.

Die C- und N-terminalen Schutzgruppen des Hexadepsipeptids wurden anschließend durch Behandlung mit Ammoniumformat und Palladium/Aktivkohle (10% Pd)²²) in Methanol hydrogenolysiert und das lineare, entschützte Hexapeptid **15** (Diastereomerengemisch) mit 92proz. Ausbeute isoliert.

Die Cyclisierung des linearen Hexadepsipeptids **15** erfolgte mit 20fachem Überschuß DCC/HOBT in Methylendichlorid. Nach Gelchromatographie wurden mit 44proz. Ausbeute die zwei diastereomeren Cyclodepsipeptide isoliert. Durch HPLC mit Methanol/Wasser (4:1) als Laufmittel konnten die diastereomeren Cyclopeptide getrennt und isoliert werden. Die Reinheit der Zielverbindung **1** (Hauptfraktion) wurde anschließend nochmals durch HPLC in Acetonitril/Wasser (9:1) geprüft. Das Verhältnis der isolierten Cyclopeptide entsprach dem durch NMR-Spektroskopie an dem Esterdipeptid **11** bestimmten Diastereomerenverhältnis von 9:1.

Eigenschaften der Zielverbindung

NMR-Untersuchungen der Zielverbindung **1** zeigen, daß diese auch in verschiedenen Lösungsmitteln in mehreren Konformationen vorliegt. Man erkennt bei Raumtemperatur mehrere zusätzliche, zum Teil verbreiterte Signale. Beim Abkühlen verschärfen sich einzelne Signale, während beim Erwärmen auf 100°C reversible Koaleszenz beobachtet

wird. Diese Erscheinungen sind bei Peptiden mit *N*-alkylierten Aminosäuren häufig und werden auf *cis-trans*-Isomerie an der entsprechenden Peptidbindung zurückgeführt. Das Ausmaß der konformativen Inhomogenität ist bei **1** deutlich größer als bei Virginiamycin S₁ und Patricin B²³⁾, die beide den Hydroxypicolinsäurerest enthalten. Letzterer scheint daher einen konformationsstabilisierenden Effekt zu haben. Vorläufige Komplexierungsstudien mit Alkaliionen in Methanol, die mit Hilfe von UV- und CD-Messungen vorgenommen wurden, zeigten keine nachweisbaren Effekte.

Die Untersuchung der mikrobiologischen Aktivität des Cyclopeptids gegen *M. luteus* (DSM, Göttingen) und *B. subtilis* (Merck) erfolgte im Reihenverdünnungstest in Mueller-Hinton-Bouillon (Merck). **1** wurde vor der Beimpfung als ethanolische Lösung zum Kulturmedium gegeben. Der Ethanolgehalt betrug danach 2%. Bei Cyclopeptidkonzentrationen bis zu 4×10^{-5} M konnte nach 28 Stunden Inkubationszeit (*B. subtilis* bei 37°C; *M. luteus* bei 30°C) keine Wachstumshemmung der Mikroorganismen beobachtet werden. In Gegenwart von Virginiamycin S₁ war bei Konzentrationen oberhalb 4×10^{-6} M unter vergleichbaren Bedingungen eine vollständige Wachstumshemmung festzustellen.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft*, dem *Fonds der Chemischen Industrie* und der *Hoechst AG* für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

*Abkürzungen*²⁴⁾: Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl, Bzl = Benzyl, DCC = Dicyclohexylcarbodiimid, DCHA = Dicyclohexylamin, Ddz = α,α -Dimethyl-3,5-dimethoxybenzyloxycarbonyl, DMAP = 4-(Dimethylamino)pyridin, HOBT = *N*-Hydroxybenzotriazol, HPLC = Hochdruckflüssigkeitschromatographie, Me(Phe) = *N*-Methylphenylalanin, NMM = *N*-Methylmorpholin, Phg = Phenylglycin, Pip = Pípecolinsäure, PPA = *n*-Propylphosphonsäureanhydrid, TFA = Trifluoressigsäure, Z = Benzyloxycarbonyl.

Schmelzpunkte (unkorrigiert): Schmelzpunktapparat nach Dr. Tottolli. – Dünnschichtchromatographie: Fertigfolien SIF der Fa. Riedel-de Haën; Laufmittel A: Chloroform/Methanol/Eisessig (95:5:3), Laufmittel B: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (3:1:1), Laufmittel C: Essigsäureethylester/*n*-Butanol/Pyridin/Wasser (20:10:3:5). Die Flecke wurden unter der UV-Lampe und in der Iodkammer sichtbar gemacht. – Optische Drehungen: Polarimeter Nr. 141 der Fa. Perkin-Elmer. – HPLC-Trennung: Gerät ALC/GPC 204 der Fa. Waters, ausgestattet mit einer halbpräparativen „Reverse-Phase-C-18“-Säule (μ -Bondapak, 10×250 mm). – Massenspektren: Massenspektrometer SM-1B der Fa. Varian. – Zur weiteren Identifizierung wurden IR- und NMR-Spektren der Verbindungen aufgenommen. – Eindampfoperationen wurden schonend im Rotationsverdampfer vorgenommen.

Die Aminosäuren *H*-L-Phg-OH und *H*-D-Abu-OH wurden aus den billigen DL-Aminosäuren durch enzymatische Racematspaltung²⁵⁾ hergestellt. Das erhaltene Chloracetyl-D-Abu-OH wurde durch 2 N HCl in *H*-D-Abu-OH · HCl übergeführt; Schmp. 218–220°C, $[\alpha]_{20}^{589} = -19.4$ ($c = 1$, 1 N HCl). – *H*-L-Pip-OH wurde durch fraktionierende Kristallisation der Chininsalze von Z-DL-Pip-OH (analog Lit.²⁶⁾) erhalten und Z-L-Pip-OH in das benötigte Derivat H-Pip-OME · HCl (**3**) übergeführt. Vergleiche mit Z-Pip-OH und H-Pip-OME · HCl, hergestellt aus käuflicher *H*-L-Pip-OH, ergaben identische analytische Daten; Z-Pip-OH: Schmp. 102–105°C, $[\alpha]_{20}^{589} = -37.95$ ($c = 1$, absol. Ethanol).

Boc-(Me)Phe-OH (2) wurde analog Lit.²⁷⁾ hergestellt; Ausb. 86%, Schmp. 85–86°C (Lit.^{27b)}: 80–84°C), $R_F(A) = 0.5$, $R_F(B) = 0.71$, $R_F(C) = 0.65$. – ¹H-NMR (60 MHz, CDCl₃): δ = 9.7 (s, 1H, CO₂H), 7.2 (s, 5H, Aromat), 4.7 (m, 1H, C^αH), 3.0–3.2 (dd, 2H, C^βH₂), 2.7 (s, 2H, NCH₃), 1.4 (s, 9H, *tert*-Butyl). – $[\alpha]_{20}^{589} = -84.9$ ($c = 1$, absol. Methanol).

H-Pip-OMe·HCl (3) konnte nach der allgemeinen Vorschrift für Aminosäure-methylesterhydrochloride²⁸⁾ erhalten werden; Ausb. 82%, Schmp. 169°C²⁹⁾. – ¹H-NMR (270 MHz, [D₆]DMSO): δ = 9.6 (breit, 2H, ⁺NH₂), 4.1 (dd, 1H, C^αH), 3.6 (s, 3H, OCH₃), 3.2 (d, $J = 12$ Hz, 1H, C^εH), 2.9 (m, 1H, C^εH), 2.1 (dd, 1H, C^βH), 1.5–1.8 (m, 5H, C^δH₂, C^γH₂, C^βH). – $[\alpha]_{20}^{589} = -7.47$ ($c = 0.5$, absol. Methanol).

C₇H₁₄ClNO₂ (179.63) Ber. C 46.81 H 7.85 N 7.80 Gef. C 46.64 H 7.75 N 7.76

Ddz-Phe-OH·DCHA (4) konnte nach der allgemeinen Vorschrift³⁰⁾ für Ddz-Aminosäuren hergestellt werden; Ausb. 62%, Schmp. 126–130°C, $R_F(A) = 0.64$, $R_F(B) = 0.68$, $R_F(C) = 0.57$. – ¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃): δ = 7.8 (breit, 2H, ⁺NH₂), 7.3 (m, 5H, Aromat), 6.5 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H, Aromat-Ddz), 6.33 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, Aromat-Ddz), 5.0 (d, 1H, C^αH), 3.7 (s, 6H, Ddz-OCH₃), 2.7 (m, 2H, DCHA), 1.67 (s, 6H, Ddz- α,α -Dimethyl), 1.0–1.8 (m, 20H, DCHA). – $[\alpha]_{20}^{589} = +45.54$ ($c = 1$, absol. Methanol).

Boc-Ser-OBzl (5) stellten wir analog Lit.³¹⁾ her; Ausb. 90%, Schmp. 64–67°C, $R_F(A) = 0.37$, $R_F(B) = 0.57$, $R_F(C) = 0.75$. – ¹H-NMR (270 MHz, [D₆]DMSO): δ = 7.35 (m, 5H, Aromat), 7.0 (d, $J = 8$ Hz, 1H, NH), 5.1–5.2 (dd, 2H, Bzl-CH₂), 4.95 (t, $J = 6$ Hz, 1H, OH), 4.15 (m, 1H, C^αH), 3.7 (m, 2H, C^βH), 1.35 (s, 9H, *tert*-Butyl). – $[\alpha]_{20}^{589} = -17.26$ ($c = 1$, absol. Methanol).

C₁₅H₂₁NO₅ (295.3) Ber. C 61.01 H 7.16 N 4.74 Gef. C 60.97 H 6.97 N 4.86

Z-D-Abu-Pro-OMe (6): Zu einer Lösung von 4.40 g (18.5 mmol) Z-D-Abu-OH¹⁴⁾, 3.31 g (20.0 mmol) H-Pro-OMe·HCl und 2.50 g (18.5 mmol) HOBT in 75 ml Methylendichlorid werden bei –15°C 2.2 ml (20 mmol) NMM gegeben und danach 4.12 g (20.0 mmol) DCC in 35 ml Methylendichlorid zuge tropft. Nach der üblichen Aufarbeitung²¹⁾ wird das Produkt als Öl erhalten. Ausb. 6.05 g (90%); $R_F(A) = 0.52$, $R_F(B) = 0.46$, $R_F(C) = 0.5$. – ¹H-NMR (90 MHz, CDCl₃): δ = 7.3 (s, 5H, Aromat), 5.6 (breit, 1H, NH), 5.05 (s, 2H, Z-CH₂), 4.35–4.50 (m, 2H, Abu-C^αH, Pro-C^αH), 3.7 (s, 3H, OCH₃), 3.5–3.7 (m, 2H, Pro-C^βH₂), 1.6–2.2 (m, 6H, Pro-C^γH₂, Pro-C^δH₂, Abu-C^βH₂), 0.9 (m, 3H, Abu-C^γH₃). – $[\alpha]_{20}^{589} = -32.2$ ($c = 1.3$, absol. Methanol).

Boc-(Me)Phe-Pip-OMe (7): 3.9 g (14 mmol) **2** und 2.5 g (14 mmol) **3** werden in 60 ml Methylendichlorid gelöst, auf –15°C abgekühlt und mit 7.3 ml (66 mmol) NMM versetzt. Unter Stickstoff werden dann 12.3 g (28.0 mmol) PPA-Lösung¹⁸⁾ (50% in Methylendichlorid; 0.88 g/mmol) zuge tropft. Nach langsamen Erwärmen wird 2 d bei Raumtemp. gerührt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand zwischen 400 ml Essigsäure-ethylester und 200 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung verteilt. Die organische Phase wird 2mal mit gesättigter NaHCO₃-Lösung, 1 mal mit gesättigter NaCl-Lösung, 2mal mit 5proz. Citronensäure-Lösung und nochmals mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die vereinigten Essigsäure-ethylester-Phasen werden mit MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand aus Diethylether/Petrolether umkristallisiert. Ausb. 4.9 g (87%), Schmp. 74–78°C, $R_F(A) = 0.51$, $R_F(B) = 0.32$, $R_F(C) = 0.36$. – ¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃)³²⁾: δ = 7.2 (m, 5H, Aromat), 5.4 (m, 1H, Phe-C^αH), 5.0 (m, 1H, Pip-C^αH), 4.0 (m, 1H, Pip-C^εH), 3.8 (m, 1H, Pip-C^εH), 3.7 (m, 3H, OCH₃), 2.95–3.20 (m, 2H, Phe-C^βH₂), 2.7–2.9 (m, 3H, NCH₃), 2.1–2.3 (m, 1H, Pip-C^βH), 1.3–1.8 (m, 5H, Pip), 1.1–1.4 (m, 9H, *tert*-Butyl). – $[\alpha]_{20}^{589} = -143.36$ ($c = 1$, absol. Methanol).

C₂₂H₃₂N₂O₅ (404.5) Ber. C 65.33 H 7.97 N 6.93 Gef. C 65.35 H 8.00 N 7.16

Z-D-Abu-Pro-OH-DCHA (8): 14.5 g (40.0 mmol) **6** werden in 132 ml Ethanol gelöst und 41.2 ml 1 N NaOH zugegeben. Die Lösung wird 2 h bei Raumtemp. gerührt, mit 132 ml Wasser versetzt und das Ethanol i. Vak. entfernt. Die wäßrige Lösung wird dann mit 2 N HCl auf pH 2 angesäuert, mit Essigsäure-ethylester extrahiert, und die vereinigten organischen Phasen werden mit MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand in Diethylether gelöst. Nach Zugabe von 6.2 ml (33.6 mmol) DCHA kristallisiert das Produkt in der Kälte aus. Ausb. 14.4 g (70 %), Schmp. 109–111 °C (Lit.¹⁴): 112–114 °C), $R_F(A) = 0.31$, $R_F(B) = 0.41$, $R_F(C) = 0.35$. – ¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃): δ = 11.6 (breit, 2H, +NH₂), 7.3 (m, 5H, Aromat), 5.9 (breit, 1H, NH), 5.1 (m, 2H, Z-CH₂), 4.2–4.4 (m, 2H, Abu-C^αH, Pro-C^αH), 3.6–3.8 (m, 2H, Pro-C^βH₂), 2.7 (m, 2H, DCHA), 2.2 (m, 1H, Pro-C^βH), 1.0–1.95 (m, 25H, DCHA, Abu-C^βH₂, Pro-C^βH, Pro-C^γH₂), 0.9 (m, 3H, Abu-C^γH₃). – $[\alpha]_{20}^{589} = -24.32$ (c = 1, absol. Ethanol).

H-(Me)Phe-Pip-Ome-HCl (9): Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe werden 4.6 g (11.3 mmol) **7** in einem 20fachen Überschuß von 2 N HCl in Dioxan 2 h gerührt. Danach wird eingengt, mehrfach in Methanol aufgenommen und wieder eingedampft; Ausb. 3.65 g (95 %). Das erhaltene Salz ist sehr hygroskopisch und wird zu einem Schaum getrocknet. $R_F(A) = 0.1$, $R_F(B) = 0.15$, $R_F(C) = 0.12$. – ¹H-NMR (60 MHz, CDCl₃): δ = 10.8 (breit, 2H, +NH₂), 7.2 (m, 5H, Aromat), 5.3 (m, 1H, Phe-C^αH), 4.5–4.9 (m, 1H, Pip-C^αH), 3.7 (s, 3H, OCH₃), 3.0–3.5 (m, 4H, Phe-C^βH₂, Pip-C^βH₂), 2.2 (m, 1H, Pip-C^βH), 1.0–1.85 (m, 5H, Pip). – $[\alpha]_{20}^{589} = -69.6$ (c = 1, absol. Methanol).

Z-D-Abu-Pro-(Me)Phe-Pip-Ome (10): Die Kupplung erfolgt nach der üblichen PPA-Methode wie für **7** beschrieben mit 3.67 g (11.0 mmol) **8** und 3.90 g (11.4 mmol) **9**; Reaktionsdauer 4 d bei Raumtemp. Das nach der Aufarbeitung erhaltene Rohprodukt wird durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 mit DMF als Laufmittel gereinigt. Das Produkt wurde zu einem festen Schaum getrocknet. Ausb. 2.5 g (37 %), $R_F(A) = 0.79$, $R_F(B) = 0.55$, $R_F(C) = 0.66$. – ¹H-NMR (270 MHz, [D₆]DMSO)³²): δ = 7.8 (d, J = 10 Hz, 1H, NH), 7.35 (m, 5H, Z-Aromat), 7.2 (m, 5H, Phe-Aromat), 5.5 (m, 1H, Phe-C^αH), 5.2 (m, 1H, Pip-C^αH), 5.0 (s, 2H, Z-CH₂), 4.3–4.7 (m, 2H, Abu-C^αH, Pro-C^αH), 3.6 (m, 3H, OCH₃), 3.3–3.7 (m, 5H, Phe-C^βH, Pro-C^βH₂, Pip-C^βH₂), 2.95 (m, 3H, NCH₃), 2.6 (m, 1H, Phe-C^βH), 2.0–2.3 (m, 2H, Pip-C^βH, Pro-C^βH), 1.2–1.9 (m, 10H, Abu-C^βH₂, Pro, Pip), 0.6–0.85 (m, 3H, Abu-C^γH₃). – $[\alpha]_{20}^{589} = -137.38$ (c = 0.5, absol. Methanol). – MS (70 eV, 150 °C): $m/z = 620$ (M⁺).

Boc-Ser(Ddz-Phg-O)-OBzl (11): 2.40 g (8.15 mmol) **5**, 4.52 g (8.15 mmol) **4**, sowie 0.99 g (8.15 mmol) DMAP werden in 70 ml Methyldichlorid gelöst und auf –15 °C abgekühlt. Es werden 2.3 ml (21 mmol) NMM zugegeben und anschließend unter Stickstoff 7.17 g (16.5 mmol) PPA-Lösung¹⁸) zugetropft. Nach 1.5 h bei –10 °C wird 3 d bei –2 °C stehengelassen. Das Lösungsmittel wird i. Vak. entfernt und der Rückstand in 200 ml Essigsäure-ethylester und 100 ml Wasser aufgenommen. Die organische Phase wird dann 2mal mit Wasser, 2mal mit 5proz. Citronensäure-Lösung und 1mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Trocknen mit MgSO₄ wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt und das Produkt zu einem festen Schaum getrocknet. Ausb. 4.5 g (85 %), $R_F(A) = 0.83$, $R_F(B) = 0.65$, $R_F(C) = 0.75$. – IR (KBr): 1745 cm⁻¹ (Ester-C=O). – ¹H-NMR (270 MHz, [D₆]DMSO): δ = 8.20 (d, J = 8 Hz, 0.9H, Phg-NH des LL-Diastereomeren), 8.16 (d, J = 8 Hz, 0.1H, Phg-NH des DL-Diastereomeren), 7.2–7.4 (m, 11H, Ser-NH, OBzl-Aromat, Phg-Aromat), 6.5 (d, 2H, Ddz-Aromat), 6.3 (t, 1H, Ddz-Aromat), 5.3 (d, J = 8 Hz, 0.1H, Phg-C^αH des DL-Diastereomeren), 5.2 (d, J = 8 Hz, 0.9H, Phg-C^αH des LL-Diastereomeren), 5.0 (q, 2H, OBzl-CH₂), 4.25–4.45 (m, 3H, Ser-C^βH₂, Ser-C^αH), 3.7 (s, 6H, Ddz-OCH₃), 1.6–1.7 (2s, 6H, Ddz-α,α-dimethyl), 1.3–1.4 (2s, 9H, tert-Butyl). – $[\alpha]_{20}^{589} = +40.7$ (c = 1, CHCl₃).

C₃₅H₄₂N₂O₁₀ (650.7) Ber. C 64.60 H 6.51 N 4.31 Gef. C 64.31 H 6.37 N 4.14

Z-D-Abu-Pro-(Me)Phe-Pip-OH (12): Die Verseifung von **10** erfolgt wie für **8** beschrieben. Das Produkt wird zu einem festen Schaum getrocknet. Ausb. 85 %, $R_F(A) = 0.42$, $R_F(B) = 0.37$, $R_F(C) = 0.47$. – $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$)³²: $\delta = 9.0$ (breit, 1 H, CO_2H), 7.6 (d, $J = 10$ Hz, 1 H, NH), 7.4 (m, 5 H, Z-Aromat), 7.1 (m, 5 H, Phe-Aromat), 5.2–5.5 (m, 2 H, Phe- C^αH , Pip- C^αH), 5.05 (s, 2 H, Z- CH_2), 4.2–4.8 (m, 2 H, Abu- C^αH , Pro- C^αH), 3.3–3.6 (m, 4 H, Pro- C^βH_2 , Pip- C^βH_2), 2.9–3.1 (m, 4 H, NCH_3 , Phe- C^βH), 2.7 (m, 1 H, Phe- C^βH), 1.1–2.2 (m, 12 H, Abu- C^βH_2 , Pip, Pro), 0.6–0.9 (m, 3 H, Abu- $\text{C}^\gamma\text{H}_3$). – $[\alpha]_{20}^{589} = -134.83$ ($c = 0.5$, absol. Methanol).

$\text{C}_{33}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_7$ (606.7) Ber. C 65.33 H 6.97 N 9.23 Gef. C 65.41 H 7.00 N 9.30

Boc-Ser(H-Phg-O)-OBzl-TFA (13): 2.3 g (3.5 mmol) **11** werden in 26.8 ml Methylenchlorid gelöst und 1.2 g (0.5 mmol) TFA zugegeben (3 % TFA in Methylenchlorid)³³. Die Lösung wird 30 min bei Raumtemp. gerührt und dann eingengt. Der Rückstand wird aus Diethylether/Petrol-ether umkristallisiert. Ausb. 1.42 g (75 %), Schmp. 143–146 °C, $R_F(A) = 0.26$, $R_F(B) = 0.45$, $R_F(C) = 0.55$. – IR (KBr): 1750 cm^{-1} (Ester-C=O). – $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 9.0$ (breit, 3 H, $^+\text{NH}_3$), 7.5 (m, 5 H, OBzl-Aromat), 7.3 (m, 6 H, Ser-NH, Phg-Aromat), 5.3 (2s, 1 H, Phg- C^αH), 5.0 (q, 2 H, OBzl- CH_2), 4.3–4.5 (m, 3 H, Ser- C^βH_2 , Ser- C^αH), 1.3–1.4 (2s, 9 H, *tert*-Butyl). – $[\alpha]_{20}^{589} = -4.37$ ($c = 1$, absol. Methanol).

$\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_8$ (542.5) Ber. C 55.35 H 5.39 N 5.16 Gef. C 55.74 H 5.27 N 4.97

Boc-Ser[Z-D-Abu-Pro-(Me)Phe-Pip-Phg-O]-OBzl (14): Die Darstellung und Aufarbeitung erfolgt wie für **7** beschrieben mit 1.9 g (1.3 mmol) **12** und 1.9 g (3.5 mmol) **13**. Das erhaltene Rohprodukt wird durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 mit DMF als Laufmittel gereinigt und das gereinigte Produkt aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Ausb. 1.7 g (54 %), Schmp. 82–87 °C, $R_F(A) = 0.45$, $R_F(B) = 0.27$, $R_F(C) = 0.37$. – IR (KBr): 1745 cm^{-1} (Ester-C=O). – $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 8.6$ (breit, 1 H, Phg-NH), 7.7 (d, $J = 10$ Hz, 1 H, Abu-NH), 7.35 (m, 15 H, Z-Aromat, OBzl-Aromat, Phg-Aromat), 7.15 (m, 6 H, Phe-Aromat, Ser-NH), 5.1–5.6 (m, 3 H, Phg- C^αH , Phe- C^αH , Pip- C^αH), 5.0–5.1 (m, 4 H, Z- CH_2 , OBzl- CH_2), 4.2–4.8 (m, 5 H, Ser- C^βH_2 , Ser- C^αH , Pro- C^αH , Abu- C^αH), 3.2–3.7 (m, 4 H, Pip- C^βH_2 , Pro- C^βH_2), 2.7–3.1 (m, 5 H, N-CH_3 , Phe- C^βH_2), 1.1–2.2 (m, 12 H, Abu- C^βH_2 , Pip, Pro), 1.4 (s, 9 H, *tert*-Butyl), 0.6–0.85 (m, 3 H, Abu- $\text{C}^\gamma\text{H}_3$). – $[\alpha]_{20}^{589} = -63.66$ ($c = 0.5$, absol. Methanol).

$\text{C}_{56}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_{12}$ (1017.2) Ber. C 66.12 H 6.74 N 8.26 Gef. C 66.23 H 6.74 N 8.07

Boc-Ser[H-D-Abu-Pro-(Me)Phe-Pip-Phg-O]-OH (15): 0.85 g (0.84 mmol) **14** werden in 10 ml absol. Methanol gelöst und 0.42 g (6.7 mmol) Ammoniumformat zugegeben²². Nach Zugabe von 0.25 g Palladium/Aktivkohle (10 % Pd) wird die Lösung 2 h bei Raumtemp. gerührt. Der Katalysator wird abfiltriert, die Lösung eingedampft, und der Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen. Die Methylenchlorid-Phase wird 2mal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und mit NaSO_4 getrocknet. Nach dem Eindampfen (Rotationsverdampfer) wird **15** als fester Rückstand erhalten. Ausb. 0.61 g (92 %), Schmp. 140–160 °C (Zers.), $R_F(A) = 0.1$, $R_F(B) = 0.32$, $R_F(C) = 0.31$. – IR (KBr): 1745 cm^{-1} (Ester-C=O). – $^1\text{H-NMR}$ (270 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 8.5$ –8.6 (2d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, Phg-NH), 7.4 (m, 5 H, Phg-Aromat), 7.2 (m, 7 H, Phe-Aromat, Abu- NH_2), 6.2 (d, $J = 8$ Hz, 1 H, Ser-NH), 5.1–5.6 (m, 3 H, Phg- C^αH , Phe- C^αH , Pip- C^αH), 3.9–4.8 (m, 5 H, Ser- C^βH_2 , Ser- C^αH , Pro- C^αH , Abu- C^αH), 3.1–3.7 (m, 4 H, Pip- C^βH_2 , Pro- C^βH_2), 2.6–3.1 (m, 5 H, N-CH_3 , Phe- C^βH_2), 1.2–2.3 (m, 12 H, Abu- C^βH_2 , Pip, Pro), 1.4 (s, 9 H, *tert*-Butyl), 0.5–0.9 (m, 3 H, Abu- $\text{C}^\gamma\text{H}_3$). – $[\alpha]_{20}^{589} = -70.59$ ($c = 0.5$, absol. Methanol).

$\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{N}_6\text{O}_{10}$ (792.9) Ber. C 62.10 H 7.11 N 10.60 Gef. C 61.64 H 6.92 N 10.18

cyclof-(Boc)Ser-D-Abu-Pro-(Me)Phe-Pip-Phg-O-J (1): Wie für 6 beschrieben, werden 594 mg (0.75 mmol) 15 und 202 mg (1.50 mmol) HOBT in 750 ml Methyldichlorid gelöst (\approx 1 mmol Peptid/1 l Lösungsmittel) und mit 3.09 g (15 mmol) DCC versetzt; Reaktionsdauer 6 d bei Raumtemp. Das nach der Aufarbeitung³⁴⁾ erhaltene Rohprodukt wird durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 mit DMF als Laufmittel gereinigt; Ausb. 255 mg (44%). – Das Diastereomerenmisch wurde durch HPLC mit Methanol/Wasser (4:1) als Laufmittel getrennt (Bedingungen: 60 μ l pro Injektion, 2.3 ml/min; Hauptfraktion: R_F = 8.8, Nebenfraktion: R_F = 8.0). – Die Reinheit der Hauptfraktion wurde durch HPLC mit Acetonitril/Wasser (9:1) als Laufmittel geprüft. (Bedingungen: 60 μ l pro Injektion, 2.0 ml/min; R_F = 5.9). Das Produkt kristallisiert aus Acetonitril/Wasser als feine Nadeln aus; Schmp. 127–135 °C (Zers.), $R_F(A)$ = 0.47, $R_F(B)$ = 0.63, $R_F(C)$ = 0.78. – IR (KBr): 1745 cm^{-1} (Ester/Lacton-C=O). – ¹H-NMR (270 MHz, CDCl₃): δ = 8.05 (breit, 1H, Phg-NH), 7.2–7.4 (m, 10H, Phe-Aromat, Phg-Aromat), 6.6 (breit, 1H, Abu-NH), 6.3 (breit, 1H, Ser-NH), 5.3–5.8 (m, 2H, Phg-C ^{α} H, Phe-C ^{α} H), 5.0 (d, J = 10 Hz, 1H, Pip-C ^{α} H), 4.4–4.8 (m, 5H, Ser-C ^{β} H₂, Ser-C ^{α} H, Pro-C ^{α} H, Abu-C ^{α} H), 4.1 (m, 1H, Pip-C ^{ϵ} H), 3.0–3.8 (m, 8H, Pip-C ^{ϵ} H, Pro-C ^{δ} H₂, Phe-C ^{β} H₂, NCH₃), 2.1–2.4 (m, 2H, Pip-C ^{β} H, Pro-C ^{β} H), 1.0–1.95 (m, 10H, Abu-C ^{β} H₂, Pip, Pro), 1.4–1.45 (m, 9H, *tert*-Butyl), 0.9 (m, 3H, Abu-C ^{γ} H₃). – MS (70 eV, 175 °C): m/z = 774 (M^+). – $[\alpha]_{20}^{589}$ = –99.83 (c = 0.2, absol. Methanol).

C₄₁H₅₄N₆O₉ (774.9) Ber. C 63.55 H 7.02 N 10.85 Gef. C 63.26 H 6.84 N 10.93

- 1) *D. Vazques* in Antibiotics (Hrsg. *J. W. Corcoran* und *F. E. Hahn*), Bd. III, S. 512, Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1975.
- 2) *C. Cocito*, Microbiol. Rev. **43**, 145 (1979).
- 3) *M. P. de Bethune* und *K. H. Nierhaus*, Eur. J. Biochem. **191**, 187 (1978).
- 4) *H. Dixon*, *G. M. Kellerman*, *C. H. Mitchell*, *N. H. Towers*, und *A. W. Linnane*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **43**, 780 (1971).
- 5) *C. Cocito* und *M. di Giambattista*, Mol. Gen. Genet. **166**, 53 (1978).
- 6) *R. Parfait*, *M. P. De Béthune* und *C. Cocito*, Mol. Gen. Genet. **166**, 45 (1978).
- 7) *E. Grell*, *I. Oberbäumer*, *H. Ruf* und *H. P. Zingsheim* in Biochemistry of Membrane Transport, FEBS-Symposium (Hrsg. *G. Semenza* und *E. Carafoli*), No. 42, S. 147, Springer, Berlin-Heidelberg 1977.
- 8) *I. Oberbäumer*, *P. Feigl*, *H. Ruf* und *E. Grell* in Structure and Activity of Natural Peptides – Selected Topics (Hrsg. *W. Voelter* und *G. Weitzel*), S. 523, de Gruyter, Berlin 1981.
- 9) *G. Mager*, *I. Oberbäumer*, *H. Ruf* und *E. Grell* in Transmembrane Ion Motions, 36e Reunion Internationale de la Societe de Chimie Physique, Paris, 1982; Proceedings, Elsevier, Amsterdam 1983, im Druck.
- 10) *I. Oberbäumer*, Dissertation, Univ. Göttingen 1979.
- 11) *G. Mager*, Diplomarbeit, Univ. Frankfurt 1980.
- 12) *B. Kutscher*, Diplomarbeit, Univ. Frankfurt 1981.
- 13) *Y. A. Ovchinnikov* und *V. T. Ivanov*, Heterodetic Cyclic Peptides in Org. Chem. Ser. II, Aminoacids, Peptides and Proteins, (Hrsg. *D. H. Hey* und *H. N. Rydon*), S. 218, Butterworth, London 1978.
- 14) *M. A. Ondetti* und *P. L. Thomas*, J. Am. Chem. Soc. **87**, 4373 (1965).
- 15) *E. R. Squibb and Sons, Inc.* (Erf. *M. Bodanszky*, *M. A. Ondetti* und *J. T. Sheehan*), US-Pat. 3 373 151 (12. März 1968) [Chem. Abstr. **69**, 59563 (1968)].
- 16) *C. J. Sheehan* und *S. L. Ledis*, J. Am. Chem. Soc. **95**, 875 (1973).
- 17) *S. F. Brady*, *S. L. Varga*, *R. M. Freidinger*, *D. A. Schwenk*, *M. Mendlowski*, *F. W. Holly* und *D. F. Veber*, J. Org. Chem. **44**, 3101 (1979).
- 18) *H. Wissmann* und *H.-J. Kleiner*, Angew. Chem. **92**, 129 (1980); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **19**, 133 (1980).
- 19) *B. Neises* und *W. Steglich*, Angew. Chem. **90**, 556 (1978); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **17**, 522 (1978).
- 20) *M. Kühn*, Dissertation, Univ. Frankfurt, geplant 1983.
- 21) *W. König* und *R. Geiger*, Chem. Ber. **103**, 788, 2024 (1970).
- 22) *M. K. Anwer* und *A. F. Spatola*, Synthesis **1980**, 929.

- 23) M. J. O. Anteunis, R. E. A. Callens und D. K. Tavernier, Eur. J. Biochem. **58**, 259 (1975); R. E. A. Callens und M. J. O. Anteunis, Biochim. Biophys. Acta, **577**, 324 (1979); R. E. A. Callens und M. J. O. Anteunis, ebenda **577**, 337 (1979).
- 24) Abkürzungen IUPAC-IUB Commission (1971), Biochemistry **11**, 1726 (1972).
- 25) S. M. Birnbaum, L. Lerintow, R. B. Kingsley und J. P. Greenstein, J. Biol. Chem. **194**, 455 (1952); D. Rudmann, A. Meister und J. P. Greenstein, J. Am. Chem. Soc. **74**, 551 (1952); J. P. Greenstein, J. B. Gilbert und P. J. Fodor, J. Biol. Chem. **182**, 452 (1950).
- 26) G. Jolles, G. Poiget, J. Robert, B. Terlain und J. P. Thomas, Bull. Soc. Chim. Fr. **1965**, 2252.
- 27) ^{27a)} D. H. Rich, P. Bhatnagar, P. Mathiapparanam, J. A. Grant und J. P. Tam, J. Org. Chem. **43**, 296 (1978). — ^{27b)} R. D. Jasensky, P. D. Thesis, S. 282, Univ. of Wisconsin-Madison 1979.
- 28) K.-H. Deimer, P. Thamm und P. Stelzel in Methoden der organischen Chemie (*Houben-Weyl-Müller*) (Hrsg. E. Müller und E. Wünsch), Bd. XV/1, S. 317, Thieme, Stuttgart 1974.
- 29) Während der Abfassung dieses Manuskripts wurde **3** in der Literatur beschrieben: A. Yasutake, H. Aoyagi, J. Sada, T. Kato und N. Izumiya, Int. J. Pept. Protein Res. **20**, 246 (1982); Schmp. 171–172 °C, $[\alpha]_{20}^{589} = -7.5$ ($c = 2$, Methanol).
- 30) C. Birr, W. Lochinger, G. Stalmke und P. Lang, Liebigs Ann. Chem. **763**, 162 (1972).
- 31) E. Baer, D. Buchnea und H. C. Stancer, J. Am. Chem. Soc. **81**, 2166 (1959).
- 32) Die Verbindung ist konformativ im ¹H-NMR-Spektrum nicht einheitlich und daher treten einige Signale mehrfach auf. Diese Erscheinungen sind bei Peptiden mit *N*-alkylierten Aminosäuren häufig und werden auf *cis-trans*-Isomerie an der entsprechenden Peptidbindung zurückgeführt.
- 33) C. Birr und U. Stollenwerk, Angew. Chem. **91**, 422 (1979); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **14**, 394 (1979); sowie Lit. ²⁸⁾, S. 153.
- 34) Bei der Behandlung mit Mischbettionenaustauscher in Methanol, eine übliche Reinigungsoperation nach der Cyclisierung, wird die Lactonbindung durch Umesterung gespalten und der Methylester des linearen Hexapeptids erhalten. Die Verbindung wurde anhand von IR-, NMR- und Massenspektren identifiziert.

[66/83]