

35. Synthesen in der Polymyxin-Reihe

1. Mitteilung¹⁾

Synthese eines Pentapeptid-Fragmentes

von **K. Vogler** und **P. Lanz**

(3. XII. 59)

Bei den Polymyxinen handelt es sich um eine Gruppe von nahe verwandten basischen cyclischen Oligopeptiden, die aus verschiedenen Medien durch Fermentation mittels *Bacillus polymyxa* gewonnen werden²⁾. Sie sind ausschliesslich gegen GRAM-negative Erreger wirksam. Man unterscheidet die Polymyxine A, B, C, D, und E³⁾, zu denen noch das strukturell verwandte Circulin A⁴⁾ zu rechnen ist. Als Bausteine findet man in allen Vertretern L- α , γ -Diaminobuttersäure, L-Threonin und eine optisch aktive Fettsäure, vorwiegend die (+)-drehende 6-Methyloctansäure⁵⁾. Daneben finden sich D- und L-Leucin, D-Phenylalanin, D-Serin, sowie D- α , γ -Diaminobuttersäure. Klinische Verwendung findet das Polymyxin B, das auch strukturell näher untersucht worden ist.

1954 gelang es HAUSMANN & CRAIG⁶⁾, ein Präparat von Polymyxin B durch Gegenstromverteilung im System sek.-Butanol/0,1 N HCl in zwei Fraktionen B₁ und B₂ aufzutrennen, die sich nur in der Fettsäure-Komponente unterscheiden sollen. Die Hauptfraktion, das Polymyxin B₁, wurde als einheitlich angesehen und diente zu umfangreichen Abbaueversuchen zwecks Konstitutions-Ermittlung. 1956 kamen diese Arbeiten analytisch zu einem vorläufigen Abschluss, indem HAUSMANN⁷⁾ vier alternative Strukturen für die Konstitution von Polymyxin B₁ vorschlagen konnte. Ein Jahr später kamen BIZERTE & DAUTREVAUX⁸⁾ zum selben Ergebnis, und es gelang ihnen, zusätzlich einen der 6 α , γ -Diaminobuttersäurereste als D-Form in der Seitenkette zu lokalisieren. Es handelt sich um die Strukturen A und B der Fig. 1⁹⁾, von denen jede noch mit der Unsicherheit behaftet ist, dass man nicht weiss, ob die Seitenkette am N^v- oder N^z-Atom des Verzweigungsgliedes gebunden ist.

¹⁾ Resultate der vorliegenden Veröffentlichung sind in einer Kurzmitteilung bereits bekanntgegeben worden, vgl. K. VOGLER, P. LANZ & W. LERGIER, *Experientia* 15, 334 (1959).

²⁾ R. G. BENEDICT & A. F. LANGLYKKE, *J. Bact.* 54, 24 (1947); P. G. STANSLY, R. G. SHEPHERD & H. J. WHITE, *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 87, 43 (1947); G. C. AINSWORTH, A. M. BROWN & G. BROWNLEE, *Nature* 160, 263 (1947).

³⁾ P. P. REGNA, *Amer. J. Med.* 78, 686 (1955).

⁴⁾ H. KOFFLER & T. KOBAYASHI, IV. Int. Kongress f. Biochemie, Wien 1958, Abstr. S. 1-64.

⁵⁾ S. WILKINSON, *Nature* 164, 622 (1949).

⁶⁾ W. HAUSMANN & L. C. CRAIG, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 4862 (1954).

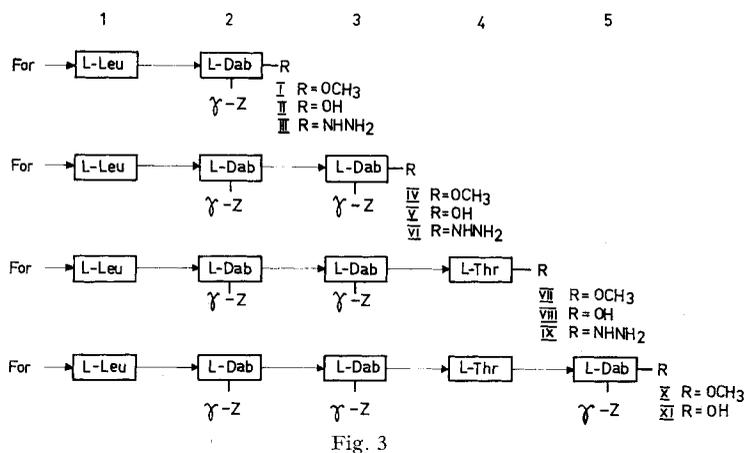
⁷⁾ W. HAUSMANN, *J. Amer. chem. Soc.* 78, 3663 (1956).

⁸⁾ G. BIZERTE & M. DAUTREVAUX, *Bull. Soc. Chim. biol.* 39, 795 (1957).

⁹⁾ Die Abkürzungen für die Aminosäuren in dieser und den folgenden Abbildungen wurden nach E. BRAND & J. T. EDSALL, *Ann. Rev. Biochemistry* 16, 224 (1947), gewählt: Dab = α , γ -Diaminobuttersäure; Ipel = Isopelargonsäure, (+)-6-Methyloctansäure; Z = Benzyloxy-carbonyl, Tos = Tosyl, For = Formyl; der Pfeil \rightarrow bedeutet die Richtung der Peptidbindung im Sinne von $-\text{CO} \rightarrow \text{NH}-$.

bringen der Seitenkette nötig ist, während für das Amino-Ende der Hauptkette der Formylrest¹³⁾ geeignet erschien. Als Kondensationsreaktion kann konsequent die Carbo-diimid-Reaktion nach SHEEHAN & HESS¹⁴⁾, und zwar inklusive der Cyclisierung, verwendet werden, doch haben wir teilweise auch die Methode der gemischten Anhydride¹⁵⁾ sowie zur Überwachung der partiellen Racemisierung¹⁶⁾ auch die CURTIUS'sche Azid-Kupplung¹⁷⁾ eingesetzt.

Die ersten α,γ -Diaminobuttersäurepeptide wurden von RUDINGER *et al.*¹⁸⁾ synthetisch gewonnen, der auch die Sonderstellung der α,γ -Diaminobuttersäure unter den basischen Aminosäuren als erster erkannte, die bekanntlich, besonders wenn sie am N^γ -Atom aktiviert ist (Tosylgruppe), unter Pyrrolidonbildung zu intramolekularem Ringschluss neigt¹⁹⁾. Wir haben aus diesem Grunde als Schutzgruppe für die γ -ständigen Aminogruppen den Benzyloxycarbonyl-Rest gewählt.



In der vorliegenden Mitteilung beschreiben wir den Aufbau des Pentapeptid-Fragmentes 1–5 nach dem Formelschema der Fig. 3. Nach diesem einfachen Schema, das keiner Erläuterung bedarf, wurde eine Aminosäure an die andere angereiht. Die Esterverseifungen gelangen durchwegs mit der berechneten Menge wässrigem Alkali und einem Lösungsvermittler wie Dioxan, Dimethylsulfoxid usw. Die OH-Gruppe des Threonins blieb ungeschützt.

Die α,γ -Diaminobuttersäure wurde ausgehend von L-Glutaminsäure durch die SCHMIDT'sche Methode nach ADAMSON²⁰⁾ bereitet, obwohl andere, allerdings kompli-

¹³⁾ A. HILLMANN & G. HILLMANN, *Z. Naturforsch.* **6b**, 340 (1951); D. E. WOLF, J. VALIANT, R. L. PECK & K. FOLKERS, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 2002 (1952); S. G. WALEY, *Chemistry & Ind.* **72**, 107 (1953); J. C. SHEEHAN & DING DJUNG H. YANG, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 1154 (1958); F. D. McLOY & J. L. SAIDEL, 133rd Natl. ACS-Meeting, 13. bis 18. April 1958.

¹⁴⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 (1955).

¹⁵⁾ R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **34**, 874 (1951); Th. WIELAND & H. BERNHARD, *Liebigs Ann. Chem.* **572**, 190 (1951); J. R. VAUGHAN & R. L. OSATO, *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 3547, 5553 (1951); **74**, 676 (1952).

¹⁶⁾ G. W. ANDERSON & F. M. CALLAHAN, *J. Amer. chem. Soc.* **80**, 2902 (1958).

¹⁷⁾ Th. CURTIUS, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **35**, 3226 (1902).

¹⁸⁾ M. ZAORAL, J. RUDINGER & F. ŠORM, *Chem. Listy* **47**, 427 (1953); *Chem. Abstr.* **49**, 179 (1955).

¹⁹⁾ K. PODUŠKA & J. RUDINGER, *Chem. Listy* **51**, 616 (1957); *Chem. Abstr.* **51**, 11251 (1957).

²⁰⁾ D. W. ADAMSON, *J. chem. Soc.* **1939**, 1564.

ziertere Verfahren, unter Umgehung der giftigen Stickstoffwasserstoffsäure, heute zur Verfügung stehen²¹). L-Threonin wurde durch Spaltung von rac. N-Phthaloyl-threonin mittels Brucin nach VÖGLER & LANZ²²) gewonnen. Das zur Herstellung von I benötigte Formyl-L-leucin²³) wurde nach SHEEHAN & YANG²³) hergestellt, während N²-Benzyloxycarbonyl-L- α,γ -diaminobuttersäure über den Cu-Komplex nach KURTZ²⁴) bereitet wurde. L-Threonin-methylester konnte erstmals als kristalline Substanz mit dem Smp. 70–72° gewonnen werden.

Tabelle. Vergleich der Schmelzpunkte und Drehungen der Zwischenprodukte nach Fig. 3
Alle optischen Drehwerte wurden in Dimethylformamid bei einer Konzentration von 2% gemessen. Die Smp. sind nicht korrigiert

Zwischenprodukt nach Fig. 3	gem. Anhydrid (Na-Salz)			SHEEHAN-Methode			Azid-Methode		
	Aus- beute	Smp.	$[\alpha]_D^{22}$	Aus- beute	Smp.	$[\alpha]_D^{22}$	Aus- beute	Smp.	$[\alpha]_D^{22}$
Dipeptidester I				70%	130–131°	– 38,1°			
Dipeptidsäure II	45%	163–164°	– 33,4°	85%	167–168°	– 34,2°			
Tripeptidester IV				75%	189–190°	– 35,2°	73%	192–193°	– 36,2°
Tripeptidsäure V	70%	203–205°	– 31,1°	70%	203–205°	– 29,7°			
Tetrapeptidester VII				46%	227–228°	– 26,1°	68%	239–240°	– 28,6°
Tetrapeptidsäure VIII	60%	211–212°	– 22,6°	80%	195–196°	– 23,6°			
Pentapeptidester X				55%	205–207°	– 32,8°	65%	205–207°	– 32,1°
Pentapeptidsäure XI				65%	198–200°	– 26,9°			

Die Zwischen- und Endprodukte, die nach dem oben erwähnten Kondensationsverfahren hergestellt wurden, haben wir zwecks Kontrolle der partiellen Racemisierung miteinander verglichen (siehe Tabelle). Es ergibt sich, dass die isolierten Produkte in ihren Konstanten nicht stark voneinander abweichen, doch gewinnt man den Eindruck, dass die nach der Azid-Methode²⁵) gewonnenen Derivate wohl den grössten Reinheitsgrad aufweisen, während die mit Hilfe der Carbodiimid-Methode erhaltenen Peptidester (z. B. VIII) vielleicht noch durch geringe Mengen Dicyclohexylharnstoff verunreinigt sind, der den Smp. etwas herunterdrückt.

Beim Studium der partiellen Racemisierung haben wir die Mutterlaugen nicht berücksichtigt, sondern lediglich festgestellt, dass mit der Methode der gemischten Anhydride, mit der Carbodiimid-Methode und mit der Azid-Methode Produkte mit ungefähr gleicher spezifischer Drehung durch Umkristallisieren oder Umfällen gewonnen werden können. Ob dies auf praktisch keine Racemisierung hinausläuft oder dem Umstand zu verdanken ist, dass das schwerlöslichste Produkt durchwegs dasjenige mit allen Bausteinen in der gleichen Konfiguration darstellt, können wir heute nicht entscheiden. Dass bei diastereomeren Peptiden diesbezüglich Löslichkeitsunterschiede auftreten können, ist von SCHNABEL²⁶) am Hexapeptid DL-Ser.DL-Ala.Gly.Gly.DL-Ala.Gly, allerdings für die verschiedenen Racemate, festgestellt worden.

²¹) TOZABURO KURIHARA & KATSUO RO, Ann. Rep. Tohoku Coll. Pharm. 3, 77 (1956), Chem. Abstr. 57, 5698 (1957); G. TALBOT, R. GAUDRY & L. BERLINGUET, Canad. J. Chemistry 36, 593 (1958); M. ZAORAL & J. RUDINGER, Coll. czechoslov. chem. Commun. 24, 1993 (1959); M. ZAORAL, *ibid.* 24, 1314 (1959).

²²) K. VÖGLER & P. LANZ, Helv. 42, 209 (1959).

²³) E. FISCHER & O. WARBURG, Ber. deutsch. chem. Ges. 38, 4000 (1901).

²⁴) A. C. KURTZ, J. biol. Chemistry 122, 477 (1938).

²⁵) N. B. NORTH & G. T. YOUNG, Chemistry & Ind. 1955, 1597.

²⁶) E. SCHNABEL, Liebigs Ann. Chem. 615, 173 (1958).

Die Ausbeuten bei der eigentlichen Kondensationsreaktion sind bei der Methode nach SHEEHAN und bei der Azid-Methode besser als bei der Methode der gemischten Anhydride. Rechnet man hingegen bei der SHEEHAN-Reaktion die Esterverseifung und bei der Azid-Methode die Herstellung der Hydrazide mit dazu, so nehmen diese Unterschiede wieder deutlich ab oder verschwinden praktisch.

Unser Synthese-Endprodukt, die For-L-leucyl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobuttersäure, haben wir durch UV.-Analyse bei 257 m μ charakterisiert. Das gefundene $\epsilon = 640$ (Eisessig) weist übereinstimmend mit der geforderten Struktur auf drei Z-Reste²⁷⁾ hin. Die Mikrotitration ergab ein Äquivalentgewicht von 923 (Ber. 963) mit einem $pK_a = 7,53$. Im Totalhydrolysat mittels 6 N HCl wurden papierchromatographisch Leucin, Threonin und Diaminobuttersäure einwandfrei nachgewiesen.

Experimenteller Teil²⁸⁾

1. *Formyl-L-leucin*. Formyl-L-leucin kann nach WALEY¹³⁾ oder nach der allgemeinen Vorschrift von SHEEHAN & YANG¹³⁾ bereitet werden. Ausbeute ca. 90%. Smp. 144–146°; $[\alpha]_D^{22} = -18,6^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1$, Alkohol abs.), in ziemlicher Übereinstimmung mit den Werten, die FISCHER & WARBURG²³⁾ für ihr Produkt erhielten, das durch Spaltung von Formyl-DL-leucin hergestellt worden war.

2. *N γ -Z-L- α,γ -diaminobuttersäure*. Eine Lösung von 77,2 g (0,5 Mol) L- α,γ -Diaminobuttersäure-monohydrochlorid in 500 ml Wasser wird unter Rühren portionenweise mit 66,5 g (0,3 Mol) basischem Kupfercarbonat versetzt und 2 $\frac{1}{2}$ Std. unter Rückfluss erhitzt. Darauf wird vom überschüssigen Kupfercarbonat abgenutscht und dieses dreimal mit je 25 ml heissem Wasser gewaschen. Das Filtrat wird auf 20° abgekühlt und portionenweise mit 95 g (0,87 Mol) Natriumhydrogencarbonat versetzt. In diese Lösung werden innerhalb einer Stunde bei 0–5° unter starkem Rühren 110 ml 90-proz. Benzylloxycarbonylchlorid eingetropf und anschliessend 16 Std. bei 20° weitergerührt. Der ausgefallene Kupferkomplex wird abgenutscht, gründlich mit Wasser, Aceton und Äther gewaschen und im Vakuum bei 90° getrocknet. Man erhält 105 g Kupferkomplex der N γ -Z-L- α,γ -diaminobuttersäure. Smp. 233–236° (Zers.)

105 g Kupferkomplex werden unter Rühren in 100 ml Methanol, 200 ml Wasser und 80 ml 37-proz. HCl gelöst. In diese Lösung wird während 1 $\frac{1}{2}$ Std. Schwefelwasserstoff eingeleitet, vom Kupfersulfid abgenutscht und dieses mit 200 ml heissem Methanol nachgewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum auf die Hälfte seines Volumens eingedampft, das Konzentrat mit 1,5 l Methanol verdünnt und mit Diäthylamin auf ein pH von 7 gestellt. Nach 4 Std. wird abgenutscht, gründlich mit Methanol und zum Schluss noch mit Äther gewaschen und im Wasserstrahlvakuum bei 90° getrocknet. Ausbeute 70,5 g (76%). Smp. 238–240°; M. ZAORAL *et al.*¹⁸⁾ geben 234–236° an.

3. *N γ -Z-L- α,γ -diaminobuttersäure-methylester-hydrochlorid*. 79 ml (2 Mol) Methanol und 7,3 ml (0,11 Mol) Thionylchlorid werden bei –10° gemischt und mit 25,2 g (0,10 Mol) N γ -Z-L- α,γ -diaminobuttersäure versetzt. Diese Mischung wird 5 Std. am Rückflusskühler unter CaCl₂-Verschluss auf 50° erwärmt und dann noch 16 Std. bei 20° belassen. Darauf wird im Wasserstrahlvakuum bei 45° zur Trockne eingedampft und noch zweimal mit Methanol abgedampft. Den Rückstand nimmt man in wenig heissem Methanol auf und versetzt nach Animpfen portionenweise mit Äther. Nach 1 Std. wird der Kristallbrei abgenutscht, mit Aceton und Äther gewaschen und im Vakuum bei 80° getrocknet. Ausbeute 24,2 g (80%). Smp. 164–166°; $[\alpha]_D^{20} = +15,2^\circ$ ($c = 2$, in Methanol). M. ZAORAL *et al.*¹⁸⁾ geben als Smp. für das entsprechende Äthylester-hydrochlorid 152–153° an.

Der *freie Ester* wird durch Ausschütteln der eiskalten mit Ammoniak auf pH 10 gestellten Lösung mit Essigester erhalten; er ist ein zähflüssiges Öl.

²⁷⁾ J. LEUBE, H. RESTLE & M. WIEDEMANN, Z. Naturforsch. 9b, 186 (1954).

²⁸⁾ Die Smp. sind nicht korrigiert und wurden auf dem Schmelzpunktsbestimmungsapparat nach TOTTOLI der Fa. BÜCHI, Flawil (Schweiz), bestimmt. – Die Analysenmuster wurden 16 Std. über P₂O₅ bei 0,01 Torr und, wenn nichts anderes angegeben, bei 110° getrocknet.

4. *L-Threonin-methylester*. 2,38 g (0,02 Mol) *L*-Threonin werden mit 30 ml 2 *N* methanolischer Salzsäure übergossen und 1 Std. unter Rückfluss gekocht; dann wird eingedampft und der Rückstand noch zweimal in gleicher Weise mit methanolischer Salzsäure behandelt. Man erhält *L*-Threonin-methylester-hydrochlorid als sirupöse Masse, die noch etwas Methanol enthält. Dieser Sirup wird in trockenem Chloroform suspendiert, mit einer 3-proz. Lösung von Ammoniak-Gas in Chloroform in etwa 10-proz. Überschuss versetzt und 15 Min. bei 0° geschüttelt. Nun wird abgenutscht und das klare Filtrat im Vakuum bei 40° eingedampft. Der zurückbleibende Sirup wird im Hochvakuum getrocknet, wobei Kristallisation eintritt. Nach dem Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther erhält man 2,40 g (90%) *L*-Threonin-methylester vom Smp. 70–72°. Zur Analyse wurde bei 25° und 0,01 Torr sublimiert. $[\alpha]_D^{25} = +5,00 \pm 0,8^\circ$ ($c = 3$, in Methanol). $C_5H_{11}O_3N$ (133,15) Ber. C 45,10 H 8,33 N 10,52% Gef. C 45,27 H 8,41 N 10,83%

5. *Formyl-L-leucyl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobuttersäure-methylester (I)*. 76 g (0,25 Mol) des Hydrochlorides von *N γ -Z-L- α,γ -Dab-OCH $_3$* (3) werden in 200 ml Dimethylformamid gelöst, auf 0° abgekühlt, mit 38 ml (0,27 Mol) Triäthylamin versetzt und geschüttelt. Nach 10 Min. wird vom ausgefallenen Triäthylamin-hydrochlorid abgetrennt und der Niederschlag mit 50 ml Dimethylformamid nachgewaschen. Im Filtrat löst man unter leichtem Erwärmen 40 g (0,25 Mol) For-*L*-Leu-OH (1), kühlt auf –10° ab, versetzt mit 54 g (0,26 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid und lässt 24 Std. bei 0° stehen. Nun wird vom ausgefallenen Harnstoff abgenutscht und das Filtrat im Vakuum bei 70° stark eingeengt. Das Konzentrat wird in 500 ml Essigester gelöst und je zweimal mit eiskalter 1 *N* Salzsäure, Wasser, *N* Ammoniak und wieder mit Wasser gewaschen. Anschliessend wird die Essigesterlösung über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum bei 50° bis zur beginnenden Kristallisation eingedampft und nach Zusatz von 300 ml Äther 5 Std. bei 0° stehen gelassen. Alsdann werden die gebildeten Kristalle abgenutscht, gründlich mit Äther gewaschen und getrocknet. Nach dem Aufarbeiten der Mutterlauge erhält man 71 g (70%) I, Smp. 130–131°, $[\alpha]_D^{25} = -38,1^\circ$ ($c = 2$, in Dimethylformamid)²⁹⁾. Zur Analyse wurde aus Essigester umkristallisiert und bei 70° getrocknet.

$C_{20}H_{29}N_3O_6$ (407,46) Ber. C 59,10 H 7,17 N 10,32% Gef. C 59,30 H 7,34 N 10,32%

6. *Formyl-L-leucyl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobuttersäure (II)*. – a) *Durch Esterverseifung*. 70 g (0,17 Mol) des Esters I werden in 420 ml Dioxan gelöst, dann wird die Lösung portionenweise mit 195 ml 1 *N* Natronlauge versetzt und in einem geschlossenen Gefäss 6 Std. bei Raumtemperatur geschüttelt. Nun wird filtriert, mit konzentrierter Essigsäure angesäuert und mit 4 l Wasser verrührt. Die Lösung wird angepft und 24 Std. bei 0° belassen. Die ausgeschiedenen Kristalle werden abgenutscht, gründlich mit Wasser und mit Äther gewaschen und im Vakuum bei 80° getrocknet, wobei man 57 g (85%) II vom Smp. 162–164° erhält; $[\alpha]_D^{25} = -34,2^\circ$. Nach Umkristallisieren aus Alkohol/Äther steigt der Smp. auf 167–168°.

b) *Über das geschichtete Anhydrid*. 31,8 g (0,2 Mol) Formyl-*L*-leucin (1) werden in 640 ml Tetrahydrofuran/Dioxan (1:1) unter Zusatz von 30,7 ml (0,22 Mol) Triäthylamin gelöst. Bei –10° werden unter Rühren langsam 21 ml (0,2 Mol) Chlorameisensäure-äthylester zugetropft; anschliessend wird 30 Min. bei –10° weitergerührt. Nun wird eine Lösung von 50,4 g (0,2 Mol) *N γ -Z-L- α,γ -diaminobuttersäure* (2) in 400 ml (0,2 Mol) 0,5 *N* Natronlauge zugesetzt. Die Temperatur steigt vorübergehend auf 15°. Anschliessend wird 45 Min. bei –5° bis 0° und dann 16 Std. bei 20° weitergerührt. Nun wird das Lösungsmittel bei 50° unter vermindertem Druck bei pH 7,5 zum grössten Teil abgedampft und das Konzentrat unter Eiskühlung mit 3 *N* Salzsäure auf ein pH von 2 angesäuert. Die dabei entstehende harzige Fällung wird mit viel Essigester unter Zusatz von etwas Methanol extrahiert, dreimal mit 1 *N* HCl und dreimal mit Wasser gewaschen. (Aus diesen sauren Waschlösungen können ca. 25 g *N γ -Z- α,γ -L-Dab-OH* regeneriert werden.) Die Essigesterlösung wird über Na_2SO_4 getrocknet und im Wasserstrahlvakuum bei 45° bis zur reichlichen Kristallabscheidung eingedampft. Die Kristallisation wird durch Zusatz von Äther vervollständigt. Nach 2 Std. wird abgenutscht, mit Äther gewaschen und im Vakuum bei 90° getrocknet. Man erhält 35,5 g II (45% berechnet auf das eingesetzte Formyl-*L*-leucin). Smp. 160–162°. Zur Analyse wurde zweimal aus Alkohol/Äther umkristallisiert. Smp. 163–164°; $[\alpha]_D^{21} = -33,4^\circ$.

$C_{19}H_{27}O_6N_3$ (393,43) Ber. C 58,00 H 6,92% Gef. C 58,28 H 7,21%

²⁹⁾ Die im folgenden angegebenen Drehungen wurden durchwegs, wenn nichts anderes angegeben, in Dimethylformamid bei $c = 2$ gemessen; Fehlergrenze $\pm 2^\circ$.

7. *Formyl-L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäurehydrazid (III)*. 40,7 g (0,1 Mol) Dipeptid-ester werden in 160 ml Methanol und 38 ml (0,6 Mol) 80-proz. Hydrazinhydrat unter kurzem Erwärmen gelöst, sofort filtriert und 24 Std. bei 25° belassen. Das auskristallisierte Hydrazid wird abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Wasserstrahlvakuum bei 80° getrocknet. Ausbeute 35,1 g (86%); Smp. 177–180°. Zur Analyse wurde zweimal aus Methanol umkristallisiert und bei 60° getrocknet. Smp. 181–183°; $[\alpha]_D^{25} = -30,3^\circ$.

$C_{19}H_{29}O_5N_5$ (407,46) Ber. C 56,00 H 7,17 N 17,19% Gef. C 55,96 H 7,14 N 17,19%

8. *Formyl-L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester (IV)*. a) SHEEHAN-Methode. 39,8 g (0,13 Mol) des Hydrochlorides von N γ -Z-L- α , γ -Dab-OCH₃ (3) werden in 120 ml Dimethylformamid gelöst, bei 0° mit 20,3 ml (0,14 Mol) Triäthylamin versetzt und nach 10 Min. vom ausgeschiedenen Triäthylamin-hydrochlorid abgenutscht. Nun wird mit 40 ml Dimethylformamid nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate werden mit 52 g (0,13 Mol) der Dipeptidsäure II versetzt. Die erhaltene Lösung wird auf -10° abgekühlt, mit 28,5 g (0,15 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und 24 Std. bei 0° belassen. Nun werden 10 ml Eisessig zugefügt, die Lösung anschließend 1 Std. bei Raumtemperatur stehengelassen, vom ausgeschiedenen Harnstoff abgenutscht und das Filtrat in 2,5 l eiskaltem Wasser ausgerührt. Nach 15 Min. wird erneut abgenutscht, gründlich mit Wasser und Äther gewaschen und der Rückstand in 200 ml Dimethylformamid unter Erwärmen gelöst. Nach dem Abkühlen wird von einer kleinen Menge ausgeschiedenem Harnstoff abfiltriert und das Filtrat in 2 l eiskaltem, etwa 0,5 n Ammoniak ausgerührt. Die gebildete Fällung wird abgenutscht, gründlich mit Wasser und Äther gewaschen und schliesslich im Vakuum bei 80° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet: 75 g Rohprodukt. Letzteres wird in siedendem Methanol gelöst. Nach dem Einengen der Lösung im Vakuum wird mit dem doppelten Volumen Äther versetzt. Nach zwölfstündigem Stehlassen im Eisschrank wird abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet. Nach dem Aufarbeiten der Mutterlauge erhält man 65 g (75%) IV vom Smp. 186–188°, $[\alpha]_D^{25} = -35,2^\circ$. Zur Analyse wurde zweimal aus Alkohol umkristallisiert; Smp. 189–190°.

$C_{32}H_{43}O_9N_5$ (641,70) Ber. C 59,89 H 6,75 N 10,90% Gef. C 59,86 H 6,77 N 11,10%

b) *Azid-Methode*. 8,14 g (0,02 Mol) III werden in 30 ml Wasser, 10 ml Eisessig und 14 ml (0,042 Mol) 3 n Salzsäure gelöst und auf -5° abgekühlt. Dazu tropft man unter starkem Rühren bei einer Temperatur von -5° eine vorgekühlte Lösung von 1,45 g (0,021 Mol) Natriumnitrit in 10 ml Wasser. Die Reaktionsmischung wird 10 Min. bei -5° weitergerührt. Das Azid wird bei 0° mit Essigester extrahiert und die Essigesterlösungen unter Eiszusatz mit Wasser, 1 n Natriumhydrogencarbonat und Wasser neutral gewaschen und bei 0° über Na₂SO₄ getrocknet. Die Azidlösung wird abfiltriert und bei 0° mit 5,84 g (0,022 Mol) N γ -Z-L- α , γ -Dab-OCH₃ (3) in 15 ml Essigester versetzt und 24 Std. bei 0° und 24 Std. bei 25° aufbewahrt. Darauf werden die Kristalle abgesaugt, mit Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 9,34 g (73%) IV. Smp. 187–189°, nach einmaligem Umkristallisieren 192–193°; $[\alpha]_D^{25} = -36,2^\circ$.

9. *Formyl-L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure (V)*. - a) *Durch Esterverseifung*. 45 g (0,07 Mol) des Esters werden unter Erwärmen in 1 l Methanol gelöst, die Lösung wird abgekühlt und in 2 Portionen mit 70 ml 1 n Natronlauge und schliesslich noch mit 20 ml Wasser versetzt. Dann wird die Lösung unter gelegentlichem Schütteln unter Verschluss während 20 Std. bei Raumtemperatur belassen. Anschliessend wird filtriert, mit Eisessig auf pH 4 gestellt und in 4 l Eiswasser und 50 ml Eisessig ausgerührt. Nach 15 Min. wird abgenutscht, der Rückstand gründlich mit Wasser und mit Äther gewaschen und im Vakuum bei 80° getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird in siedendem Methanol gelöst, die Lösung filtriert und abgekühlt. Es scheidet sich eine stark gequollene Masse ab, die abgenutscht, mit Alkohol gewaschen und im Vakuum bei 80° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wird. Nach dem Aufarbeiten der Mutterlauge erhält man 31 g (70%) V vom Smp. 203–205° (Zers.); $[\alpha]_D^{20} = -29,7^\circ$.

b) *Über das gemischte Anhydrid*. 39,3 g (0,1 Mol) der Dipeptidsäure II werden in 780 ml Tetrahydrofuran/Dioxan (1:1) unter Zusatz von 15,3 ml (0,11 Mol) Triäthylamin gelöst. Bei -10° werden unter Rühren langsam 10,5 ml (0,1 Mol) Chlorameisensäure-äthylester zugetropft und anschliessend noch 20 Min. bei -10° weitergerührt. Nun wird eine Lösung von 25,2 g (0,1 Mol) N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure (2) in 200 ml 0,5 n NaOH zugesetzt. Die Temperatur steigt vorübergehend auf 10° an. Anschliessend wird während 45 Min. bei 0° und dann 16 Std. bei 20° weitergerührt.

Die klare Lösung (pH 7) wird im Vakuum bei 45° stark eingeeengt und das Konzentrat bei 0° mit 1 N HCl auf pH 2 gestellt. Es entsteht eine harzige Fällung, die innerhalb 2 Std. bei 0° erstarrt. Sie wird abgenutscht, in einer Reibschale pulverisiert und dann so lange mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser ein pH von 5 aufweist. Nach 24 Std. Trocknen bei 60° im Vakuum erhält man 45 g V, Smp. 186–188°. Zur Analyse wurde zweimal aus Methanol umkristallisiert. Smp. 203–205°; $[\alpha]_D^{20} = -31,1^\circ$.

$C_{31}H_{41}O_9N_5$ (627,68) Ber. C 59,32 H 6,58 N 11,16% Gef. C 59,52 H 6,42 N 11,48%

10. *Formyl-L-leucyl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobuttersäurehydrazid (VI).* 6,41 g (0,01 Mol) Tripeptidester IV werden unter Erwärmen in einer Mischung von 70 ml Methanol und 6,3 ml (0,1 Mol) 80-proz. Hydrazinhydrat gelöst, filtriert und 5 Std. bei 25° belassen. Das Hydrazid wird abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Wasserstrahlvakuum bei 80° getrocknet. Ausbeute 5,8 g (90%), Smp. 240–242° (Zers.). Zur Analyse wurde zweimal aus Dimethylformamid/Alkohol umkristallisiert. Smp. 243–244° (Zers.); $[\alpha]_D^{22} = -34,2^\circ$.

$C_{31}H_{43}O_8N_7$ (641,70) Ber. C 58,00 H 6,75 N 15,27% Gef. C 58,14 H 6,77 N 15,34%

11. *Formyl-L-leucyl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester (VII).* – a) SHEEHAN-Methode. 12,54 g (0,02 Mol) des nach Absatz 9 erhaltenen Tripeptids V und 2,66 g (0,02 Mol) L-Threonin-methylester werden in 125 ml Dimethylformamid gelöst und mit 4,32 g (0,022 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Nach 24 Std. wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und mit 5 ml Dimethylformamid nachgewaschen. Das Filtrat wird mit 800 ml Essigester verdünnt und je zwei- bis dreimal mit 1 N Salzsäure, Wasser, 1 N Ammoniak und wieder mit Wasser gewaschen. Die Lösung wird unter Zusatz von etwas Methanol über Natriumsulfat getrocknet und bei 45° zunächst bei 20 Torr und anschliessend bei 0,01 Torr zur Trockne eingedampft. Der verbleibende Rückstand wird aus Methanol/Äther umgefällt. Nach dem Trocknen im Vakuum bei 70° erhält man 6,9 g VII vom Smp. 227–228°; $[\alpha]_D^{20} = -26,1^\circ$. Zur Analyse wurde zweimal aus Methanol mit Äther umgefällt und bei 80° getrocknet. Smp. 227–228°.

$C_{35}H_{50}O_{11}N_6$ (742,81) Ber. C 58,30 H 6,78 N 11,30% Gef. C 57,84 H 6,69 N 11,64%

b) *Azid-Methode.* 4,5 g (7 mMol) pulverisiertes Hydrazid VI werden unter starkem Rühren in 30 ml Wasser, 20 ml Eisessig, 75 ml Essigester und 4,9 ml 3 N Salzsäure gelöst. Dazu tropft man unter starkem Rühren bei –5° eine vorgekühlte Lösung von 510 mg (7,35 mMol) Natriumnitrit in 5 ml Wasser und rührt 10 Min. bei –5° weiter. Das Azid wird bei 0° mit Essigester extrahiert, unter Eiszusatz mit Wasser, 1 N Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen und bei 0° über Na_2SO_4 getrocknet. Die abfiltrierte Azidlösung wird mit einer vorgekühlten Lösung von 1,02 g (7,7 mMol) L-Threonin-methylester (4) versetzt und 24 Std. bei 0° und 24 Std. bei 25° aufbewahrt. Die Kristalle werden abgesaugt, mit Äther gewaschen und im Wasserstrahlvakuum bei 60° getrocknet. Die Mutterlauge wird mit eiskalter 1 N Salzsäure, Wasser, 1 N Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Wasserstrahlvakuum bei 40° stark eingeeengt. Der Kristallbrei wird mit Äther vermischt, nach 1 Std. abgenutscht, mit Äther gewaschen und im Wasserstrahlvakuum bei 60° getrocknet. Ausbeute 3,55 g (68%). Smp. 236–238°; $[\alpha]_D^{21} = -26,3^\circ$. Diese Substanz wird einmal aus Methanol/Äther umgefällt und im Wasserstrahlvakuum bei 60° getrocknet; Smp. 239–240°; $[\alpha]_D^{22} = -28,6^\circ$. Der Smp. ist bei der Azid-Methode somit ca. 10° höher als bei der SHEEHAN-Methode, während die optische Drehung innerhalb der Fehlergrenze gleich ist.

12. *Formyl-L-leucyl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-L-threonin (VIII).*

a) *Durch Esterverseifung.* 6,9 g (9,3 mMol) des Esters VII werden in 280 ml Dioxan unter Erwärmen gelöst, die Lösung wird abgekühlt, mit 11 ml 1 N Natronlauge versetzt und 20 Std. geschüttelt. Nach 1 Std. scheidet sich eine gequollene Substanz aus, die durch Zusatz von 30 ml Wasser wieder gelöst wird. Die alkalische Lösung wird nun filtriert, das pH durch Zufügen von 1 N Salzsäure auf 7 gebracht und anschliessend das Dioxan im Vakuum bei 40° abgedampft. Das Konzentrat wird mit 200 ml Wasser verdünnt und unter Rühren mit 1 N Salzsäure auf ein pH von 2 gebracht. Nach 2stdg. Stehenlassen bei 0° wird die gebildete Fällung abgenutscht und mit Wasser neutral gewaschen. Nach dem Trocknen im Vakuum bei 60° und Umkristallisieren aus Methanol erhält man 6,1 g (80%) VIII vom Smp. 184–187°. Zur Analyse wurde noch zweimal aus Alkohol umkristallisiert und bei 80° getrocknet, Smp. 195–196°; $[\alpha]_D^{21} = -23,6^\circ$.

$C_{35}H_{48}O_{11}N_6$ (728,78) Ber. C 57,68 H 6,64 N 11,53% Gef. C 57,60 H 6,78 N 11,81%

b) *Über das gemischte Anhydrid.* 6,28 g (0,01 Mol) Formyltripeptid V werden in 35 ml DMF gelöst, mit 1,5 ml (0,01 Mol) Triäthylamin versetzt und unter Rühren bei -10° 1,05 ml (0,01 Mol) Chlorameisensäure-äthylester zugefropt. Es wird 10 Min. bei -10° gerührt und anschliessend einer vorgekühlten Lösung von 1,2 g (0,01 Mol) L-Threonin in 10 ml H_2O und 5 ml 2 N NaOH zugesetzt. Die Temperatur steigt vorübergehend auf 15° . Nun wird 1 Std. bei 0 bis $+5^{\circ}$ und 3 Std. bei Raumtemperatur gerührt, mit Eisessig abgestumpft, bei 70° auf das halbe Volumen eingedampft und das Konzentrat mit 250 ml essigsäurem Wasser ausgerührt. Der Niederschlag wird mit Wasser und Äther gründlich gewaschen und aus Methanol umkristallisiert. Ausbeute 4,37 g (60%) VIII. Smp. 211–212°; $[\alpha]_D^{21} = -22,6^{\circ}$.

13. *Formyl-L-leucyl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-L-threoninhydrazid (IX).* 2,97 g (4 mMol) VII werden unter Erwärmen in einer Mischung von 45 ml Methanol und 1 ml (16 mMol) 80-proz. Hydrazinhydrat gelöst, filtriert und 24 Std. bei 25° aufbewahrt. Das gequollene Hydrazid wird abgesaugt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Wasserstrahlvakuum bei 80° getrocknet. Ausbeute 2,82 g (95%), Smp. 223–225°. Zur Analyse wurde zweimal aus Dimethylformamid/Alkohol umgefällt. Smp. 226–227°; $[\alpha]_D^{22} = -30,2^{\circ}$.

$C_{35}H_{50}O_{10}N_8$ (742,81) Ber. C 56,59 H 6,79 N 15,09% Gef. C 56,04 H 6,81 N 14,89%

14. *Formyl-L-leucyl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobuttersäure-methylester (x).* – a) SHEEHAN-Methode. 1,3 ml (0,01 Mol) Triäthylamin und 3,1 g des Hydrochlorides von N γ -Z-L- α,γ -Dab-OCH₃ (3) werden in 20 ml Dimethylformamid gelöst. Nach kurzem Stehen im Eisschrank wird das ausgefallene Triäthylamin-hydrochlorid abgesaugt und mit 20 ml Dimethylformamid nachgewaschen. Das Filtrat wird nun mit 7,3 g (0,01 Mol) des Tetrapeptides VIII versetzt und die erhaltene Lösung auf -5° abgekühlt. Dann wird mit 2,16 g (0,011 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und 24 Std. im Eisschrank stehengelassen. Das gebildete Harnstoffderivat wird abgenutscht und das Filtrat in 500 ml eiskalte Salzsäure gegossen. Der Niederschlag wird gründlich mit Wasser, 1 n Ammoniak und wieder mit Wasser gewaschen und anschliessend in 80 ml Dimethylformamid aufgenommen. Nun wird mit 600 ml eiskalter 1 n Ammoniaklösung gefällt, der Niederschlag nach 15 Min. abgenutscht und gründlich mit Wasser und Äther gewaschen. Der getrocknete Rückstand wird in heissem Methanol gelöst, die Lösung filtriert und mit Äther gefällt. Man erhält 5,4 g des Pentapeptides X. Zur Analyse wurde zweimal aus Dimethylformamid/Essigester umgefällt. Smp. 205–207° (Zers.); $[\alpha]_D^{21} = -32,8^{\circ}$.

$C_{48}H_{64}O_{14}N_8$ (977,05) Ber. C 59,00 H 6,60 N 11,50% Gef. C 59,01 H 6,60 N 11,78%

b) *Azid-Methode.* 3,72 g (5 mMol) Hydrazid IX werden unter starkem Rühren in 40 ml Wasser, 20 ml Eisessig, 50 ml Essigester und 3,5 ml 3 n Salzsäure (10,5 mMol) gelöst. Bei -5° tropft man unter Rühren eine vorgekühlte Lösung von 362 mg (5,25 mMol) Natriumnitrit in 2 ml Wasser zu und rührt anschliessend noch 10 Min. bei -5° . Das Azid wird bei 0° mit Essigester extrahiert, unter Eiszusatz mit Wasser, 1 n Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen und bei 0° über Na₂SO₄ getrocknet. Hierbei beginnt sich das Azid abzuscheiden; es wird durch Zusatz von 10 ml Dimethylformamid wieder gelöst und filtriert. Im Filtrat löst man 1,96 g (5,5 Mol) N γ -Z-L- α,γ -Dab-OCH₃ (3) und lässt 24 Std. bei 0° und 24 Std. bei 25° stehen. Die Lösung wird im Wasserstrahlvakuum bei 45° auf ca. 20 ml eingedampft und mit 80 ml Äther ausgefällt. Der Niederschlag wird nach 3 Std. abgesaugt, mit Essigester und Äther gewaschen, im Wasserstrahlvakuum bei 60° getrocknet und aus Dimethylformamid/Äther umgefällt. Ausbeute 2,68 g (65%) X. Smp. 205–207° (Zers.); $[\alpha]_D^{22} = -32,1^{\circ}$.

15. *Formyl-L-leucyl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobuttersäure (XI).* 7,1 g (7,2 mMol) des Esters X werden in 80 ml Dimethylformamid gelöst und portionenweise mit total 8 ml 1 n Natronlauge versetzt. Nach 20stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur wird die Lösung von einigen Flocken abfiltriert und das Filtrat in 400 ml schwach essigsäurem Wasser ausgerührt. Nach dem Abnutschen wird der Rückstand mit Wasser gründlich gewaschen und erneut aus Essigsäure umgefällt. Anschliessend wird wieder in Dimethylformamid gelöst, die Lösung filtriert und mit Essigester ausgefällt. Der gebildete Niederschlag wird nach 2 Std. abgenutscht, mit Essigester, Äther und tiefsiedendem Petroläther gewaschen und getrocknet. Nach dem Umfällen des Rückstandes aus Methanol/Äther erhält man 4,6 g (65%) XI vom Smp. 198–200°; $[\alpha]_D^{20} = -26,9^{\circ}$.

$C_{47}H_{62}O_{14}N_8$ (963,03) Ber. C 58,62 H 6,49 N 11,64% Gef. C 58,33 H 6,68 N 11,24%

Durch Mikrotitration wurde ein Äquivalentgewicht von 923 (Ber. 963) bestimmt. $pK_a = 7,53$ (in Methylcellosolve). Im UV. wurde bei $\lambda_{max} = 257 m\mu$ ein $\epsilon = 640$ gemessen (Eisessig), was 3 Phenylresten²⁷⁾, in Übereinstimmung mit der postulierten Struktur, entspricht. Im Totalhydrolysat (6 N HCl, 120°, 16 Std.) und anschließender Papierchromatographie wurden die Aminosäuren Leu (Rf 0,51), Thr (Rf 0,16) und Dab (Rf 0,05) nachgewiesen (Papier SCHLEICHER & SCHÜLL 2043b, 14 Std. absteigend im System n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1).

Die *Mikroanalysen* wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung unter der Leitung von Dr. H. WALDMANN und Dr. A. DIRSCHERL ausgeführt.

SUMMARY

The protected pentapeptide formyl-L-leucyl-N^γ-benzyloxycarbonyl-L- α,γ -diaminobutyryl-N^γ-benzyloxycarbonyl-L- α,γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N^γ-benzyloxycarbonyl-L- α,γ -diaminobutyric acid, a sequence which is known to occur in the polymyxins, has been synthesized. Different coupling methods including the azide route lead to the same end product, with the same optical rotation. We therefore believe our pentapeptide to be optically pure.

Chemische Forschungsabteilung der
F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel

36. Synthesen in der Polymyxin-Reihe

2. Mitteilung¹⁾

Synthese eines Dipeptid-Fragmentes mit (+)-Isopelargonsäure

von K. Vogler und L. H. Chopard-dit-Jean

(3. XII. 59)

In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über die Synthese von N^α(+)-Isopelargonyl-N^γ-benzyloxycarbonyl-D- α,γ -diaminobutyryl-L-threonin (XI). Es handelt sich dabei um die Seitenkette der von HAUSMANN²⁾ als Alternative A aufgestellten möglichen Struktur für Polymyxin B₁.

Die von WILKINSON³⁾ aufgeklärte (+)-drehende 6-Methyloctansäure (Isopelargonsäure), die Schlüsselsubstanz zur Herstellung dieses Dipeptids, wurde erstmals von CROMBIE & HARPER⁴⁾ ausgehend von optisch aktivem (–)-2-Methylbutanol-(1) bereitet. Dabei spielt Dichlortetrahydrofuran als Zwischenprodukt eine wichtige Rolle, das mit Vorteil über Dihydrofuran hergestellt werden kann. Da uns diese Substanz nicht zur Verfügung stand, haben wir ein abgeändertes Verfahren eingeschlagen, das sich zwar keineswegs durch Eleganz oder Kürze auszeichnet, hingegen über Zwischenprodukte führt, die mit anständigen Ausbeuten leicht in reiner Form gewonnen werden können. Da uns die nötigen Destillationskolonnen zur Verfügung standen,

¹⁾ 1. Mitteilung: K. VOGLER & P. LANZ, Helv. 43, 270 (1960). Die verwendeten Abkürzungen sind in dieser 1. Mitteilung erklärt.

²⁾ W. HAUSMANN, J. Amer. chem. Soc. 78, 3663 (1956).

³⁾ S. WILKINSON, Nature 164, 622 (1949).

⁴⁾ L. CROMBIE & ST. H. HARPER, J. chem. Soc. 1950, 2685.