

Synthesen in der Depsipeptid-Reihe, 4. Mitt.¹:

Struktur und mikrobiologische Aktivität in der
Enniatin-Reihe*

Von

R. O. Studer, P. Quitt, E. Böhni und K. Vogler

Aus der Chemischen und Medizinischen Forschungsabteilung der
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 17. Oktober 1964)

Es wird der Einfluß der Ringstruktur, der Ringgröße und der Anzahl der N-Methylgruppen auf die mikrobiologische Aktivität der Enniatine untersucht. Alle diese Faktoren scheinen für die Aktivität wichtig zu sein.

The influence of cyclic nature, ring size and N-methyl groups on the microbiological activity of the Enniatins has been tested. They all play an important rôle for the full activity of these natural products.

Nachdem es uns im Verlaufe der Arbeiten auf dem Gebiete der Depsipeptide gelungen war, die Antibiotica Enniatin B² und Enniatin A³ zu synthetisieren, war es von Interesse, den Einfluß der N-Methylgruppe auf die mikrobiologische Aktivität näher zu untersuchen. Wir wählten als Modellsubstanz das Enniatin B und ersetzten darin ein N-Methyl-L-valin nach dem andern durch L-Valin. Dadurch erhielten

* Herrn Prof. Dr. H. Bretschneider zum 60. Geburtstag gewidmet.

¹ 3. Mitt.: P. Quitt, R. O. Studer und K. Vogler, *Helv. chim. acta* **47**, 166 (1964). Die vorliegenden Ergebnisse wurden auszugsweise am VI. Europäischen Peptid-Symposium, 15.—20. 9. 1963, in Athen vorgetragen.

² Pl. A. Plattner, K. Vogler, R. O. Studer, P. Quitt und W. Keller-Schierlein, *Experientia* [Basel] **19**, 71 (1963); Pl. A. Plattner, K. Vogler, R. O. Studer, P. Quitt und W. Keller-Schierlein, *Helv. chim. acta* **46**, 927 (1963).

³ P. Quitt, R. O. Studer und K. Vogler, *Helv. chim. acta* **46**, 1715 (1963); P. Quitt, R. O. Studer und K. Vogler, *l. c.* **47**, 166 (1964).

wir die drei Verbindungen (Abb. 1) welche als Mono-, Di- und Trides-methyl-Enniatin B bezeichnet wurden.

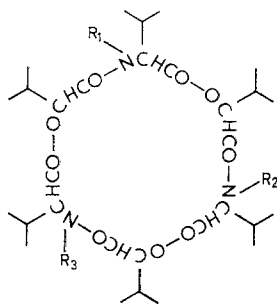


Abb. 1.

	R ₁	R ₂	R ₃
Enniatin B	CH ₃	CH ₃	CH ₃
XII Monodesmethyl-Enniatin B	H	CH ₃	CH ₃
XIII Didesmethyl-Enniatin B	H	H	CH ₃
XIV Tridesmethyl-Enniatin B	H	H	H

Ihr Aufbau erfolgte in der schon für das Enniatin B beschriebenen Weise². Für das Tridesmethyl-Enniatin B (XIV) (Schema 1) wurde das Didepsipeptid I, das an Stelle von N-Methyl-L-valin L-Valin enthält, durch zweimalige Kondensation zum offenkettigen Hexadepsipeptid VI verlängert. Das Hexadepsipeptid des Didesmethyl-Enniatin B (Schema 2) wurde durch Kupplung von Z-N-Methyl-L-valyl-D- α -oxyisovaleriansäure^{2*} mit der Tetradepsipeptidesterbase V erhalten und dasjenige des Monodesmethyl-Enniatin B (Schema 3) durch Kondensation von Z-L-Valyl-D- α -oxyisovaleriansäure (II) mit der Tetradepsipeptidesterbase des Enniatins B². Nach Entfernung der Schutzgruppen mit HBr in Eisessig erfolgte die Cyclisierung der drei Hexadepsipeptid-hydrobromide VII, IX und XI in analoger Weise wie sie schon für Enniatin A und B beschrieben wurde.

Die drei Verbindungen unterscheiden sich voneinander und von Enniatin B namentlich in ihren Schmelzpunkten, den *Debye—Scherrer*-Diagrammen (Abb. 2) und in ihrem chromatographischen Verhalten, während die spezifische Drehung nur für die Tridesmethylverbindung stark verschieden ist.

Die antimikrobielle Wirkung der offenen Hexadepsipeptide VII, IX, XI und der cyclischen Verbindungen XII, XIII, XIV wurden im Vergleich zu Enniatin B, Enniatin A und dem offenen und cyclischen Tetradepsipeptid-analogen² von Enniatin B gegen Tuberkelbazillen, Staphylokokken, *Sarcina lutea*, *Candida albicans* und *E. coli* in vitro untersucht (Tab. 2). Wir nahmen das aktivste Präparat (Enniatin A) als Standard, setzten seine Aktivität willkürlich mit 100% ein und verglichen damit die Aktivi-

* Z = —COOCH₂C₆H₅.

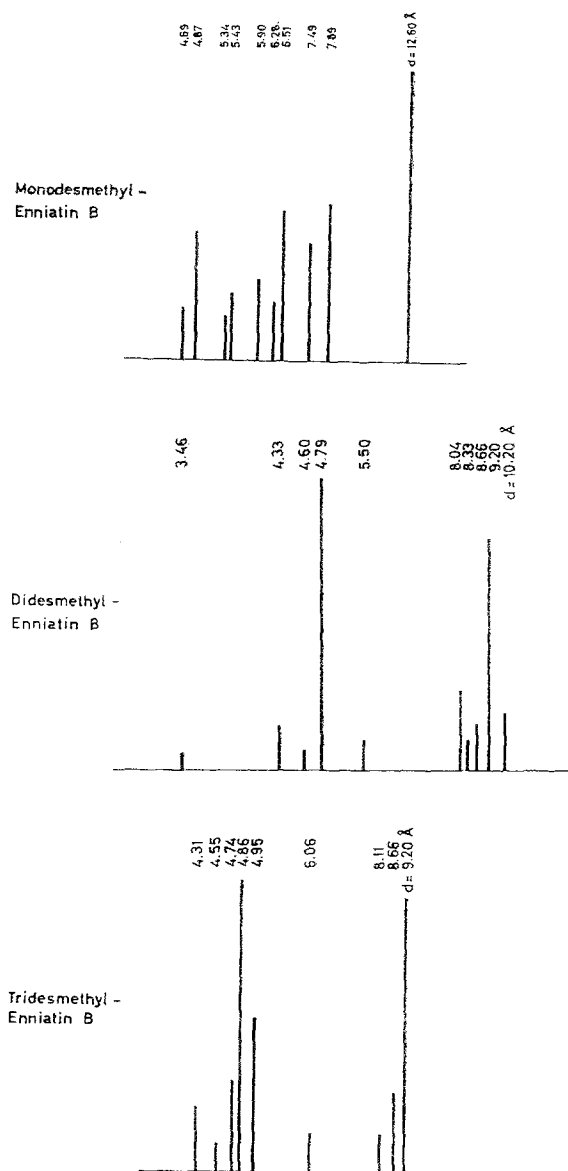
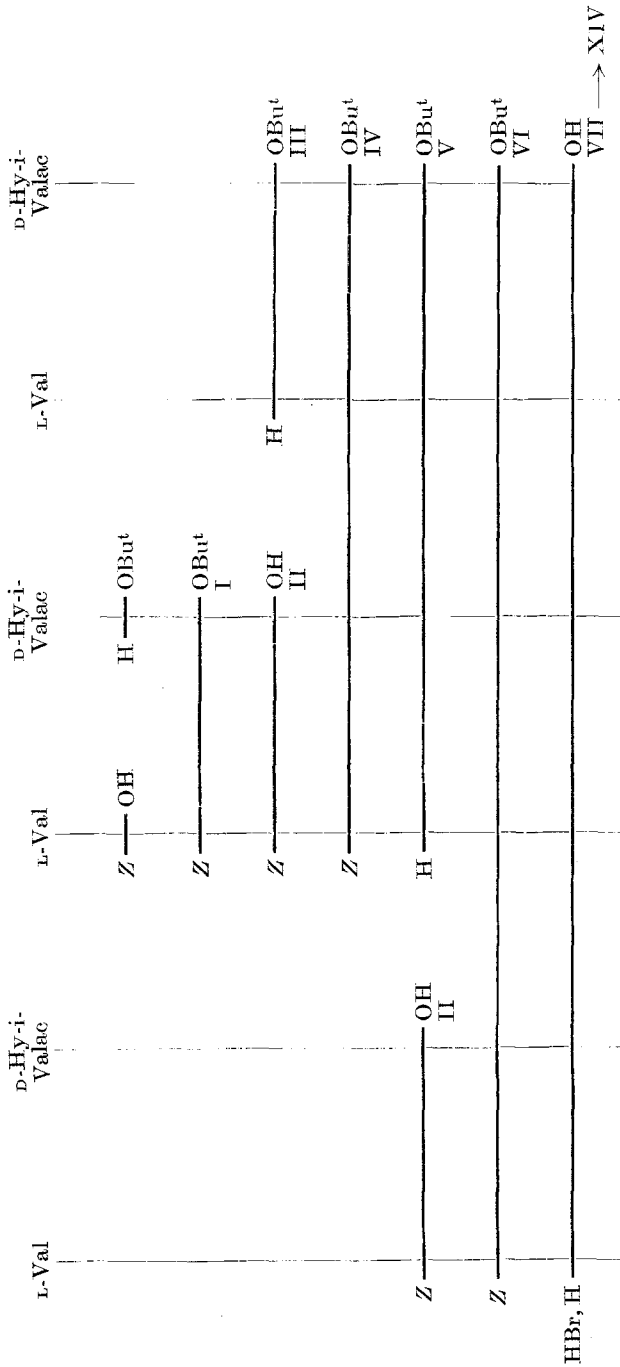
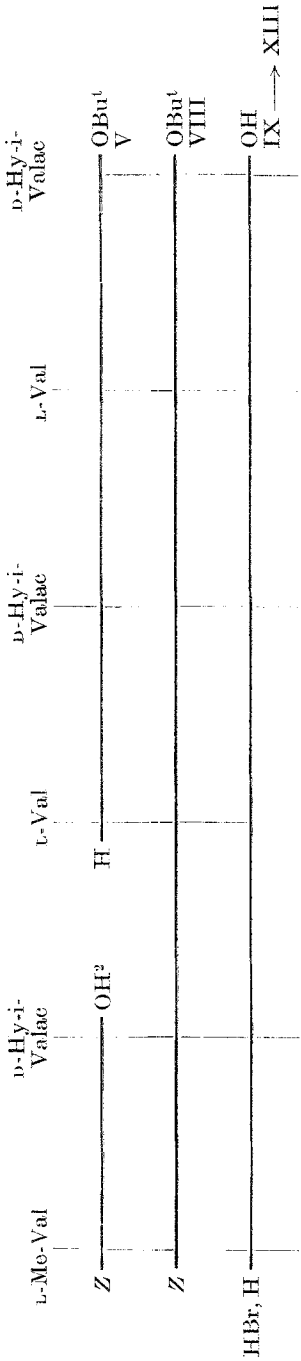


Abb. 2. Debye-Scherrer-Diagramme von Mono-, Di- und Tridesmethyl-Enniatin B. Die Aufnahmen verdanken wir Herrn Dr. C. von Planta aus der physikalischen Abteilung (Roche). Sie wurden mit einem Philips-Röntgen-Goniometer PW 1050 und CuK α -Strahlung aufgenommen

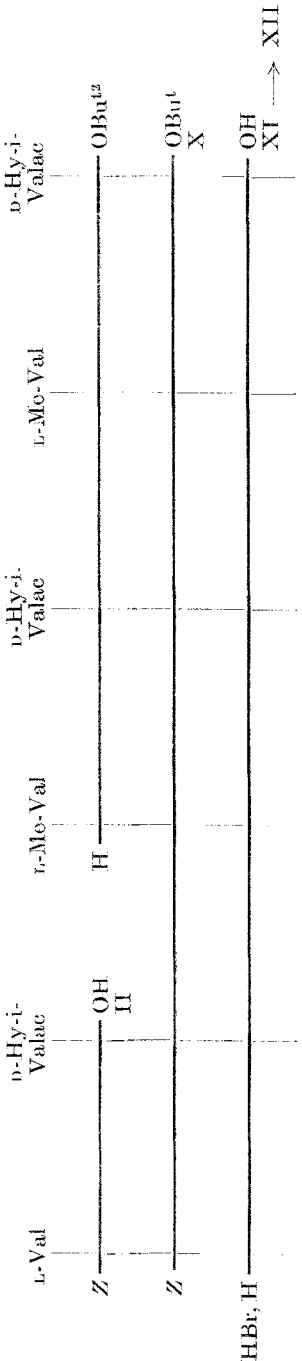
tät von Enniatin B und seinen Derivaten. Enniatin B ist gegen alle Stämme 5—7mal weniger aktiv als Enniatin A; die Natur der N-methylierten Aminosäure spielt also keine unwesentliche Rolle. Wird beim



Reaktionsschema 1. Tridesmethyl-Eniatiin B



Reaktionsschema 2. Didesmethyl-Enniatin B



Reaktionsschema 3. Monodesmethyl-Enniatin B

L-Val = L-Valin
D-Hy-i-Valac = α-Hydroxy-isovaleriansäure
Z = Benzoyloxy-carbonyl
L-Mo-Val = N-Methyl-L-valin
But = tert.-Butyl

Tabelle 1. Analytische Charakterisierung von Mono-, Di- und Tridesmethyl-Enniatin B im Vergleich zu Enniatin B

	Enniatin B	Monodesmethyl-Enniatin B	Didesmethyl-Enniatin B	Tridesmethyl-Enniatin B
1. $[\alpha]_D^{25}$ in CHCl_3 ($\pm 2^\circ$)	- 107° ($c = 1,1$)	- 109° ($c = 0,1$)	- $103,7^\circ$ ($c = 0,108$)	- $22,3^\circ$ ($c = 0,15$)
2. Schmp.	$173-174^\circ$	$128-129^\circ$	$195-196^\circ$	$265-267^\circ$
3. Dünnschichtchromatographie (R_f) Benzol/Äther/Methanol 85:10:5	0,39	0,53	0,31	0,05
Essigester	0,74	0,91	0,83	0,5
4. Molekulargewicht	639	625	611	597
5. IR-Spektrum C=O-Amid	6,05 μ	6,06 μ	5,98; 6,16 μ	6,07 μ
Amid II-Bande		6,65 μ	6,62 μ	6,57 μ
C=O-Ester	5,77 μ	5,77 μ	5,76 μ	5,75 μ
Ester	8,50 μ	8,48 μ	8,42 μ	8,49 μ
6. Mikroanalysen	$\text{C}_{33}\text{H}_{57}\text{O}_9\text{N}_3$ (639,8) Ber. C 61,94, H 8,98, N 6,57	$\text{C}_{32}\text{H}_{53}\text{O}_9\text{N}_3$ (625,8) Ber. C 61,41, H 8,86, N 6,72	$\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{O}_9\text{N}_3$ (611,7) Ber. C 60,86, H 8,73, N 6,87	$\text{C}_{30}\text{H}_{45}\text{O}_9\text{N}_3$ (597,7) Ber. C 60,28, H 8,60, N 7,03
	Gef. C 61,88, H 8,83, N 6,79	Gef. C 61,61, H 8,85, N 6,69	Gef. C 60,86, H 8,40, N 6,90	Gef. C 60,43, H 8,51, N 6,98

ad 1. Die Drehungsmessungen wurden in einem photoelektrischen Polarimeter mit Thermostat, das in unserer physikochemischen Abteilung von Herrn Dr. F. Burkhardt entwickelt worden ist, aufgenommen.

ad 3. Herstellung der Kieselplatten und Arbeitstechnik entsprechen den Originalangaben von Stahl⁴.

ad 4. Die Molekulargewichte wurden von Herrn Dr. W. Vetter in unserer physikochemischen Abteilung mit einem Massenspektrometer der Associated Electrical Industries; MS 9 bestimmt.

ad 5. Die IR-Spektren wurden von Herrn Dr. L. H. Chopard-dit-Jean (1 mg Substanz in 300 mg KBr) mit einem Infrarotspektrophotometer Perkin-Elmer, Mod. 21, aufgenommen.

ad 6. Alle Mikroanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung unter der Leitung der Herren Dres. H. Waldmann und A. Dierschke ausgeführt.

⁴ E. Stahl, Arbeitsvorschrift für Dünnschichtchromatographie, herausgegeben von der Firma C. Desaga GMBH, Heidelberg; vgl. auch M. Brenner, A. Niederwieser und G. Pataki in E. Stahl, Dünnschichtchromatographie, Springer, Berlin 1962, S. 403.

Enniatin B ein N-Methyl-valin durch Valin ersetzt (Monodesmethyl-Enniatin B), so sinkt die Aktivität bei allen Stämmen um mehr als das Dreifache ab. Bei den meisten Organismen kann die Abnahme nicht genau bestimmt werden, weil bei der Prüfung höherer Konzentrationen die Hemmung mit derjenigen von Methanol, dem allgemein verwendeten Lösungsmittel der Enniatine, interferiert. Lediglich bei der sehr Enniatin-empfindlichen, apathogenen *Sarcina lutea*, wo mit niedrigen Konzentrationen und somit niedrigem, nicht hemmenden Methanolgehalt gearbeitet werden kann, ist eine Abnahme um mehr als das 16fache nachweisbar. Nach diesem Test-Organismus übt also der Austausch von einem N-Methyl-L-valin durch ein L-Valin auf die Aktivität einen stärkeren Einfluß aus als der Austausch von drei N-Methyl-L-valin (Enniatin B) durch drei N-Methyl-L-isoleucin (Enniatin A). Den gleichen Befund erhalten wir auch bei der Aktivitätsbestimmung mit Tuberkelbazillen, sofern anstatt des hochaktiven Enniatin A das Enniatin B als Standard eingesetzt wird (Tab. 3). Monodesmethyl-Enniatin B ist in einer solchen Relation rund 30mal weniger aktiv als Enniatin B, während, geprüft an Staphylokokken, die Aktivität nur um das Achtfache absinkt. Bei den Staphylokokken bewirkt also die Einführung eines L-Valins anstelle eines N-Methyl-L-valins praktisch die gleiche Aktivitätsabnahme wie der Austausch von drei N-Methyl-L-isoleucinresten durch drei N-Methyl-L-valinreste.

Wird Enniatin B weiter desmethyliert, so sinkt die Aktivität

Tabello 2. Relative Aktivität (Enniatin A = 100) gegen fünf verschiedene Mikroorganismen in Abhängigkeit der Konstitution

Ilexadepsipeptide	Mycobacterium tuberculosis		Staphylococcus aureus		Sarcina lutea		Escherichia coli		Candida albicans	
	offen	cyclis.	offen	cyclis.	offen	cyclis.	offen	cyclis.	offen	cyclis.
Enniatin A		100		100		100		100		100
Enniatin B	5	17,6	4	14,5	0,7	16,1	10	24	7	22
Monodesmethyl-	5	5	4	4	0,7	0,7	10	10	7	7
Didesmethyl-	5	5	4	4	0,7	0,7	10	10	7	7
Tridesmethyl-	5	5	4	4	0,7	0,7	10	10	7	7
Tetradepsipeptid (Enniatin B)	5	5	4	4	0,7	0,7	10	10	7	7

Tabelle 3. Relative Aktivität (Enniatin B = 100) gegen Tuberkelbazillen und Staphylokokken in Abhängigkeit der Konstitution

Hexadepsipeptide	Mycobacterium tuberculosis		Staphylococcus aureus	
	offen	cyclisiert	offen	cyclisiert
Enniatin A	8,4	580	< 13	683
Enniatin B	8,7	100	9,4	100
Monodesmethyl-	8	2,4	7	12,3
Didesmethyl-	8	1,6	8	9,4
Tridesmethyl-	7,8	0,9	6	5
Tetradepsipeptid (Enniatin B)	8,9	9	10	10

gegen Tuberkelbazillen und Staphylokokken geringfügig, aber stetig weiter.

Der Einfluß der Ringgröße auf die Aktivität ist aus dem Vergleich des cyclo-Tetradepsipeptides und des cyclo-Hexadepsipeptides von Enniatin B (Tab. 3) ersichtlich. Das letztere ist rund 10mal aktiver.

Über die Auswirkung des Ringschlusses auf die Aktivität gibt der Vergleich zwischen den cyclischen Verbindungen und deren offenkettigen Vorstufen Aufschluß (Tab. 2, 3). Für das Tetradepsipeptid-analoge von Enniatin B spielt der Ringschluß keine Rolle.

Dasselbe gilt praktisch auch für die drei Desmethyl-Hexadepsipeptide. Hingegen ist beim Enniatin A der Ringschluß von entscheidendster Bedeutung für die Aktivität. Enniatin A ist rund 70mal aktiver als seine offenkettige Vorstufe, während beim Enniatin B der gleiche Effekt einen Faktor von 10 ausmacht.

Zu ähnlichen Ergebnissen führten auch die Untersuchungen von *Shemyakin*⁵ mit einer Reihe von anderen Analogien.

Experimenteller Teil⁶

A. Synthesen

1. Z-L-Valyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-tert. butylester (I)

2,5 g (0,01 Mol) Z-L-Valin werden in 20 ml Pyridin gelöst, auf 0° gekühlt, mit 2,56 ml (0,02 Mol) Benzolsulfochlorid versetzt und 10 Min. bei 0° gerührt. Darauf werden 1,74 g (0,01 Mol) D- α -Hydroxy-isovaleriansäure-tert. butylester zugegeben, 30 Min. bei 0° und 2½ Stdn. bei Raumtemp. gerührt. Dann wird die Lösung auf Eis gegossen, mit Äther extrahiert, dieser mit Citronensäure,

⁵ M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov, A. A. Kiryushkin, G. L. Zhdanov und I. D. Ryabova, *Experientia* [Basel] **19**, 566 (1963).

⁶ Die Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert. Die Analysenmuster wurden 16 Stdn. über P₂O₅ bei 0,01 Torr und 50–80° getrocknet.

5proz. NaHCO_3 -Lösung und Wasser unter Eiszusatz gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Das anfallende Öl wird an Kieselgel chromatographiert, wobei das Dipeptid mit Benzol/Essigester (98:2) und Benzol/Essigester (95:5) extrahiert wird. Ausb. 3 g Öl (64%). $[\alpha]_D^{23} = +4^\circ$ ($c = 1,29$, Benzol).

$\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{O}_6\text{N}$ (407,5). Ber. C 64,84, H 8,16, N 3,44.
Gef. C 65,06, H 8,43, N 3,55.

2. *Z-L-Valyl-D- α -oxy-isovaleriansäure (II)*

3 g (0,0074 Mol) *Z*-Dipeptidester I werden in 100 ml Benzol gelöst und mit 300 mg *p*-Toluolsulfosäure 1 Stde. am Rückfluß erhitzt. Darauf wird zur Trockne verdampft, in Äther gelöst und die *Z*-Dipeptidsäure mit eiskalter 5proz. NaHCO_3 -Lösung extrahiert. Der Hydrogencarbonatextrakt wird sauer gestellt und mit Äther ausgezogen. Dieser wird mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Die *Z*-Dipeptidsäure wird aus Äther/Petroläther umkristallisiert. Ausb. 2 g (77%). Schmp. 92–93°, $[\alpha]_D^{23} = -9,3^\circ$ ($c = 1,05$, Benzol).

$\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{O}_6\text{N}$ (351,38). Ber. C 61,57, H 7,17, N 3,99.
Gef. C 61,37, H 7,30, N 4,01.

3. *L-Valyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-tert. butylester (III)*

6 g (0,0148 Mol) *Z*-Dipeptidester I werden in 100 ml Eisessig gelöst und über Pd-Kohle hydriert. Nach der Hydrierung wird vom Katalysator abfiltriert und eingedampft. Der ölige Rückstand wird in Äther gelöst und die Dipeptidesterbase mit eiskalter 5proz. Citronensäure extrahiert. Der Extrakt wird mit Na_2CO_3 alkalisch gestellt und die Dipeptidesterbase mit Äther ausgezogen. Die äther. Lösung wird mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Ausb. 3,6 g (90%) Öl. $[\alpha]_D^{24} = +40,9^\circ$ ($c = 1,1$, Benzol).

$\text{C}_{14}\text{H}_{27}\text{O}_4\text{N}$ (273,36). Ber. C 61,50, H 9,95, N 5,12.
Gef. C 61,44, H 9,63, N 5,21.

4. *Z-L-Valyl-D- α -oxy-isovaleryl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-tert. butylester (IV)*

3,1 g (0,088 Mol) *Z*-Dipeptidsäure II werden in 50 ml absol. Äther gelöst, bei 0° mit 2 g PCl_5 versetzt und 30 Min. bei 0° gerührt. Darauf wird zur Trockne verdampft, in 20 ml absol. Äther gelöst und bei –15° zu einer Lösung von 2,4 g (0,088 Mol) Dipeptidesterbase III in 100 ml absol. Äther und 3 ml Triäthylamin getropft. Die Lösung wird 4 Stdn. bei –15° gerührt und danach zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in Äther aufgenommen und eiskalt mit 5proz. Citronensäure, 5proz. NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Das anfallende Öl wird an Kieselgel chromatographiert, wobei das geschützte Tetrapeptid mit Benzol/Essigester (95:5) und Benzol/Essigester (80:20) eluiert wird. Das Öl kristallisiert unter Petroläther. Es wird aus Äther/Petroläther umkristallisiert. Ausb. 4,3 g (80%). Schmp. 78–79°, $[\alpha]_D^{23} = +11,4^\circ$ ($c = 0,66$, Benzol).

$\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_9\text{N}_2$ (606,74). Ber. C 63,35, H 8,20, N 4,62.
Gef. C 63,44, H 8,04, N 4,78.

5. *L-Valyl-D- α -oxy-isovaleryl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-tert. butylester (V)*

4,1 g (0,00675 Mol) *Z*-Tetradepsipeptidester IV werden in 100 ml Äthanol gelöst und über Pd-Kohle hydriert. Nach der Hydrierung wird vom Katalysator abfiltriert, eingedampft und in Äther gelöst. Die Tetradepsipeptidesterbase wird mit eiskalter 5proz. Citronensäure ausgeschüttelt, der Extrakt mit Na_2CO_3 alkalisch gestellt und die Base mit Äther aufgenommen. Dieser wird mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Ausb. 2,9 g (91%). $[\alpha]_D^{24} = +38^\circ$ ($c = 1$, Benzol).

$\text{C}_{24}\text{H}_{44}\text{O}_7\text{N}_2$ (472,6). Ber. C 60,98, H 9,38, N 5,92.
Gef. C 61,00, H 9,13, N 5,88.

6. *Z-L-Valyl-D- α -oxy-isovaleryl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleryl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-tert. butylester (VI)*

1,6 g (0,0045 Mol) *Z*-Didepsipeptidsäure II werden in 20 ml absol. Äther gelöst, bei 0° mit 1 g PCl_5 versetzt und 30 Min. bei 0° gerührt. Darauf wird zur Trockne verdampft, in 30 ml absol. Äther gelöst und bei -15° zu einer Lösung von 2,15 g (0,0045 Mol) Tetradepsipeptidesterbase V in 100 ml absol. Äther und 1,2 ml Triäthylamin getropft. Die Reaktionsmischung wird nach 4 Stdn. bei -15° gerührt und darauf zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in Äther gelöst, mit 5proz. Citronensäure, 5proz. NaHCO_3 -Lösung und Wasser unter Eiszusatz gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Das anfallende Öl wird an Kieselgel gereinigt, wobei das geschützte Hexadepsipeptid VI mit Benzol/Essigester (2%, 5%, 20% Essigester) eluiert wird. Ausb. 2,9 g Öl (79%). $[\alpha]_D^{24} = +33,1^\circ$ ($c = 1,06$, Benzol).

$\text{C}_{42}\text{H}_{67}\text{O}_{12}\text{N}_3$ (805,9). Ber. C 62,58, H 8,38, N 5,21.
Gef. C 62,58, H 8,33, N 5,24.

7. *L-Valyl-D- α -oxy-isovaleryl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleryl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-hydrobromid (VII)*

2,1 g (0,0026 Mol) geschütztes Hexadepsipeptid VI werden in 3 ml Eisessig gelöst, mit 5 ml HBr /Eisessig (gesätt.) versetzt und 5 Stdn. bei Raumtemp. geschüttelt. Dann wird 30 Min. im Wasserstrahlvakuum entgast, bei 30° zur Trockne verdampft und der ölige Rückstand verschiedene Male mit Petroläther gewaschen und dekantiert. Darauf wird das Hydrobromid dreimal aus Essigester/Petroläther gefällt. Ausb. 1,5 g (83%). $[\alpha]_D^{24} = -7,1^\circ$ ($c = 1,09$, Äthanol).

$\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_{10}\text{N}_3\text{Br}$ (696,67). Ber. N 6,03, Br 11,47.
Gef. N 6,24, Br 11,61.

8. *Z-N-Methyl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleryl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleryl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-tert. butylester (VIII)*

2,7 g (7,4 mMol) *Z*-N-Methyl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleriansäure² werden in 30 ml absol. Äther gelöst, auf 0° gekühlt und nach Zusatz von 1,68 g (8,1 Mol) PCl_5 30 Min. bei 0° gerührt. Darauf wird das Säurechlorid bei 30° im Vak. zur Trockne verdampft, in 30 ml absol. Äther gelöst und langsam zu einer Lösung von 3,5 g (7,4 mMol) L-Valyl-D- α -oxy-isovaleryl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-tert. butylester V und 1,7 ml (12,3 mMol) Triäthylamin in 100 ml absol. Äther bei -15° getropft. Dann wird noch 4 Stdn. weitergerührt, wobei die Temp. allmählich auf 0° ansteigt, mit 300 ml

Äther verdünnt, mit 5proz. Citronensäure, 5proz. NaHCO_3 und Wasser unter stetem Eiszusatz ausgewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Die Chromatographie an Kieselgel liefert in der Fraktion Benzol/20proz. Essigester 2,8 g (46%) öliges, geschütztes Hexadepsipeptid. $[\alpha]_D^{23} = -13,7^\circ$ ($c = 0,97$).

$\text{C}_{43}\text{H}_{69}\text{O}_{12}\text{N}_3$ (820,0). Ber. C 62,98, H 8,48, N 5,12.

Gef. C 63,12, H 8,52, N 5,10.

9. *N-Methyl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleryl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleryl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-hydrobromid (IX)*

2,4 g (2,9 mMol) geschütztes Hexadepsipeptid VIII werden in 3 ml Eisessig (gesätt.) versetzt und 4 Stdn. bei Raumtemp. aufbewahrt. Dann wird 15 Min. im Wasserstrahlvakuum entgast und bei 30° zur Trockne verdampft. Der ölige Rückstand wird dreimal mit Petroläther ausgewaschen unter jeweiliger Dekantierung. Das Hydrobromid wird zum Schluß dreimal aus Essigester/Petroläther gefällt, abgenutscht, mit Petroläther gewaschen und getrocknet. Ausb. 1,7 g (83%). $[\alpha]_D^{23} = -4,6^\circ$ ($c = 1$, Äthanol).

$\text{C}_{31}\text{H}_{56}\text{O}_{10}\text{N}_3\text{Br}$ (710,7). Ber. C 52,38, H 7,94, N 5,91.

Gef. C 52,07, H 7,87, N 5,98.

10. *Z-L-Valyl-D- α -oxy-isovaleryl-N-methyl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleryl-N-methyl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-tert. butylester (X)*

3,51 g (0,01 Mol) Z-L-Valyl-D- α -oxy-isovaleriansäure II werden in 80 ml absol. Äther gelöst und bei 0° mit 2,2 g (0,011 Mol) PCl_5 30 Min. magnetisch gerührt, wobei eine klare Lösung entsteht. Nachher wird zur Trockne verdampft, in 50 ml absol. Äther gelöst und zu einer auf -15° gekühlten Lösung von 5 g (0,01 Mol) N-Methyl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleryl-N-methyl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-tert. butylester² in 100 ml absol. Äther und 2,1 ml (0,015 Mol) Triäthylamin getropft. Nach 3 Stdn. Rühren bei -15° wird mit 200 ml Äther verdünnt und mit eiskalter 5proz. Citronensäure, eiskalter 5proz. NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Das anfallende Öl wird an Kieselgel chromatographiert, wobei das geschützte Hexadepsipeptid mit Benzol/Essigester eluiert wird. Ausb. 7,8 g (93%) Öl. $[\alpha]_D^{23} = -90,7^\circ$ ($c = 1,1$).

$\text{C}_{44}\text{H}_{71}\text{O}_{12}\text{N}_3$ (834,0). Ber. C 63,36, H 8,58, N 5,04.

Gef. C 63,41, H 8,72, N 4,88.

11. *L-Valyl-D- α -oxy-isovaleryl-N-methyl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleryl-N-methyl-L-valyl-D- α -oxy-isovaleriansäure-hydrobromid (XI)*

6,2 g (0,0073 Mol) Z-Hexadepsipeptidester X werden in 10 ml Eisessig gelöst, mit 15 ml HBr/Eisessig (gesätt.) versetzt und 6 Stdn. bei Raumtemp. geschüttelt. Darauf wird 15 Min. im Wasserstrahlvakuum entgast und bei 30° zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird dreimal mit Petroläther gewaschen und dieser jeweils dekantiert. Darauf wird das Hydrobromid dreimal aus Essigester/Petroläther gefällt. Ausb. 4,8 g (90%). $[\alpha]_D^{23} = -70,8^\circ$ ($c = 1$, Äthanol).

$\text{C}_{32}\text{H}_{58}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{Br}$ (724,7). Ber. C 53,03, H 8,07, Br 11,03.

Gef. C 53,19, H 8,17, Br 10,75.

12. Cyclisierung der Hexadepsipeptid-hydrobromide (XII, XIII, XIV)

Alle drei Hexadepsipeptid-hydrobromide VII, IX und XI wurden auf gleiche Weise cyclisiert. Für die Cyclisierung von VII zu XIV wurde Benzol verwendet, während zur Herstellung der Säurechloride von IX und XI und zu deren Cyclisierung zu XIII und XIV CHCl_3 gebraucht wurde. Jeweils 0,5 mMol des entsprechenden Hexadepsipeptid-hydrobromides wurden in 10 ml Benzol (CHCl_3) suspendiert und bei 0° mit 125 mg (0,6 mMol) PCl_5 versetzt. Die Suspension wurde 30 Min. in Eis und $3\frac{1}{2}$ Stdn. bei Raumtemp. gerührt, wobei eine klare Lösung entstand. Anschließend wurde bei 30° zur Trockne verdampft und das Säurechlorid in 1,8 l Benzol (CHCl_3) gelöst. Unter kräftigem Rühren wurde innerhalb 30 Min. 1,42 ml (0,01 Mol) Triäthylamin in 500 ml absol. Benzol (CHCl_3) zugetropft und die Lösung 18 Stdn. bei Raumtemp. aufbewahrt. Dann wurde zur Trockne verdampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen und dieser mit eiskalter 5proz. Citronensäure, eiskalter 5proz. NaHCO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde an Kieselgel chromatographiert, wobei die cyclischen Hexadepsipeptide mit Benzol/Essigester (1:1), Essigester und Äther eluiert wurden.

Das anfallende Tridesmethyl-Enniatin B (XIV) konnte direkt aus Methanol/Wasser analysenrein erhalten werden. Ausb. 30% d. Th.

Im Falle des Mono- und des Didesmethyl-Enniatin B wurde zuerst sublimiert und anschließend aus Methanol/Wasser umkristallisiert. Die Ausb. betrugen je 20%.

Die analytischen Daten der drei cyclischen Hexadepsipeptide sind in der Tab. 1 zusammengefaßt und mit Enniatin verglichen.

B. Mikrobiologische Methodik

Für die nephelometrischen Aktivitätsbestimmungen mit den Test-Organismen *Staphylococcus aureus* 6538 P (209), *Sarcina lutea* Ro 1053 b und *Escherichia coli* 1346 verwendeten wir Penassey-Bouillon (Difco Code 0243-02). Diejenigen mit dem Tuberkelbazillenstamm H 37 Rv führten wir auf dem Nährmedium nach Dubos mit Tween 80 und bovinem Albumin und diejenigen mit der Hefe *Candida albicans* auf Sabouraud-Bouillon (Difco-Code 0429-01) durch. Die Vorkulturen für die Inocula wurden auf denselben Nährmedien angelegt und waren bei ihrer Verimpfung im Falle der drei erstgenannten Mikro-Organismen und der Hefe 15 Stdn. gewachsen bei 37°C ; die Tuberkelbazillen brüteten wir mindestens 3 Wochen bei 37°C vor. Von jeder Kultur wurden gleichviel Keime verimpft, ca. 170 000 pro ml Nährmedium. Das Gesamtvolumen pro Reagensglas betrug 5 ml Nährmedium.

Die Enniatine wurden in Mengen von 1—2 mg in Methanol gelöst und mit dem entsprechenden Nährmedium auf diejenigen Ausgangskonzentrationen verdünnt, die am geeignetsten waren, um die 8—10 Konzentrationsstufen abzupipettieren, die für den betreffenden Mikro-Organismus nach 15stdg. bzw. 14tägiger Bebrütung (H 37 Rv) Konzentrations-abhängiges Wachstum gewährleisteten. Für Enniatin A lagen diese Bereiche zwischen 0,2 bis 2,5 γ pro Reagensglas (*Sarcina lutea*), 2 bis 4 γ pro Reagensglas (H 37 Rv), 4 bis 10 γ pro Reagensglas (*Staphylococcus aureus*), 10 bis 20 γ pro Reagensglas (*Candida albicans*) und 8 bis 30 γ pro Reagensglas (*Escherichia coli*). Für Enniatin B und die übrigen Derivate bewegten sie sich gemäß ihrer niedrigeren Aktivität in entsprechend höheren Konzentrationen. Die Grenz-

konzentrationen wurden durch die Interferenz mit der Methanolhemmung bestimmt, wobei jeder Mikroorganismus eine verschiedene Empfindlichkeit gegenüber Methanol aufwies. Am empfindlichsten waren die Sarcinen und die Tuberkelbazillen; am unempfindlichsten die Staphylokokken.

An Hand der Wachstumskurven des jeweiligen Standards errechneten wir die prozentuale Aktivität der zu vergleichenden Präparate. Die absolute Aktivität in γ /ml bestimmten wir aus den Kurven, und zwar mit jener Konzentration pro ml, die die Lichtdurchlässigkeit um 50% (im Vergleich zu einem unbeimpften Kontrollröhrchen von 100% Lichtdurchlässigkeit, Filter 530 Å) reduzierten.