

148. Synthesen in der Polymyxinreihe

10. Mitteilung¹⁾

Die Synthese von Colistin A (Polymyxin E₁)

von R. O. Studer, W. Lergier, P. Lanz, Erika Böhni und K. Vogler

(24. VI. 65)

1950 gelang es KOYAMA [2], aus Kulturen von *Bacillus colistinus* ein Antibioticum zu isolieren, das unter dem Namen Colistin bekannt wurde. Es zeigte eine starke Hemmwirkung vor allem gegen GRAM-negative Mikroorganismen, jedoch wurden in höheren Konzentrationen auch einige GRAM-positive Erreger gehemmt. Etwas später konnten ODA und Mitarbeiter [3] Colistin durch Papierchromatographie in drei verschiedene Komponenten auftrennen. Durch Gegenstromverteilung von handelsüblichem Colistin erhielt MORITO 1961 [4] eine Auftrennung in *zwei* Komponenten, während 1963 SUZUKI und Mitarbeiter [5] auf gleichem Wege *drei* Verbindungen isolieren konnten, die als Colistin A, B und C bezeichnet wurden. Colistin C ist meist nur, wenn überhaupt, in geringer Menge in Handelsprodukten enthalten [5].

Verschiedene Strukturen sind bis heute für Colistin vorgeschlagen worden. So formulierte SUZUKI 1957 [6] Colistin als ein Cyclo-octapeptid, bestehend aus fünf Molekeln L- α , γ -Diaminobuttersäure und je einer Molekel L-Threonin, L-Leucin, D-Leucin sowie (+)-6-Methyloctansäure. BIZERTE & DAUTREVAUX [7] fanden 1961 nach Totalhydrolyse von Colistin und quantitativer Aminosäureanalyse, dass Colistin zusätzlich zu den von SUZUKI [6] bestimmten Aminosäuren je eine weitere Molekel L- α , γ -Diaminobuttersäure und L-Threonin enthält. Auf Grund der nach saurer Partialhydrolyse isolierten und identifizierten Peptide schlugen sie für Colistin zwei mögliche Strukturen in Form eines Cyclo-pentapeptides mit einer fünfgliedrigen Seitenkette vor. Ungefähr gleichzeitig arbeiteten SUZUKI und Kollegen mit den reinen Komponenten Colistin A und B. Sie fanden 1963 [6], dass beide die gleiche, schon früher am Gemisch [7] bestimmte Aminosäurezusammensetzung aufweisen. Aus Colistin A wurde (+)-6-Methyloctansäure und aus Colistin B 6-Methylheptansäure isoliert [6]. Durch saure Partialhydrolyse [8] einerseits sowie durch enzymatischen Abbau mit Nagarse [9] andererseits und Identifizierung der Bruchstücke gelangten sie zu einer von den frühern Vorschlägen abweichenden Struktur für Colistin A (Fig. 1). Auf analogem Wege konnte von den gleichen Autoren [10] auch Colistin B aufgeklärt werden, das sich von Colistin A nur in der Fettsäurekomponente unterscheidet, indem an Stelle der (+)-6-Methyloctansäure 6-Methylheptansäure vorkommt.

Beide sind sehr nahe verwandt mit den Polymyxinen B₁ und B₂. Colistin A bzw. B unterscheiden sich von Polymyxin B₁ bzw. Polymyxin B₂ nur durch einen Austausch des D-Phenylalanins durch D-Leucin.

Vor kurzem gelang es WILKINSON & LOWE [11], das schon längere Zeit bekannte Polymyxin E durch Gegenstromverteilung in zwei Komponenten, E₁ und E₂, aufzu-

¹⁾ 9. Mitteilung s. [1]. – Abkürzungen: Z = Benzyloxycarbonyl; BOC = *t*-Butyloxycarbonyl; OBu^t = *t*-Butylester; PHT = Phtaloyl; MOA = (+)-6-Methyloctansäure.

trennen. Strukturuntersuchungen führten zum Ergebnis, dass Polymyxin E₁ mit Colistin A und Polymyxin E₂ mit Colistin B identisch sind [12]. Ungefähr gleichzeitig kamen SUZUKI und Mitarbeiter zu einem analogen Ergebnis [13].

Im Rahmen unserer Arbeiten in der Polymyxinreihe gelang es nun, diese Struktur von Colistin A (Polymyxin E₁) (Fig. 1) durch Totalsynthese zu bestätigen.

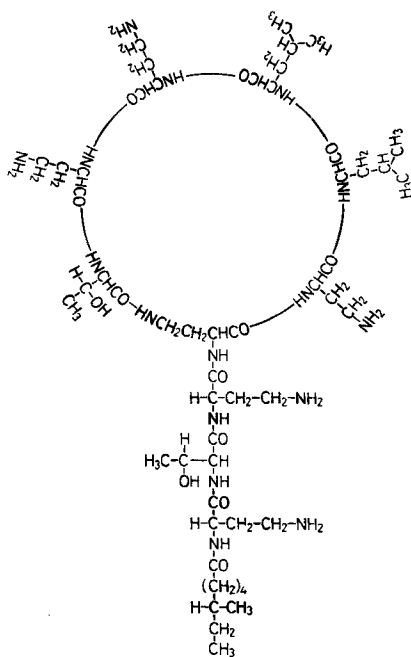


Fig. 1. Struktur des verzweigten Cycloheptapeptides VI = Colistin A (Polymyxin E₁)

Die Synthese von Colistin A erfolgte in Anlehnung an diejenige von Polymyxin B₁ [14] über das geschützte verzweigte Decapeptid (Fig. 2), das in 7-Stellung einen D-Leucinrest anstelle des im Polymyxin B₁ enthaltenen D-Phenylalaninrestes besitzt. Es konnte deshalb das bereits für die Synthese von Polymyxin B₁ [14] gebrauchte Octapeptid IV (Fig. 3) verwendet werden, während das Dipeptid III (Fig. 3) neu hergestellt werden musste.

Dazu wurde N^α-Phtaloyl-N^γ-Z-L-α,γ-diaminobuttersäure mit D-Leucin-*t*-butylester mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid gekuppelt und anschliessend die Phtaloylgruppe mit Hydrazin entfernt. Die Kondensation des Octapeptid-hydrazides IV mit dem Dipeptid III (Fig. 3) nach dem Azidverfahren führte zum vollständig geschützten Decapeptid V (Fig. 2). Die beiden Kettenenden 1 und 7 wurden durch Behandlung mit Trifluoressigsäure freigelegt und das erhaltene Produkt in hoher Verdünnung mit überschüssigem Dicyclohexylcarbodiimid in Dimethylformamid/Dioxan cyclisiert. Aus dem Cyclisierungsprodukt wurden die restlichen Schutzgruppen durch Natrium in flüssigem Ammoniak entfernt. Anschliessend erfolgte die Reinigung dieses Rohproduktes durch Gegenstromverteilung im System *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Was-

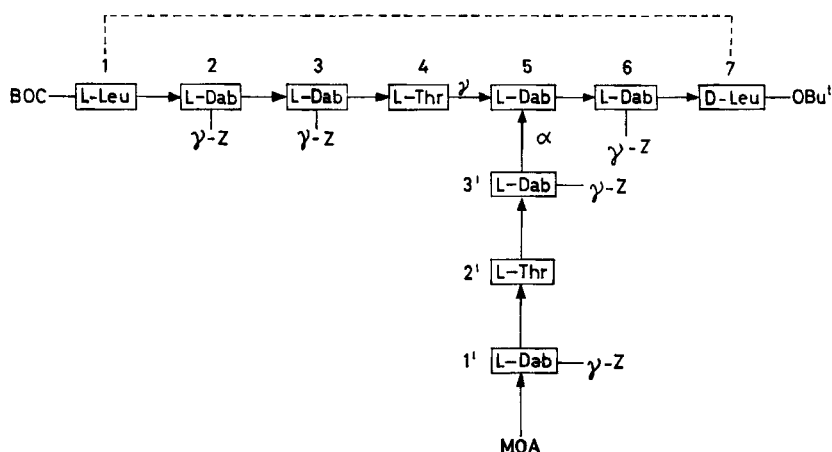


Fig. 2. Struktur des geschützten Decapeptides V

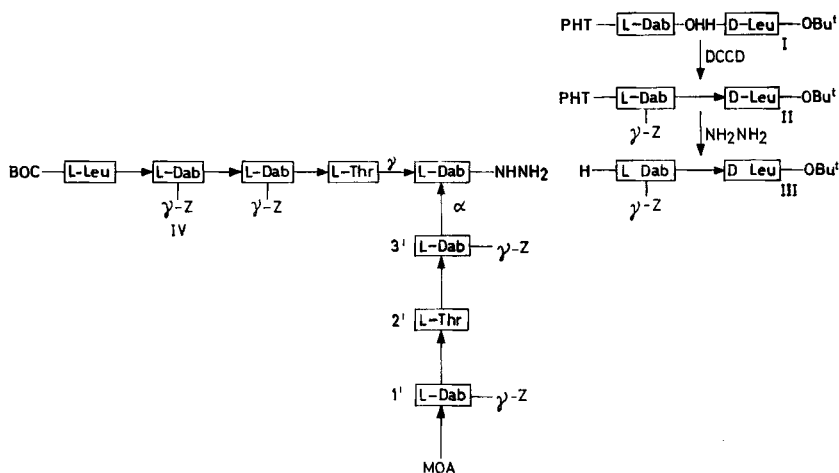


Fig. 3. Aufbauschema des geschützten Decapeptides V

ser (40:10:5:45) über 180 Stufen und Fällung in konz. NH_3 bei 0° . Das cyclische Decapeptid konnte analog dem Polymyxin B_1 als Pentaphosphat kristallisiert werden. Das zum Vergleich mit dem synthetischen Produkt herangezogene natürliche Colistin A^2) konnte ebenfalls als Phosphat kristallin erhalten werden. DEBYE-SCHERRER-Röntgenaufnahmen der beiden in Nadelbüscheln kristallisierenden Verbindungen zeigten identische Charakteristika.

Die physikalisch-chemischen Daten des kristallinen Phosphates des Cyclohepta-peptids sind in Tabelle 1 zusammengestellt und mit denjenigen des kristallinen Phosphates von Colistin A (Polymyxin E_1) verglichen. Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse weist auf die Identität der entsprechenden Produkte hin.

²⁾ Für die freundliche Überlassung eines Präparates von Colistin A danken wir Herrn Prof. T. SUZUKI, Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka (Japan).

Auch die Rotationsdispersionskurven der Nickelkomplexe, die bei der Identifizierung von Polymyxin B₁ [14] [15] besonders wichtig waren, zeigen völlige Übereinstimmung (Fig. 4).

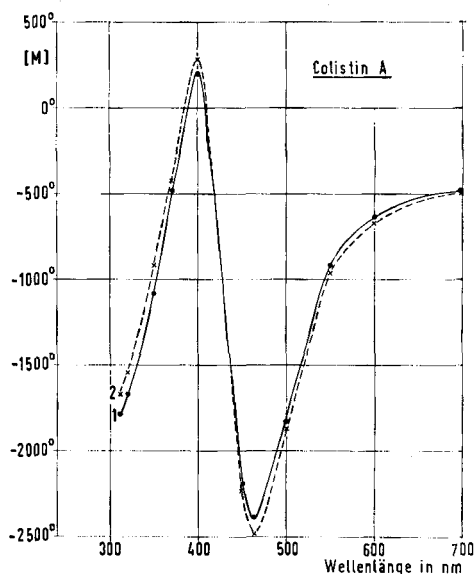


Fig. 4. Rotationsdispersionskurven des Nickelkomplexes von natürlichem und synthetischem Colistin A
1 natürliches Colistin A; 2 synthetisches Colistin A

Tabelle 1. Analytische Charakterisierung der Phosphate von natürlichem und synthetischem Colistin A (Polymyxin E₁)

Charakterisierung	Colistin A natürlich	Colistin A synthetisch
1. Papierchromatographie	R _f = 0,65, homogen	R _f = 0,65, homogen
2. Dünnschichtchromatographie	R _f = 0,48, homogen	R _f = 0,48, homogen
3. Hochspannungselektrophorese	1,0 His, homogen	1,0 His, homogen
4. Freie Aminogruppen nach Ninhydrin-Bestimmung	5,0 ± 10%	4,73 ± 10%
5. Spezifische Drehung [α] ₅₈₉ ± 2°, Wasser, korrigiert auf wasserfreie Substanz	-52,1° (c = 0,48) -59,2° (c = 0,42)	-55,2° (c = 0,39) -60,2° (c = 0,36)
6. Wasserbestimmung (K. FISCHER)	11,95%	8,38%
7. Zersetzungspunkte	187–192°	187–192°
8. Totalhydrolyse-Aminosäureverhältnis (ber. Dab 6,0 Thr 2,0 Leu 2,0)		gef. Dab Thr Leu 5,82 1,96 1,92

Erläuterungen zur Tabelle. – 1. Die Papierchromatographie wurde auf SCHLEICHER & SCHÜLL-Papier 2043b mgl, gewaschen, 15 Std. absteigend, bei ca. 25° im Laufmittel *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24 durchgeführt. Aufgetragen wurden in der Regel 20 µg in 2 µl. Die Entwicklung erfolgte durch Besprühen mit 0,5-proz. alkoholischer Ninhydrinlösung und kurzes Erhitzen auf 100°.

2. Die Herstellung der Kieselgel-Platten und die Arbeitstechnik entsprechen den Originalangaben von STAHL [16]. Als Laufmittel diente das gleiche Gemisch wie bei der Papierchromatographie. Die Laufzeit betrug 2–3 Std.; aufgetragen wurden ca. 5 µg in 1 µl.

3. Wir benutzten den Hochspannungs-Pherographen nach WIELAND & PFLEIDERER [17] der Firma L. HORMUTH, Heidelberg. Arbeitsbedingungen: Papier: SCHLEICHER & SCHÜLL 2043b mgl, gewaschen; Elektrolyt: 2N Essigsäure (pH ca. 2,5); Feldstärke: 65 V · cm⁻¹; Versuchsdauer: 45 Min.; Kammertemperatur: +1° bis +3°. Die Wanderstrecke wird im Verhältnis zu derjenigen des Histidins, das gleichzeitig mitlief, angegeben.

4. Zur Ermittlung der Anzahl freier Aminogruppen wurde das für Aminosäure-Bestimmungen viel gebrauchte Ninhydrin-Hydrindantin-Reagens pH 4,7 (s. z. B. BOISSONNAS [18]) verwendet, als Vergleichssubstanz wurde Colistin A mitbestimmt.

5. Die Drehungsmessungen wurden in einem photoelektrischen Polarimeter mit Thermostat, das in unserer physikochemischen Abteilung durch Dr. F. BURKHARDT entwickelt worden war, aufgenommen.

6. Die Wasserbestimmung sowie alle übrigen Mikroanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung unter der Leitung der Herren Dres. H. WALDMANN und A. DIRSCHERL ausgeführt.

8. Nach [19] in dankenswerter Weise bestimmt von Herrn Prof. Dr. MAX BRENNER von der Organisch-chemischen Anstalt der Universität Basel.

Der enzymatische Abbau mit Nagarse [9] führte bei beiden Substanzen zu plattenchromatographisch identischen Bruchstücken.

Die antibakterielle Aktivität des Cycloheptapeptides VI wurde gegen verschiedene Erreger *in vitro* sorgfältig mit derjenigen von natürlichem Colistin A-Phosphat nach der schon früher beschriebenen Methodik [15] verglichen (Tabelle 2). Als Standard wurde Colistinsulfat (FDA Lot M 8863) mit einer Aktivität von 669 mcg Base/mg oder 20070 E/mg verwendet. Aus Tabelle 2 geht hervor, dass die Pentaphosphate von natürlichem und synthetischem Colistin A gegenüber *Brucella bronchiseptica* ATCC 4617, *Escherichia coli* ATCC 10536 und *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10131 etwas schwächer wirksam sind als der Colistinstandard. Gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* ist die Wirkung praktisch gleich. Gegenüber allen Organismen erweist sich das synthetische Produkt innerhalb der Fehlergrenzen als gleich aktiv wie Colistin A.

Auf Grund aller vorliegenden Daten kann geschlossen werden, dass unser Syntheseprodukt mit natürlichem Colistin A bzw. Polymyxin E₁ übereinstimmt und dass diesem deshalb die von SUZUKI *et al.* [9] vorgeschlagene Struktur VI (Fig. 1) zukommt.

Tabelle 2. Antibakterielle Aktivität der Pentaphosphate von synthetischem und natürlichem Colistin A (Polymyxin E₁) *in vitro* (Standardabweichung $\pm$ 20%) Standard = Colistin FDA Lot M 8863

Mikroorganismus	synthetisch			natürlich		
	mcg/mg	E/mg	% Standard	mcg/mg	E/mg	% Standard
<i>Brucella bronchiseptica</i> ATCC 4617	523	15695	78	518	15554	77
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	612	18344	91	730	21495	109
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	565	16939	84	542	16257	81
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10131	569	17059	85	532	15956	79,5

Experimenteller Teil³⁾

1) D-Leucin-*t*-butylester-hydrochlorid (I). 100 g N-Carbobenzoxymethyl-D-leucin-*t*-butylester (Öl, hergestellt durch Carbobenzoxymethylierung von D-Leucin und direkte Umsetzung des entstandenen Öls mit Isobutylen [20]) werden in 500 ml Methanol mit 10 g 5-proz. Pd-Kohle in üblicher Weise hydriert. Der Katalysator wird abgetrennt, das Filtrat im Vakuum eingedampft, das Öl in wenig

³⁾ Die Smp. wurden auf dem KOFLER-Block bestimmt und sind korrigiert. Die Analysenmuster wurden 16 Std. über P₂O₅ bei 0,01 Torr und 100° getrocknet. Für die sorgfältige Mitarbeit danken wir den Herren K. SCHWEIZER und W. BERNASCONI.

abs. Alkohol gelöst, auf -30° abgekühlt und mit alkoholischem 4N HCl auf ein pH von 4 eingestellt. Nach Zusatz von abs. Äther beginnt die Kristallisation. Ausbeute 51,5 g (74%). Smp. 165° (Zers.); $[\alpha]_D^{25} = -18,5^\circ$ ($c = 2$, in Alkohol). Literaturwert für das L-Isomere [21] $[\alpha]_D^{20} = +19,8^\circ$. $C_{10}H_{22}O_2NCl$ (223,74) Ber. C 53,68 H 9,91 Cl 15,85% Gef. C 53,91 H 10,01 Cl 15,83%

2) *N α -PHT-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-D-leucin-t-butylester (II)*. 11,2 g (0,05 Mol) D-Leucin-t-butylester-hydrochlorid (I), in 50 ml Tetrahydrofuran gelöst, werden bei 0° mit 7 ml (0,05 Mol) Triäthylamin geschüttelt, vom Triäthylaminhydrochlorid abgenutscht und das Filtrat mit einer Lösung von 21 g (0,055 Mol) *N α -Phtaloyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure* [14] in 40 ml Tetrahydrofuran versetzt. Zu dieser Lösung gibt man bei -10° eine Lösung von 10,3 g Dicyclohexylcarbodiimid in 15 ml Tetrahydrofuran und lässt 20 Std. bei -5° stehen. Der Harnstoff wird abgenutscht, das Filtrat im Vakuum eingedampft, der Rückstand in Essigester aufgenommen, unter Eiszusatz mit 3-proz. Zitronensäure, $NaHCO_3$ -Lösung und 5-proz. NaCl-Lösung neutralgewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Man erhält 24 g (87%) eines blasigen Schaumes, der aus Äther/Petroläther kristallisiert, Smp. $134-136^\circ$; $[\alpha]_D^{22} = +21^\circ$ ($c = 2$, in Dimethylformamid).
 $C_{30}H_{37}O_7N_3$ Ber. C 65,32 H 6,76 N 7,62 O 20,30%
 (551,62) Gef. „ 65,48 „ 6,79 „ 7,78 „ 20,12%

3) *N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-D-leucin-t-butylester (III)*. 27,5 g (0,05 Mol) *N α -PHT-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-D-leucin-t-butylester* (II) in 200 ml Alkohol werden mit 2,5 ml (0,05 Mol) 100-proz. Hydrazinhydrat versetzt und 1 Std. am Rückfluss gekocht. Nach 10 Min. scheidet sich ein stark gequollener Niederschlag ab. Das Lösungsmittel wird im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wird durch kräftiges Schütteln zwischen Essigester und verdünntem Ammoniak verteilt, das Ganze vom Ungelösten abgenutscht, mit Essigester und 3N Ammoniak gewaschen, im Scheidetrichter mit Essigester extrahiert, der organische Extrakt über $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum eingedampft. Ausbeute 19,6 g (90%) Öl, das plattenchromatographisch einheitlich ist und direkt weiterverwendet wird.

4) *N α -(+)-6-Methyloctanoyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -[BOC-L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-D-leucin-t-butylester (V)*. 2,4 g (1,47 mMol) *N α -(+)-6-Methyloctanoyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -[BOC-L-leucyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- α , γ -diaminobuttersäure-hydrazid (IV) werden in 45 ml Dimethylformamid gelöst, auf -12° gekühlt, langsam mit 5,88 ml (5,88 mMol) 1N HCl versetzt und anschliessend mit 1,74 ml (1,74 mMol) 1N $NaNO_2$ -Lösung behandelt. Nach 5 Min. Rühren bei -12° wird das Azid mit auf -12° vorgekühlter 20-proz. NaCl-Lösung gefällt, abgenutscht, mit eiskalter 20-proz. $NaHCO_3$ -Lösung und Eiswasser gewaschen und scharf abgepresst. Darauf wird das Azid in eine eiskalte Lösung von 630 mg (1,5 mMol) *N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-D-leucin-t-butylester* (III) in 15 ml Dimethylformamid eingetragen und bis zur vollständigen Lösung in Eis gerührt. Anschliessend wird die Reaktionsmischung über Nacht im Eiskasten aufbewahrt. Das entstandene Gel wird mit 200 ml Äthanol verrieben, abgenutscht, mit Alkohol und Äther gewaschen und getrocknet. Das so erhaltene Produkt wird aus Dimethylformamid/Wasser umgefällt. Ausbeute 2,2 g (69%). Smp. $229-230^\circ$; $[\alpha]_D^{24} = -21,4^\circ$ ($c = 1$, in Dimethylformamid). Nach Totalhydrolyse beträgt das Aminosäureverhältnis Dab:Thr:Leu 6,2:2,1:2,0 (ber. 6,0:2,0:2,0). Das Produkt enthält 2 Mol. Dimethylformamid.*

$C_{102}H_{148}O_{26}N_{16}, 2C_3H_7ON$ Ber. C 60,00 H 7,55 N 11,68%
 (2160,5) Gef. „ 60,08 „ 7,52 „ 11,70%

5) *Abspaltung der Schutzgruppen an den Kettenenden 1 und 7 und Cyclisierung zu VI*. 2,6 g des geschützten Decapeptides V werden mit 5 ml Trifluoressigsäure 15 Min. bei Raumtemperatur geschüttelt, wobei vollständige Lösung eintritt. Darauf wird in Eis gekühlt, mit eiskaltem Äther gefällt, abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet. Die Substanz wird anschliessend in wenig Dimethylformamid gelöst, mit etwas Pyridin alkalisch gestellt und dann mit Wasser gefällt, abgenutscht, mit Wasser und Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute 2,5 g, die direkt zur Cyclisierung verwendet werden.

5 g dieses Produktes werden in 6,5 l Dimethylformamid gelöst und unter kräftigem Rühren zu einer Lösung von 208 g Dicyclohexylcarbodiimid in 26 l Dioxan getropft. Die Lösung wird $3\frac{1}{2}$ Tage bei Raumtemperatur gerührt, darauf mit 230 ml 50-proz. Essigsäure versetzt und bei 35°

auf ca. 1 l konzentriert. Vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff wird abgenutscht und das Filtrat zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird in 500 ml Dimethylformamid gelöst, von einer weiteren Menge Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und erneut bei 35° zur Trockne verdampft. Dieser Prozess wird noch 3mal wiederholt. Dann wird in 100 ml Dimethylformamid gelöst und in 1,5 l Äther/Petroläther 2:1 ausgerührt, abgenutscht, mit Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute an Rohprodukt 4,5 g.

6) *Entfernung der Schutzgruppen.* 4,5 g Roh-Cyclisierungsprodukt werden in 800 ml flüssigem Ammoniak gelöst und mit Na bis zu einer 20 Min. bestehenden Blaufärbung reduziert. Dann werden 3 g Ammoniumchlorid zugegeben, das Ammoniak verdampft und letzte Spuren durch Evakuieren im Wasserstrahlvakuum entfernt. Der Rückstand wird in 100 ml Eiswasser gelöst, bei 0° mit 6N HCl auf pH 6 gestellt, filtriert und das Filtrat lyophilisiert.

7) *Reinigung des Cyclisierungsproduktes.* – a) *Multiplikative Verteilung.* Das salzhaltige Rohprodukt wurde einer multiplikativen Verteilung über 185 Stufen im System *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (40:10:5:45) unterworfen. Die Verteilungskurve erhielten wir durch Umsetzen von je 0,2 ml unterer Phase mit FOLIN-DENIS-Reagens [22] und Bestimmung der optischen Dichten bei 750 nm. Die Verteilung wurde zudem plattenchromatographisch kontrolliert. Die vereinigten Gläscheninhalte 98–116 wurden im Hochvakuum bei Raumtemperatur konzentriert und anschliessend 2mal lyophilisiert; es resultierten 430 mg noch leicht klebrige (Pyridinacetat) Hauptfraktion.

b) *Umfällen über die freie Base.* Die lyophilisierte Verteilungs-Hauptfraktion wurde in ca. 5 ml Wasser gelöst und in diese Lösung unter Eis-Kochsalzkühlung 15–20 Min. NH_3 eingeleitet. Anschliessend wurde abzentrifugiert, 3mal mit 5-proz. eiskaltem Ammoniak gewaschen, in Wasser suspendiert und 2mal lyophilisiert. Die Base wurde in der berechneten Menge 0,1N HCl gelöst und die ganze Operation des Umfällens über die freie Base noch 2mal wiederholt. Nach der dritten Fällung verblieben 80 mg farblose Base mit einer antibakteriellen Aktivität von 14420 E/mg (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 100131, *in vitro*).

c) *Überführen der Base in das kristalline Pentaphosphat.* 80 mg Base wurden in 2,0 ml wässriger 1,80-proz. H_3PO_4 gelöst und in der Siedehitze bis zur beginnenden Trübung tropfenweise mit abs. Äthanol versetzt. Die Lösung wurde zuerst langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die Kristallisation begann spontan in der noch warmen Lösung. Anderntags wurde der Niederschlag abgenutscht, mit kaltem abs. Äthanol gewaschen und bei Raumtemperatur im Vakuumexsikkator über konz. H_2SO_4 getrocknet; 70 mg annähernd farbloses, kristallines Pulver.

Umkristallisation: 65 mg des obigen Präparates wurden in 2 ml abs. Äthanol suspendiert und unter Erhitzen auf dem Dampfbad durch tropfenweisen Zusatz von heissem Wasser in Lösung gebracht. Die Lösung wurde faserfrei filtriert, das Filtrat in der Siedehitze bis zur bleibenden Trübung mit abs. Äthanol versetzt, die Trübung mit 1–2 Tropfen der verdünnten H_3PO_4 eben zum Verschwinden gebracht und die Lösung langsam abgekühlt. Nach Stehen über Nacht bei 4° wurde der Niederschlag wie oben abgenutscht, gewaschen und getrocknet; es resultierten 43 mg eines farblosen, in feinen Nadeln kristallisierten Produktes, dessen analytische Charakterisierung in Tabelle 1 zusammengefasst ist.

8) *Herstellung der Nickelkomplexe und Rotationsdispersions-Messung.* Die Nickelkomplexe [23] wurden durch Zusammengeben äquimolarer Mengen Peptid und Nickelsulfat und Einstellen des pH mit 0,1N NaOH auf 9,4 hergestellt. Die Peptidkonzentration in der Endlösung betrug ca. 0,10%. Die RD.-Spektren wurden in unserer physikalischen Abteilung von Dr. F. BURKHARDT mit einem automatischen, selbstabgleichenden Polarimeter aufgenommen. Die erste Messung erfolgte sofort nach Herstellung der Nickelkomplexe; zwei weitere Messungen wurden nach 24stündiger bzw. 7tägiger Alterung der Komplexlösungen bei Raumtemperatur aufgenommen. Die $[\alpha]$ -Werte wurden in den Kurven (Fig. 4) als molekulare Drehung, berechnet auf wasserfreies Colistin A-pentaphosphat ($M = 1659,48$), aufgezeichnet.

9) *Abbau mit Nagarse.* Je 1,5 mg natürliches und synthetisches Colistin A-pentaphosphat wurden in 0,4 ml pH 8-Puffer (0,05M Ammoniumacetat + 0,05M NaHCO_3) gelöst und 0,1 ml Enzymlösung, enthaltend 40 μg Nagarse [9], zugefügt. Nach 4 und 24 Std. Inkubation bei 37° wurden Probchen von je 2 μl dünnschichtchromatographisch im System *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser 30:20:6:24 (*v/v*) miteinander verglichen. Man erhält identische Chromatogramme.

10) DEBYE-SCHERRER-*Diagramme*. Die RÖNTGEN-Diagramme nach DEBYE-SCHERRER wurden mit einem PHILIPS-Röntgengoniometer PW 1050 und Cu- K_{α} -Strahlung durch Herrn Dr. C. VON PLANTA aufgenommen. Es wurden folgende identische Netzebenenabstände für das synthetische und natürliche Colistin A-pentaphosphat, kristallisiert aus Äthanol/Wasser, gemessen: 8,18 Å, 12,27 Å und $24,5 \text{ Å} \pm 1\%$.

SUMMARY

Colistin A (Polymyxin E₁), an antibiotic isolated in 1950 from cultures of *B. colistinus*, is shown by synthesis to have the cyclo-heptapeptide structure VI (Figure 1) already proposed by other workers on the evidence of degradation studies.

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

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER & ERIKA BÖHNI, *Helv.* **48**, 1161 (1965); siehe auch vorläufige Mitteilung in *Chimia* **18**, 406 (1964).
 - [2] Y. KOYAMA, *Jap. Pat.* 1952, No. 1546; *Chem. Abstr.* **47**, 6097 (1953); Y. KOYAMA, A. KUROSAWA, A. TUCHIYA & K. TAKAHISADA, *J. Antibiotics (Japan)* **3**, 457 (1950).
 - [3] T. ODA, M. KINOSHITA, O. YAMANAKA & F. UEDA, *J. pharmaceut. Soc. Japan* **74**, 1243 (1953).
 - [4] T. MORITO, *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **36**, 393 (1961).
 - [5] T. SUZUKI, H. INOUE, K. FUJIKAWA & Y. SUKELA, *J. Biochemistry (Japan)* **54**, 25 (1963).
 - [6] K. SUZUKI, *Ann. Rept. Tohoku Coll. Pharmacy* **4**, 135 (1957).
 - [7] M. DAUTREVAUX & G. BISERTE, *Bull. Soc. Chim. biol.* **43**, 495 (1961).
 - [8] T. SUZUKI, H. INOUE, K. FUJIKAWA & S. NAGASAWA, *J. Biochemistry (Japan)* **54**, 173 (1963).
 - [9] T. SUZUKI, K. HAYASHI & K. FUJIKAWA, *J. Biochemistry (Japan)* **54**, 412 (1963).
 - [10] T. SUZUKI & K. FUJIKAWA, *J. Biochemistry (Japan)* **56**, 182 (1964).
 - [11] S. WILKINSON & L. A. LOWE, *J. chem. Soc.* **1964**, 4107.
 - [12] S. WILKINSON & L. A. LOWE, *Nature* **204**, 185 (1964).
 - [13] T. SUZUKI *et al.*, *J. Biochemistry (Japan)* **57**, 226 (1965).
 - [14] K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER & ERIKA BÖHNI, *Helv.* **48**, 1161 (1965).
 - [15] K. VOGLER, R. O. STUDER, P. LANZ, W. LERGIER, ERIKA BÖHNI & B. FUST, *Helv.* **46**, 2823 (1964).
 - [16] E. STAHL, *Arbeitsvorschrift für Dünnschichtchromatographie*, herausgegeben von der Firma C. DESAGA, GMBH, Heidelberg.
 - [17] TH. WIELAND & G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* **67**, 257 (1955).
 - [18] R. A. BOISSONNAS, *Helv.* **33**, 1975 (1950).
 - [19] ST. MOORE & W. H. STEIN, *J. biol. Chemistry* **192**, 663 (1951).
 - [20] G. W. ANDERSON & F. H. CALLAHAN, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 3359 (1960).
 - [21] E. TASCHNER, A. CHIMIAK, B. BATER & T. SOKOLOWSKA, *Liebigs Ann. Chem.* **646**, 134 (1961).
 - [22] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR & ROSE J. RANDALL, *J. biol. Chemistry* **193**, 265 (1951).
 - [23] H. BRINTZINGER, *Helv.* **44**, 744 (1961).
-