

104. Synthese einer geschützten Pentapeptid-Sequenz des Tyrocidins A unter Verwendung farbiger Schutzgruppen und des p-Nitrobenzyl-Restes

von R. SCHWYZER und P. SIEBER

Herrn Prof. Dr. P. KARRER zum 70. Geburtstag gewidmet

(14. III. 59)

Im homodet cyclischen Dekapeptid Gramicidin S kommt die Pentapeptid-Sequenz *L*-Valyl-*L*-ornithyl-*L*-leucyl-*D*-phenylalanyl-*L*-prolyl zweimal vor¹⁾. Das nahe verwandte, homodet cyclische Dekapeptid Tyrocidin A besitzt nach den Ergebnissen der Strukturaufklärung dieselbe Sequenz, aber nur einmal; als weitere Pentapeptid-Sequenz ist darin *L*-Phenylalanyl-*D*-phenylalanyl-*L*-asparaginyl-*L*-glutaminyl-*L*-tyrosin enthalten²⁾. Im Laufe unserer synthetischen Untersuchungen über homodet cyclische Polypeptide haben wir nun diese Pentapeptid-Sequenz in geschützter Form hergestellt.

Dazu wurde eine der von uns neulich beschriebenen, farbigen Schutzgruppen³⁾, und zwar *p*-(*p*'-Methoxy-phenylazo)-benzyloxycarbonylchlorid (MZ-Chlorid), verwendet. Diese wurde bereits bei der Synthese einer im Adrenocorticotropin vorkommenden Pentapeptid-Sequenz gebraucht⁴⁾.

Zum Schutze der α -Carboxylgruppe haben wir bei der im folgenden beschriebenen Synthese zum ersten Male den *p*-Nitrobenzyl-Rest verwendet. Dieser ist wie der oft gebrauchte Benzylrest⁵⁾ sowohl durch alkalische Hydrolyse als auch reduktiv leicht selektiv abspaltbar, ist aber im Gegensatz zu diesem gegenüber Bromwasserstoffsäure in Eisessig wesentlich resisterter. Er eignet sich deshalb zu Synthesen, bei denen die N-Schutzgruppe mittels dieses Reagens⁶⁾ abgespalten werden soll, in besonderem Masse.

Die hier beschriebene Synthese geht von O-Acetyl-*L*-tyrosin-*p*-nitrobenzylester-hydrobromid (I) aus. Diese Verbindung wurde durch Umsatz von N-Carbobenzoxy-O-acetyl-*L*-tyrosin⁷⁾ mit *p*-Nitrobenzylbromid und Triäthylamin⁸⁾ hergestellt. Die Carbobenzoxygruppe wurde mittels HBr in Eisessig abgespalten⁶⁾.

Der Umsatz des O-Acetyl-*L*-tyrosin-*p*-nitrobenzylester-hydrobromids (I) mit MZ-*L*-Glutaminsäure- γ -methylester (II)⁹⁾ erfolgte nach der Phosphoroxychlorid-Methode⁹⁾. Die Abspaltung der farbigen Schutzgruppe aus dem kristallisierten Dipeptid-

¹⁾ Lit. vgl. R. SCHWYZER, Chimia **12**, 53 (1958).

²⁾ A. PALADINI & L. C. CRAIG, J. Amer. chem. Soc. **76**, 688 (1954).

³⁾ R. SCHWYZER, P. SIEBER & K. ZATSKÓ, Helv. **41**, 491 (1958).

⁴⁾ R. SCHWYZER & C. H. LI, Nature **182**, 1669 (1958).

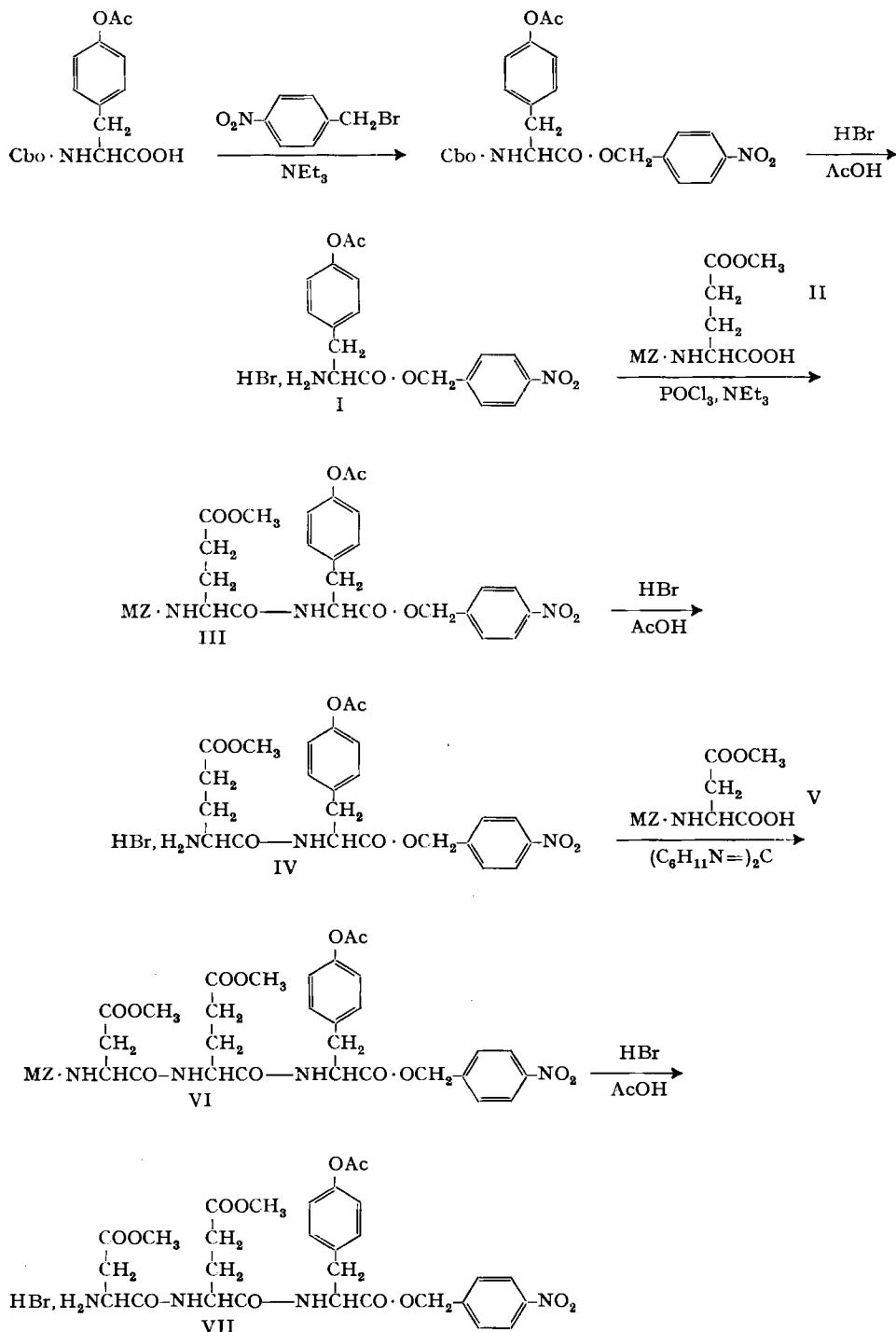
⁵⁾ M. BERGMANN & J. S. FRUTON, J. biol. Chemistry **117**, 189 (1937).

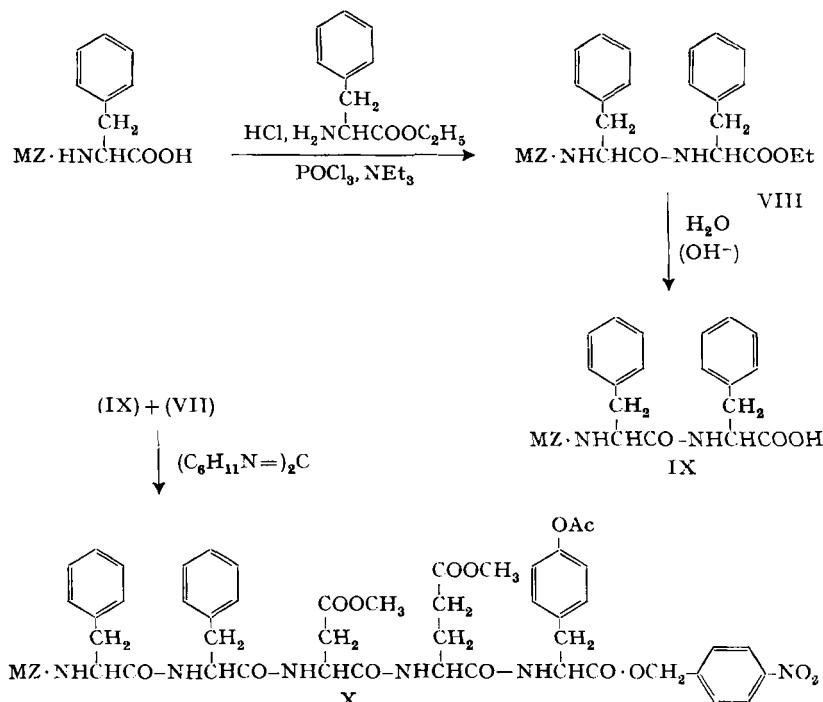
⁶⁾ D. BEN-ISHAI & A. BERGER, J. org. Chemistry **17**, 1564 (1952); N. F. ALBERTSON & F. C. MCKAY, J. Amer. chem. Soc. **75**, 5323 (1953); D. BEN-ISHAI, J. org. Chemistry **19**, 62 (1954).

⁷⁾ M. BERGMANN, L. ZERVAS, L. SALZMANN & H. SCHLEICH, Z. physiol. Chem. **224**, 17 (1934).

⁸⁾ Methode vgl. R. SCHWYZER, B. ISELIN & M. FEURER, Helv. **38**, 69 (1955).

⁹⁾ TH. WIELAND & B. HEINKE, Liebigs Ann. Chem. **599**, 70 (1956).





derivat III¹⁰⁾ gelang mit 2-n. HBr in Eisessig bei 40°. Der entstandene L-Glutamyl-L-O-acetyltyrosin- α -p-nitrobenzyl- γ -methylester (IV) wurde ohne spezielle Reinigung mit MZ-L-Asparaginsäure- β -methylester (V)³⁾ umgesetzt. Da die Phosphoroxychlorid-Methode bei diesem Umsatze versagte, wurde Dicyclohexyl-carbodiimid¹¹⁾ angewandt. Das Tripeptid-Derivat MZ-L-Aspartyl-L-glutamyl-L-O-acetyltyrosin- α -p-nitrobenzyl- β , γ -dimethylester (VI) kristallisierte ohne besondere Reinigung; die farbige Schutzgruppe wurde daraus wieder mittels HBr in Eisessig abgespalten.

Der weitere Aufbau erfolgte unter Angliederung des Dipeptid-Derivates MZ-L-Phenylalanyl-D-phenylalanin (IX). Diese Verbindung wurde durch Umsatz von MZ-L-Phenylalanin³⁾ mit D-Phenylalanin-äthylester nach der Phosphoroxychlorid-Methode⁹⁾ gewonnen, wobei der zuerst entstandene MZ-L-Phenylalanyl-D-phenylalanin-äthylester (VIII) alkalisch verseift wurde. Der Umsatz des Dipeptid-Derivates IX mit dem Tripeptid-Derivat VII erfolgte mittels Dicyclohexyl-carbodiimid und lieferte das schön kristallisierte Pentapeptid-Derivat MZ-L-Phenylalanyl-D-phenylalanyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-O-acetyltyrosin- α -p-nitrobenzyl- β , γ -dimethylester (X).

Die Verwendung dieser Verbindung zu weiteren Umsetzungen wird z. Z. geprüft. Der glatte Verlauf der Synthese und die gute Kristallisationsfähigkeit aller Zwischenprodukte und des Endproduktes sprechen sehr zugunsten einer vermehrten Anwendung der MZ- und der p-Nitrobenzyl-Gruppen bei Peptidsynthesen.

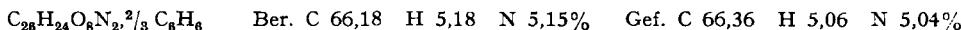
¹⁰⁾ Die Analysenwerte und der Smp. lassen auf das Vorhandensein einer Verunreinigung schliessen, welche bei den späteren Stufen eliminiert ist.

¹¹⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, J. Amer. chem. Soc. **77**, 1067 (1955).

Experimenteller Teil

Smp. wurden in offener Kapillare bestimmt, Analysenpräparate wurden bei 80° und 10⁻² bis 10⁻³ Torr während 3 bis 6 Std. getrocknet.

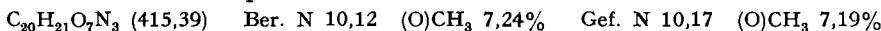
1. *N-Carbobenzoxy-O-acetyl-L-tyrosin-p-nitrobenzylester*. 27,5 g N-Cbo-O-acetyltyrosin⁷) wurden in 270 ml abs. Essigester gelöst, mit 12,8 ml Triäthylamin (1,2 Äq.) und 23,3 g p-Nitrobenzylbromid (1,4 Äq.) versetzt und 3 h unter Rückfluss gekocht. Das ausgefallene Salz wurde abgenutscht und mit abs. Essigester gut gewaschen. Die Essigesterlösung wurde mit 2-n. HCl und eiskalter, frisch hergestellter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Nach dem Neutralwaschen und Trocknen wurde der Essigester verdampft, der feste Rückstand mit 100 ml Äther verrieben, auf 0° gekühlt, die Kristalle abgenutscht und mit Äther und Äther:Petroläther (2:1) und (1:1) gewaschen. Ausbeute: 28,7 g (76%). Smp. 118/126–130°. Das Produkt kann aus Benzol-Petroläther in kleinen Nadeln oder Prismen erhalten werden, Smp. 126/133–135,5°. Nach vierständigem Trocknen bei 80° und 0,03 Torr stimmte die Analyse unter Annahme der Gegenwart von Kristallbenzol:



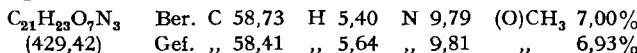
2. *O-Acetyl-L-tyrosin-p-nitrobenzylester-hydrobromid* (I): 28,5 g N-Cbo-O-acetyltyrosin-p-nitrobenzylester wurden in 130 ml warmem Nitromethan gelöst, auf Raumtemp. abgekühlt und mit 43,5 ml 4-n. HBr in Eisessig versetzt. Nach ca. 1/2 h begannen Kristalle auszufallen. Nach einständigem Stehen bei Raumtemp. wurde im Vak. bei 30–35° Badtemperatur zur Trockne verdampft, der feste Rückstand mit abs. Äther gut verrieben und die Fällung abgenutscht. Getrocknet wurde im Vak. bei Raumtemp. über KOH. Ausbeute: 23,1 g (91%). Smp. 152°, ab 156° (Zers.).

Das Produkt wurde in diesem Reinheitsgrad weiter verarbeitet. Beim Versuch, das Produkt durch Umkristallisation aus Äthanol zu reinigen, trat Zersetzung ein. Die auskristallisierte Substanz enthieilt kein Br mehr.

3. *MZ-L-Asparaginsäure-β-methylester* (V): 10 g L-Asparaginsäure-β-methylester-hydrochlorid, 18,2 g MZ-chlorid⁸), 50 ml Wasser und 150 ml Dioxan wurden unter Rühren und Eiskühlung mit 4,35 g MgO versetzt. Nach einständigem Rühren bei Zimmertemperatur wurde in 500 ml Wasser gegossen, angesäuert und mit Essigester extrahiert. Die Essigesterlösung wurde erschöpfend mit verdünntem Ammoniak (1 Teil konz. NH₃-Lösung + 25 Teile Wasser) ausgezogen. Die wässrige Phase wurde darauf wieder angesäuert und mit Essigester extrahiert. Der Essigester wurde nach dem Trocknen verdampft und der Rückstand aus Methanol-Wasser umkristallisiert. Ausbeute: 17 g (75%), Smp. 100–104°. Zur Analyse wurde nochmals aus Methanol-Wasser umkristallisiert: Smp. 104–106°.



4. *MZ-Glutaminsäure-γ-methylester* (II): 1 g L-Glutaminsäure-γ-methylester-hydrochlorid (1 Äq.), 1,7 g MZ-chlorid (1,1 Äq.) und 0,51 g MgO (2,5 Äq.) wurden 2 Std. bei 0° bis Zimmertemperatur in einem Gemische von 15 ml Aceton und 5 ml H₂O gerührt. Die Lösung wurde darauf mit 2-n. HCl angesäuert, mit Wasser versetzt und mit Essigester extrahiert. Die Essigesterlösung wurde mit Wasser und konz. NaCl-Lösung gewaschen. Nach dem Verdampfen hinterliess sie 2,19 g eines kristallisierenden Öles. Dieses wurde aus einem Gemische von 45 ml Methanol-Wasser (2:1) kristallisiert, Smp. 120–123°. Zur Analyse wurde aus Benzol umkristallisiert: Nadelbüschel, Smp. 123–125°.



5. *MZ-L-Glutamyl-L-O-acetyltyrosin-α-p-nitrobenzyl-β-methylester* (III): 22,5 g O-Acetyl-L-tyrosin-p-nitrobenzylester-hydrobromid, 22,0 g MZ-L-Glutaminsäure-γ-methylester, 220 ml abs. Tetrahydro-furan und 25 ml Triäthylamin wurden auf –15° gekühlt. Unter Rühren wurden innerhalb einer Std. 7 ml POCl₃ in 20 ml abs. Tetrahydro-furan gelöst, zugetropft; die Mischung wurde noch eine Std. bei –15° und eine Std. bei Zimmertemp. gerührt. Die Reaktionslösung wurde in 1 l eines Gemisches von CCl₄ und CHCl₃ (1:1) gelöst, zweimal mit 1-n. HCl-Methanol (1:1) und zweimal mit Wasser-Methanol (1:1) ausgeschüttelt. Die schwerere Schicht wurde mit Natriumsulfat getrocknet und darnach i. V. verdampft. Der Rückstand wurde mit 300 ml Methanol ausgekocht und das Unlösliche kalt abgetrennt. Dieses Produkt wurde in 200 ml Äthanol

heiss gelöst, die noch heisse Lösung mit 70 ml Wasser versetzt und langsam kristallisiert gelassen. Ausbeute: 22,8 g (58%). Smp. 145–150°. Das Produkt wurde aus Äthanol-Wasser umkristallisiert, Smp. unverändert¹⁰⁾.

$C_{39}H_{39}O_{12}N_5$ (769,78) Ber. N 9,10 O 24,94% Gef. N 8,25 O 24,19%

6. *L-Glutamyl-L-O-acetyltyrosin-α-p-nitrobenzyl-γ-methylester-hydrobromid* (IV): 19,8 g MZ-L-Glutamyl-L-O-acetyltyrosin-α-p-nitrobenzyl-γ-methylester (III) wurden in 39 ml Eisessig gelöst, mit 39 ml 4-n. HBr in Eisessig versetzt und 1 Std. auf 40° erwärmt. Der Eisessig wurde dann i.V. bei 40° Badtemp. verdampft. Der Rückstand wurde in CCl_4 - $CHCl_3$ (1:1) und Methanol-Wasser (1:1) gelöst. Die untere Phase wurde noch zweimal mit Methanol-Wasser (1:1) extrahiert. Die vereinigten leichteren Phasen wurden mehrmals mit frischer Unterphase gewaschen, durch Celite filtriert und i.V. zur Trockne verdampft. Rückstand 11,9 g (79%) eines farblosen, glasigen Schaumes.

7. *MZ-L-Aspartyl-L-glutamyl-L-O-acetyltyrosin-α-p-nitrobenzyl-β,γ-dimethylester* (VI): Aus 11,9 g IV wurde mittels NH_3 in $CHCl_3$ ¹²⁾ der freie Dipeptidester hergestellt. Dieser wurde zusammen mit 9,3 g MZ-L-Asparaginsäure-β-methylester (V) in 70 ml Essigester gelöst, auf –15° gekühlt, mit 5,3 g Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und 1 Std. bei –15° aufbewahrt. Darnach wurde die Lösung über Nacht bei –5° gehalten, mit 1 ml Eisessig versetzt und der Dicyclohexyl-harnstoff abgenutscht. Das Filtrat wurde i.V. eingeengt, mit CCl_4 - $CHCl_3$ (1:1) verdünnt und mit Methanol-1-n. HCl (1:2) und Methanol- H_2O (1:2) gründlich gewaschen, getrocknet und verdampft. Der Rückstand wurde durch Stehenlassen mit Essigsäureanhydrid und Pyridin nach-acetyliert und darauf wieder zur Trockne verdampft. Beim Verreiben mit Essigester blieben 3,88 g VI ungelöst, Smp. 160–162°. Aus der Essigesterlösung konnten nach Chromatographie an Al_2O_3 weitere 7,12 g VI erhalten werden. Umkristallisiert aus Äthanol-Wasser zur Analyse: Smp. 166–168°.

$C_{44}H_{46}O_{15}N_8$ (848,86) Ber. C 58,80 H 5,16 N 9,35% Gef. C 58,71 H 5,25 N 9,25%

8. *L-Aspartyl-L-glutamyl-L-O-acetyltyrosin-α-p-nitrobenzyl-β,γ-dimethylester-hydrobromid* (VII): 6,88 g VI wurden in 11,4 ml Eisessig gelöst, mit 11,4 ml 4-n. HBr in Eisessig versetzt und 1 Std. bei 40° aufbewahrt. Der Eisessig wurde i.V. verdampft und der Rückstand zwischen CCl_4 - $CHCl_3$ -Methanol- H_2O (1:1:1:2) verteilt. Die leichtere Phase wurde i.V. verdampft: 4,42 g (82%) glasiger Schaum.

9. *MZ-L-Phenylalanyl-D-phenylalanin-äthylester* (VIII): 20 g MZ-L-Phenylalanin³⁾, 10,6 g D-Phenylalanin-äthylester-hydrochlorid, 22,6 ml Triäthylamin und 240 ml abs. Tetrahydro-furan wurden unter Rühren auf –15° gekühlt und mit der Lösung von 6,4 ml $POCl_3$ in 40 ml abs. Tetrahydro-furan tropfenweise während 1 Std. versetzt. Anschliessend wurde die Mischung noch 2 Std. bei Zimmertemp. aufbewahrt. Das ausgeschiedene Produkt wurde abgenutscht, mit Essigester und Wasser gewaschen und i.V. bei 60° getrocknet: 19,5 g, Smp. 170–172°.

Das Filtrat wurde mit 2-n. HCl und mit verd. Ammoniak (konz. Ammoniak-Wasser 1:25) gewaschen, getrocknet und eingeengt. Dabei schieden sich wiederum 5,9 g VIII, Smp. 175–177° aus; Gesamtausbeute 25,4 g (90%). Zur Analyse wurde aus Essigester umkristallisiert, Smp. 179°.

$C_{35}H_{38}O_6N_4$ (608,67) Ber. O 15,77 N 9,20% Gef. O 15,69 N 9,27%

10. *MZ-L-Phenylalanyl-D-phenylalanin* (IX): 24 g VIII wurden in einem Gemisch von 1,1 l Dioxan, 240 ml Methanol und 200 ml Wasser warm gelöst und mit 198 ml 1-n. NaOH versetzt. Nach 1 Std. bei Zimmertemp. wurde i.V. bis zur Trübung eingeengt, mit Wasser versetzt und mit 2-n. HCl angesäuert. Die Fällung wurde abgenutscht, gewaschen und getrocknet: 20,2 g (88%), Smp. 189–190° (Zers.). Zur Analyse wurde aus Methanol-Wasser umkristallisiert, Smp. 189–190° (Zers.).

$C_{33}H_{32}O_6N_4$ (580,62) Ber. O 16,53 N 9,65% Gef. O 16,33 N 9,75%

11. *MZ-L-Phenylalanyl-D-phenylalanyl-L-aspartyl-L-glutamyl-L-O-acetyltyrosin-α-p-nitrobenzyl-β,γ-dimethylester* (X): Aus 4,4 g VII wurde mit NH_3 in $CHCl_3$ ¹²⁾ der freie Tripeptidester hergestellt. 4 g IX wurden in 100 ml siedendem, abs. Essigester gelöst, gekühlt und mit dem freien Ester aus VII versetzt. Die Lösung wurde bei –15° mit 1,6 g Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt, 1 Std. bei –15° und über Nacht bei –5° aufbewahrt. Nach Zugabe von 1 ml Eisessig wurde der Niederschlag, bestehend aus dem Pentapeptid-Derivat X und Dicyclohexylharnstoff, abgenutscht.

¹²⁾ G. HILLMANN, Z. Naturforschg. 1, 682 (1946).

Das Filtrat wurde i.V. verdampft und der Rückstand zwischen $\text{CCl}_4\text{-CHCl}_3\text{-Methanol-1-n.HCl}$ (1:1:1:2) verteilt. Die schwere Phase wurde mit Methanol-Wasser (1:2) gewaschen und i.V. zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde zusammen mit dem oben erwähnten, abgenutzten Material mit Essigsäureanhydrid-Pyridin nachacetyliert. Nach dem Verdampfen des Essigsäureanhydrids und des Pyridins i.V. wurde der Rückstand in siedendem Dioxan gelöst und vom ungelösten Dicyclohexylharnstoff abgetrennt (1,57 g; 90%); das Filtrat wurde durch eine Säule von 220 g Aluminiumoxyd (Akt. III) filtriert. Eluiert wurde mit Dioxan, das Lösungsmittel wurde i.V. verdampft. Der Rückstand wurde mit 50 ml heissem Äthanol verrieben und mit gleichviel heissem Wasser versetzt. Die kristalline Fällung wog 5,48 g (74%). Smp. 176–179°. Zur Analyse wurde aus Äthanol-Wasser umkristallisiert, Smp. 180–182°.

$\text{C}_{69}\text{H}_{84}\text{O}_{17}\text{N}_8$	Ber. C 62,40	H 5,40	O 22,79	N 9,39	$(\text{O})\text{CH}_3$ 3,78%
(1193,26)	Gef. „	62,23	„	5,62	„

Die Mikroanalysen wurden in unseren mikro-analytischen Laboratorien unter der Leitung von Dr. H. GYSEL ausgeführt.

SUMMARY

Using p-(p'-methoxy-phenylazo)-benzyloxycarbonyl-(MZ-) and p-nitrobenzyl-(NB-) as blocking groups for the α -amino- and α -carboxylic functions respectively, a completely protected pentapeptide unit, occurring in tyrocidine A, has been prepared: MZ-L-Phe-D-Phe-L-Asp(OCH_3)-L-Glu(OCH_3)-L-Tyr(OAc)-ONB. The p-nitrobenzyl-ester group is very resistant towards HBr in acetic acid, the reagent used for intermediary splitting of the MZ-groups. Peptide bonds were formed by means of either POCl_3 + triethylamine or by dicyclohexyl-carbodiimide. All the products containing MZ-groups were obtained in the crystalline state.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung, und
Chemisches Institut der Universität Zürich

105. Die Glykoside der Samen von *Nerium oleander* L.¹⁾

Glykoside und Aglycone, 200. Mitteilung²⁾

von **Herbert Jäger, O. Schindler und T. Reichstein**

Herrn Prof. Dr. P. KARRER zum 70. Geburtstag gewidmet

(14. III. 59)

Nerium oleander L. ist eine besonders im Mittelmeergebiet weit verbreitete Apocynacee³⁾, von der vor allem die Blätter schon lange medizinische Verwendung^{4) 5)} finden. Ihre Wirkung verdanken sie zur Hauptsache ihrem Gehalt an digitaloiden Glykosiden. Bisher wurden aus den Blättern die folgenden vier krist. Glykoside

¹⁾ Diss. HERBERT JÄGER, Basel 1958.

²⁾ 199. Mitteilung: R. P. MARTIN & CH. TAMM, Helv. **42**, 696 (1959).

³⁾ Vgl. z. B. die Monographie von R. CORTESI, Bull. Soc. botan. Genève **32** (1939–1940), und weitere Literatur daselbst.

⁴⁾ F. FLURY & W. NEUMANN, Klin. Wschr. **14**, 562 (1935).

⁵⁾ Vgl. auch die Zusammenstellung von R. CORTESI, Pharmac. Acta Helv. **18**, 215 (1943).