

76. Synthesen in der Polymyxin-Reihe

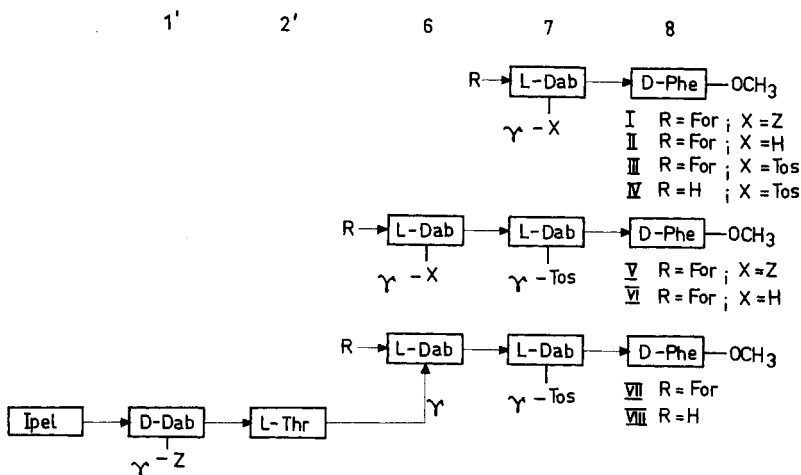
3. Mitteilung¹⁾

Synthese eines verzweigten, geschützten Dekapeptids

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

(16. I. 60)

Die vorliegende Mitteilung hat die Synthese des verzweigten, geschützten Dekapeptids XIII zum Gegenstand, das durch Cyclisierung und Abspaltung der Schutzgruppen in eine der möglichen Strukturen, die für Polymyxin B₁ in Frage kommen²⁾ übergeführt werden soll. Dieses Dekapeptid wird aus den zwei Pentapeptiden 1 bis 5 und Ipel-1'-2'-6-7-8 (vgl. XIII) zusammengesetzt, von denen das erstere Gegenstand der 1. Mitteilung³⁾ war.



Reaktionsschema 1

Das zweite Pentapeptid (VII) kann im Prinzip auf zwei Wegen erhalten werden. Einmal wurde sein Aufbau vom Carboxylende her unter ausschliesslicher Verwendung der Carboximid-Kupplungsmethode⁴⁾ (Reaktionsschema 1), das andere Mal (Reaktionsschema 2) auch unter Zuzug der CURTIUS'schen Azid-Methode vom Aminoende her versucht. Beide Wege führten zum Ziel, wobei das Reaktionsschema 2 über weniger Zwischenprodukte das direktere Verfahren darstellt.

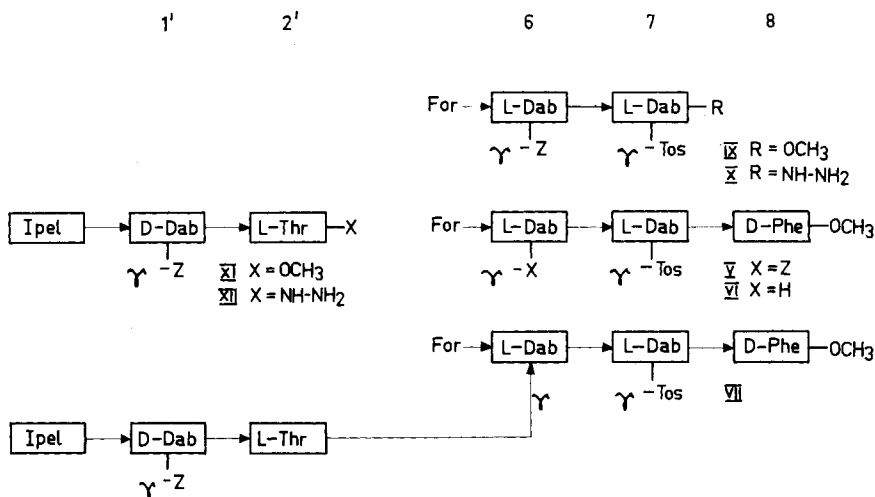
¹⁾ 2. Mitteilung: K. VOGLER & L. H. CHOPARD-DIT-JEAN, *Helv.* **43**, 279 (1960). Über die Abkürzungen vgl. 1. Mitteilung³⁾, Fussnote⁹⁾ (Dab = α, γ -Diaminobuttersäure, Ipel = Isopelargon-säure, (+)-6-Methyloctansäure).

²⁾ W. HAUSMANN, *J. Amer. chem. Soc.* **78**, 3663 (1956); G. BIZERTE & M. DAUTREVAUX, *Bull. Soc. chim. biol.* **39**, 795 (1957).

³⁾ K. VOGLER & P. LANZ, *Helv.* **43**, 270 (1960), 1. Mitt.

⁴⁾ J. C. SHEEHAN & G. P. HESS, *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 1067 (1955).

Nach dem ersten Verfahren wird D-Phenylalanin-methylester, hergestellt aus dem Hydrochlorid⁵⁾ nach HILLMANN⁶⁾, mit N^α-Formyl-N^γ-Z-L- α,γ -Diaminobuttersäure⁷⁾ in Chloroformlösung mit einer Ausbeute von 74% in das Dipeptid I übergeführt. Daraus wird mit HBr/Eisessig nach BOISSONNAS & PREITNER⁸⁾ der Benzoyloxycarbonyl-Rest in Gegenwart des Formylrestes in ca. 90-proz. Ausbeute entfernt (II), worauf die freie γ -NH₂-Gruppe in Chloroformlösung mit Triäthylamin in 70-proz. Ausbeute zu III tosyliert wird. Dieser Umweg ist nötig, weil N^γ-tosylierte α,γ -Diaminobuttersäure-Derivate mit freier Carboxylgruppe mit Dicyclohexyl-carbodiimid, im Gegensatz zur Azid-Methode (siehe unten) in Gegenwart von Aminosäureestern,



Reaktionsschema 2

vorwiegend unter intramolekularem Ringschluss tosylierte Pyrrolidone ergeben⁹⁾. Deformylierung mit HCl/Methanol¹⁰⁾ führt zum rohen Dipeptidester IV, der mit einer zweiten Molekel N^α-Formyl-N^γ-Z-L- α,γ -diaminobuttersäure in 60-proz. Ausbeute zum Tripeptidester V kondensiert wird. Die freie Aminogruppe, die zur Einführung der N^γ-ständigen Seitenkette nötig ist, wird durch Abspaltung des Benzoyloxycarbonyl-Restes in V mit HBr/Eisessig erhalten (VI).

Synthesen verzweigter Polypeptide mit α,ω -Diaminocarbonsäuren sind bisher nicht beschrieben worden. Hingegen gibt es Angaben über die Herstellung von ϵ -Peptiden beim Lysin, die teils über gemischte Anhydride¹¹⁾¹²⁾, über Säurechloride¹³⁾ und im speziellen Fall über das Anhydrid der Asparaginsäure bereitet wurden¹²⁾.

⁵⁾ B. F. ERLANGER, H. SACHS & E. BRAND, J. Amer. chem. Soc. 76, 1806 (1954).

⁶⁾ A. HILLMANN, Z. Naturforsch. 1b, 682 (1946).

⁷⁾ Vgl. 2. Mitteilung, in welcher der D-Antipode beschrieben ist.

⁸⁾ R. A. BOISSONNAS & G. PREITNER, Helv. 36, 875 (1953).

⁹⁾ K. PODUŠKA & J. RUDINGER, Chem. Listy 51, 616 (1957); Chem. Abstr. 50, 15419.

¹⁰⁾ S. G. WALEY, Chemistry & Ind. 72, 107 (1953).

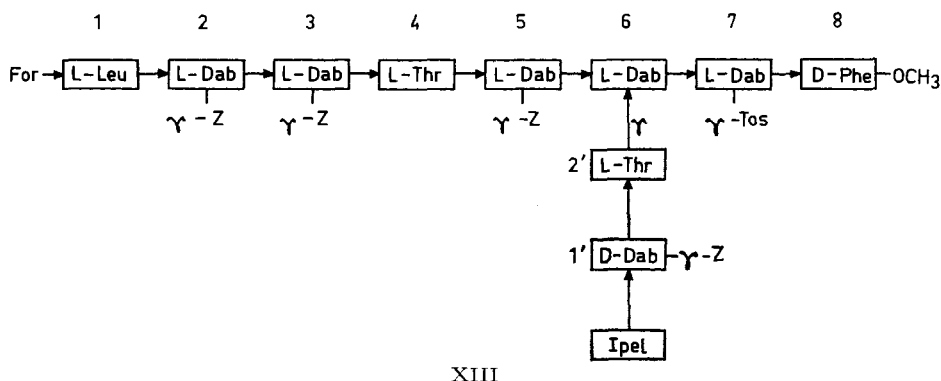
¹¹⁾ D. THEODOROPoulos, J. Org. Chemistry 23, 140 (1958).

¹²⁾ D. L. SWALLOW, I. M. LOCKHARDT & E. P. ABRAHAM, Biochem. J. 70, 359, 364 (1958).

¹³⁾ DONALD E. WOLF, JOHN VALIANT, ROBERT L. PECK & K. FOLKERS, J. Amer. chem. Soc. 74, 2002 (1952).

In unserem Falle führte die Kondensation von VI mit N^{α} -(+)-Isopelargonyl- N^{γ} -Z-D- α,γ -diaminobutyryl-L-threonin¹⁾ nach dem Carbodiimid-Verfahren trotz Variieren der Bedingungen in einer Ausbeute von höchstens 30% zum gewünschten geschützten Pentapeptid VII. Auch die Methode des gemischten Anhydrids mit Kohlensäure ergab keine bessere Ausbeute. Einzig die Azid-Methode (siehe unten) brachte einen Erfolg. Deformylierung mit HCl/Methanol in verschiedenen Lösungsvermittlern, wie Dimethylsulfoxyd, Dimethylformamid und wasserfreier Trifluoressigsäure, führte zum rohen Pentapeptidester VIII, dessen freie Aminogruppe durch quantitative Ninhydrin-Analyse gegen L-Leucin als Bezugssubstanz charakterisiert wurde.

Das zweite, direktere Verfahren zur Gewinnung des substituierten Pentapeptids VII ist im Reaktionsschema 2 skizziert.



Der zur Herstellung des Zwischenproduktes IX benötigte N^{γ} -Tos-L- α,γ -diaminobuttersäure-methylester wurde durch Veresterung der N^{γ} -tosylierten Aminosäure¹⁴⁾ über das kristallisierte Sulfat gewonnen. Das Dipeptid IX ist nach der Carbodiimid-Methode in ca. 60-proz. Ausbeute zugänglich. Die Überführung ins Hydrazid X gelingt leicht und in guter Ausbeute, während die Kondensation zu V in Gegenwart von Essigsäure nach PODUŠKA & RUDINGER¹⁴⁾ in einer Ausbeute von 60% zum Ziel führt. Die Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe zu VI ist bereits im Reaktionsschema 1 enthalten. Der Seitenketten-Peptidester XI¹⁾ kann bei Raumtemperatur in einer Ausbeute von 80% ins Hydrazid XII übergeführt werden. Die Kondensation von XII mit VI über das Azid verläuft gegenüber der Carbodiimid-Methode mit einer Ausbeute von 54% wesentlich besser.

Schliesslich wird das durch Deformylierung von VII erhaltene rohe Pentapeptid VIII (Reaktionsschema 1) mit dem in unserer 1. Mitteilung³⁾ beschriebenen 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 -diaminobuttersäure³⁾ (1-5 in XIII) mittels Dicyclohexyl-carbodiimid⁴⁾ in 40-proz. Ausbeute kondensiert. Das Dekapeptid wird in Form eines farblosen Pulvers, welches sich bei 245-249° zersetzt, durch Umfällen aus Dimethylformamid/Methanol gewonnen. In den meisten organischen Lösungsmitteln ist es unlöslich, mit Ausnahme von Dimethylformamid, Dimethylsulfoxyd, Eisessig und wasserfreier Trifluoressigsäure. XIII wurde besonders sorgfältig analysiert, und zwar ausser durch Mikro-

¹⁴⁾ K. PODUŠKA & J. RUDINGER, Coll. czech. chem. Commun., 24, 3449 (1959).

analyse, bei welcher vor allem der S-Gehalt von Bedeutung ist, noch durch UV.-Messung.

Letztere Messung ist bei Z-Peptiden wie bei Tos-Peptiden von grossem Nutzen, da in Eisessig auch schwerlösliche Derivate untersucht werden können. Das ϵ bei 256 m μ ist in Eisessig in beiden Fällen, wie erwartet, nicht von demjenigen verschieden, das für eine Feinspritzlösung erhalten wird. So fanden wir bei der angegebenen Wellenlänge für einen Z-Rest ein $\epsilon = 207$ in Übereinstimmung mit dem von LEUBE *et al.*¹⁵⁾ erhaltenen Wert, während für einen Tosyl-Rest 441 (gemessen an N $^{\gamma}$ -Tos-L- α,γ -diaminobuttersäure-methylester-sulfat) und für Phenylalanin 187 (gemessen am L-Phenylalanin-methylester-hydrochlorid) gemessen wurde. Unser Dekapeptid XIII wies bei 256 m μ ein ϵ von 1507 auf, während der berechnete Wert aus 4 Z-, einem Tos- und einem Phenylalanin-Rest für ein Molgewicht von 1954,2 1457 beträgt (Abweichung 3%).

Ausschlaggebend ist die quantitative Aminosäureanalyse nach STEIN & MOORE¹⁶⁾, deren Ergebnisse wir in der folgenden Tabelle festhalten möchten:

Aminosäure	Ber.	Gef. auf ein Mol.-Gew. von 1954	rel. Fehler
Thr	2,0	1,87	$\pm 1,5\%$
Leu	1,0	0,98	$\pm 2,2\%$
Phe	1,0	0,94	$\pm 2,2\%$
Dab	6,0	6,04	$\pm 4,0\%$

Experimenteller Teil¹⁷⁾

Reaktions-Schema 1

1. N $^{\alpha}$ -Formyl-N $^{\gamma}$ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (I). 43 g (0,2 Mol) D-Phenylalanin-methylester-hydrochlorid⁶⁾ werden in 700 ml trockenem Chloroform suspendiert und unter Schütteln mit 30 ml (0,21 Mol) Triäthylamin versetzt. In dieser Lösung werden unter Erwärmen 56 g (0,2 Mol) N $^{\alpha}$ -For-N $^{\gamma}$ -Z-L- α,γ -diaminobuttersäure⁷⁾ gelöst. Bei -5° werden 43 g (0,21 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid zugegeben und die Reaktionsmischung 24 Std. im Eisschrank stehengelassen. Nach Zugabe von 10 ml Eisessig wird 1 Std. bei 20° stehengelassen, vom Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und mit Chloroform gewaschen. Das Filtrat wird je zweimal mit eiskalter 0,5 N Salzsäure, mit Wasser, 1 N Ammoniak und Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und anschliessend im Vakuum bei 50° bis zur beginnenden Kristallisation eingeeengt. Der Kristallbrei wird mit 150 ml Essigester aufgeköcht, gut verrieben und nach dem Abkühlen mit 200 ml Äther vermischt. Nach 4 Std. wird abgenutscht, die Kristalle mit Essigester-Äther (1:1) und mit Äther gewaschen und im Vakuum bei 60° getrocknet. Ausbeute 50 g (74%), Smp. 145–147 $^{\circ}$. Zur Analyse wurde zweimal aus Alkohol umkristallisiert. Smp. 149–150 $^{\circ}$; $[\alpha]_D^{20} = +5,8^{\circ}$.

C₂₃H₂₇N₃O₆ (441,47) Ber. C 62,57 H 6,16% Gef. C 62,45 H 6,10%

¹⁵⁾ J. LEUBE, H. RESTLE & M. WIEDEMANN, Z. Naturforsch. 9b, 186 (1954).

¹⁶⁾ ST. MOORE & W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 192, 663 (1951); 271, 893 (1954). – Die Bestimmungen verdanken wir Herrn Prof. Dr. MAX BRENNER & Dr. R. WEBER von der Organisch-chemischen Anstalt der Universität Basel.

¹⁷⁾ Die Smp. wurden auf dem Apparat nach TORTOLI der Firma W. BÜCHER, Flawil/Schweiz, bestimmt und sind nicht korrigiert. Die Drehungen wurden, wenn nichts anderes angegeben, in Dimethylformamid bei $c = 2$ bestimmt. Fehlergrenze $\pm 2^{\circ}$. Die Analysenmuster wurden 16 Std. über P₂O₅ bei 0,01 Torr und wenn nicht besonders angegeben bei 110° getrocknet.

2. *N α -Formyl-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester-hydrobromid (II)*. 44 g (0,1 Mol) Dipeptidester I werden mit 70 ml Bromwasserstoff/Eisessig (35-proz.) übergossen und unter CaCl_2 -Verschluss zunächst 10 Min. im Eisbad und dann $1\frac{1}{2}$ Std. bei 20° geschüttelt. Die Lösung wird 30 Min. im Wasserstrahlvakuum entgast, mit 40 ml Aceton verdünnt und mit 300 ml abs. Äther ausgefällt. Nach 10 Min. wird die überstehende Ätherlösung durch Absyphonieren abgetrennt, der Rückstand mit 150 ml frischem abs. Äther durchgeschüttelt und der Äther erneut absyphoniert. Dieser Auswaschprozess wird noch fünfmal wiederholt. Die restliche Äthermenge wird im Vakuum entfernt und der Rückstand im Vakuum bei 40° getrocknet. Ausbeute 35 g (90%). In dieser Form wird das Hydrobromid für die nachfolgende Tosylierung eingesetzt.

3. *N α -Formyl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (III)*. 39 g (0,1 Mol) des Hydrobromids II werden in 400 ml trockenem Chloroform suspendiert und mit 19,1 g (0,1 Mol) p-Toluolsulfochlorid versetzt. Dazu tropft man unter starkem Rühren und Wasserkühlung bei 20–30° innerhalb 1 Std. eine Lösung von 35 ml (0,25 Mol) Triäthylamin in 100 ml Chloroform. Anschliessend rührt man während 18 Std. weiter. Die leicht alkalische Lösung wird nun je zweimal mit Wasser, 0,5 N eiskalter Salzsäure, Wasser, 1 N Ammoniak und Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Chloroform wird im Vakuum bei 40° abdestilliert, der Rückstand in 30 ml heissem Methanol gelöst und mit 150 ml Äther versetzt. Nach 4-stdg. Stehen im Eisschrank wird abgenutscht, mit Äther gründlich gewaschen und im Vakuum bei 60° getrocknet. Ausbeute 32,2 g (70%), Smp. 145–147°.

Zur Analyse wurde zweimal aus Alkohol umkristallisiert. Smp. 147–148; $[\alpha]_D^{25} = +4,64^\circ$; ϵ bei 257 m μ = 612, ber. 628 (Feinsprit, 40,6 mg%).

$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{O}_6\text{N}_3\text{S}$ (461,52) Ber. C 57,25 H 5,91 S 6,95% Gef. C 57,49 H 5,98 S 6,99%

4. *N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (IV)*. 30 g (0,065 Mol) des Dipeptidesters III werden mit 240 ml 1 N methanolischer Salzsäure übergossen, unter CaCl_2 -Verschluss bis zur vollständigen Lösung geschüttelt und 24 Std. bei 20° stehengelassen. Das Methanol wird im Vakuum bei 40° abdestilliert, der Rückstand wird noch zweimal mit frischem Methanol im Vakuum bei 40° abgedampft und der so anfallende zähflüssige Sirup im Vakuum bei 40° getrocknet. Das Harz wird in 80 ml Eiswasser unter Schütteln gelöst, filtriert, mit 200 ml Essigester überschichtet, nach Zugabe von Eis mit konz. Ammoniak alkalisch gestellt und extrahiert. Die Essigesterlösungen werden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum bei 45° eingedampft und im Wasserstrahl- und Hochvakuum bei 45° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Man erhält 27 g (96%) eines zähflüssigen Harzes, welches ohne weitere Reinigung für die Synthese von V eingesetzt wird.

5. *N α -Formyl-N γ -Z-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (V)*. 28 g (0,1 Mol) N α -For-N γ -Z-L- α , γ -diaminobuttersäure und 43,3 g (0,1 Mol) Dipeptidester IV werden in 350 ml Dimethylformamid unter Erwärmen gelöst, auf –10° abgekühlt, mit 21,6 g (0,105 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid versetzt und 24 Std. im Eisschrank aufbewahrt. Nach Zugabe von 5 ml Eisessig lässt man 1 Std. bei 20° stehen und nutscht vom Dicyclohexylharnstoff ab; dieser wird noch mit Dimethylformamid nachgewaschen, worauf das Filtrat in 2,5 l Eiswasser ausgerührt wird. Nach dem Erstarren der Fällung wird diese abgenutscht, mit viel Wasser und zweimal mit Äther gewaschen und bei 50° im Vakuum getrocknet. Anschliessend wird mit Dimethylformamid in der Wärme wieder gelöst, im Eisbad abgekühlt und von einer weiteren Menge Dicyclohexylharnstoff abgenutscht. Nun wird das Filtrat in 2 l 0,1 N Ammoniak ausgerührt. Der Niederschlag wird abgenutscht, mit viel Wasser und mit Äther gewaschen und im Vakuum bei 70° getrocknet. Nach 2 Std. wird abgenutscht, mit Äther und Petroläther gewaschen und im Vakuum bei 70° getrocknet. Ausbeute 42 g (60%), Smp. 190–193°. Zur Analyse wurde aus Methanol und aus Dioxan umkristallisiert. Smp. 194–196°; $[\alpha]_D^{20} = -9,2^\circ$; ϵ bei 257 m μ = 818, ber. 835 (Feinsprit, 51 mg%).

$\text{C}_{34}\text{H}_{41}\text{O}_9\text{N}_5\text{S}$ (695,77) Ber. C 58,69 H 5,94 S 4,61% Gef. C 59,16 H 6,23 S 4,61%

6. *N α -Formyl-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (VI)*. 20,9 g (0,03 Mol) Tripeptidester V werden pulverisiert, mit 75 ml 35-proz. Bromwasserstoff/Eisessig übergossen, unter CaCl_2 -Verschluss 10 Min. bei 0° und dann $2\frac{1}{2}$ Std. bei 20° geschüttelt. Die Lösung wird 30 Min. im Wasserstrahlvakuum entgast, mit 30 ml Aceton verdünnt und durch Zusatz von 200 ml abs. Äther ausgefällt. Nach 10 Min. wird der überstehende Äther absyphoniert, die Fällung mit 100 ml frischem abs. Äther durchgeschüttelt und erneut ab-

syphoniert. Dieser Auswaschprozess wird noch fünfmal wiederholt, zum Schluss wird der Äther im Vakuum bei 40° entfernt und das pulverige Hydrobromid kurz im Vakuum bei 45° getrocknet. Darauf wird es in Eiswasser gelöst, filtriert und mit 300 ml Essigester überschichtet. Unter Eiszusatz wird durch Zugabe von konz. Ammoniak das pH der wässrigen Lösung auf 10–11 gestellt und mit Essigester extrahiert. Die Essigesterlösungen werden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum bei 45° eingedampft und der Rückstand bei 45° im Wasserstrahl- und Hochvakuum getrocknet. Ausbeute 15,7 g (93%) Rohprodukt, welches sofort für das Pentapeptid VII eingesetzt wird.

7. *N α -Formyl-N γ -[N α -(+)-isopelargonyl-N γ -Z-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (VII). – a) SHEEHAN-Methode: 16,8 g (0,03 Mol) Tripeptid-esterbase VI und 14,7 g (0,03 Mol) N α -(+)-Isopelargonyl-N γ -Z-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin¹) werden in 70 ml Dimethylformamid unter Erwärmen gelöst, auf –10° abgekühlt und mit 6,5 g (0,031 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt. Die Lösung wird 24 Std. im Eisschrank stehengelassen, mit 2 ml Eisessig versetzt, 1 Std. bei 20° belassen, vom Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und dieser mit Dimethylformamid nachgewaschen. Das Filtrat wird in 1 l 0,01 N eiskalter Essigsäure unter langsamem Zutropfen ausgerührt, der stark gequollene Niederschlag nach 30 Min. abgenutscht und mit viel Wasser gewaschen. Der noch feuchte Nutschenrückstand wird anschliessend in Dimethylformamid unter Erwärmen gelöst, auf 0° abgekühlt und von einer weiteren Menge Dicyclohexylharnstoff abgenutscht. Nun wird das Filtrat in 1 l eiskaltem 0,1 N Ammoniak unter langsamem Zutropfen ausgerührt. Nach 2-stdg. Stehen im Eisschrank wird abgenutscht, mit viel Wasser und dann noch mehrmals mit Äther gewaschen und die Substanz im Vakuum bei 70° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nun wird aus Dimethylformamid-Äther und aus Dimethylformamid-Aceton umgefällt. Ausbeute 9,3 g (30%), Smp. 213–215° (Zers.), 210° sintern. Dieser Smp. ist deutlich tiefer als derjenige des Produktes, das über die gemischte Anhydrid-Methode (b) bzw. über das Azid (14) erhalten wurde. Das vorliegende Produkt scheint noch etwas Dicyclohexylharnstoff als Verunreinigung zu enthalten, das den Smp. entsprechend drückt. – Zur Analyse wurde zweimal aus Dimethylformamid-Aceton umgefällt. Smp. 215–217° (Zers.), 212° sintern; $[\alpha]_D^{25} = -2,6^\circ$; ϵ bei 256 m μ = 810, ber. 835 (Eisessig, 51 mg %).*

C ₅₁ H ₇₂ O ₁₃ N ₈ S	Ber. C 59,05	H 7,00	N 10,80	S 3,09%
(1037,21)	Gef. „ 58,81	„ 7,02	„ 10,77	„ 3,16%

b) *Über das gemischte Anhydrid*: 14,7 g (0,03 Mol) N α -(+)-Isopelargonyl-N γ -Z-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonin¹) werden in 300 ml Dioxan-Tetrahydrofuran (1:1) unter Zusatz von 4,6 ml (0,03 Mol) Triäthylamin unter Rühren gelöst. Bei –10° tropft man unter Rühren 3,15 ml (0,03 Mol) Chlorameisensäure-äthylester zu und lässt 15 Min. bei –10° weiterreagieren. Das Triäthylamin-hydrochlorid wird nun mittels vorgekühlter Nutsche und Saugflasche abgenutscht und zum Filtrat eine auf 0° gekühlte Lösung von 16,8 g (0,03 Mol) Rohprodukt der Tripeptid-esterbase VI in 300 ml Dioxan-Tetrahydrofuran (1:1) zugegeben, wobei unter Kohlendioxyd-Entwicklung die Temperatur vorübergehend auf 0° ansteigt. Es wird nun 1 Std. bei –5° und 16 Std. bei 20° weitergerührt. Der stark gequollene Niederschlag wird abgenutscht, mit Aceton, Äther und Petroläther gewaschen und im Vakuum bei 60° getrocknet. Die Substanz wird aus Dimethylformamid-Aceton umgefällt. Ausbeute 9,3 g (30%); Smp. 225–227° (Zers.), 223° sintern; $[\alpha]_D^{25} = -3,9^\circ$.

8. *N γ [N α -(+)-Isopelargonyl-N γ -Z-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (VIII). – a) Mit HCl/Methanol 2 N in Dimethylsulfoxyd: 5,2 g (0,05 Mol) For-pentapeptidester VII werden in 25 ml Dimethylsulfoxyd unter Erwärmen gelöst, bei Zimmertemperatur mit 25 ml Chlorwasserstoff/Methanol 2 N versetzt und nach 10 Min. noch dreimal je 25 ml Chlorwasserstoff/Methanol zugegeben. Unter CaCl₂-Verschluss lässt man die Lösung 28 Std. bei 20° stehen. Nun wird filtriert und das Methanol im Vakuum bei 35° so weit als möglich abdestilliert. Die Lösung wird mit 50 ml Methanol verdünnt, auf 0° abgekühlt und mit Triäthylamin auf pH 9 gestellt, worauf in 300 ml Eiswasser ausgerührt und der Niederschlag nach 30 Min. abgenutscht wird. Nach Verreiben in Eiswasser wird erneut abgenutscht, mit viel Wasser gewaschen und im Wasserstrahl- und Hochvakuum bei 50° getrocknet. Zum Schluss wird aus Dimethylformamid/Äther umgefällt, abgenutscht, mit viel Äther und Petroläther gewaschen und im Vakuum bei 60° getrocknet. Ausbeute 4,1 g (82%),*

Smp. 193–196° (Zers.). Dieses Rohprodukt wird ohne weitere Reinigung für die Synthese des Dekapeptids eingesetzt.

b) *Mit HCl/Methanol 4 N in Dimethylformamid*: 5,2 g (0,05 Mol) For-pentapeptidester VII werden in 15 ml Dimethylformamid unter Erwärmen gelöst, abgekühlt, innerhalb 1 Std. portionenweise mit 110 ml Chlorwasserstoff/Methanol 4 N versetzt und unter CaCl_2 -Verschluss 48 Std. bei 20° belassen. Die Lösung wird filtriert und im Vakuum bei 35° auf das halbe Volumen eingedampft. Das Konzentrat wird bei 0° mit Triäthylamin auf pH 9 gestellt und in 500 ml Eiswasser ausgerührt. Nun wird abgenutscht, mit Eiswasser gewaschen und im Vakuum bei 60° getrocknet. Das Reaktionsprodukt wird in 15 ml Dimethylformamid unter Erwärmen gelöst und aus 300 ml Eiswasser umgefällt. Der Niederschlag wird nach 20 Min. abgenutscht, mit viel Wasser, Äther und Petroläther gewaschen und im Vakuum bei 60° getrocknet. Ausbeute 3,9 g (78%), Smp. 200–203° (Zers.).

Um die Deformylierung abzuschätzen, wurde versucht, die Ninhydrin-Reaktion, die zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren mit Erfolg herangezogen wurde¹⁶), zu verwenden. Zu diesem Zweck werden je 2–5 μMol der Substanz und des Vergleichspräparates (Leucin oder ein reines Peptid mit einer α -Aminogruppe) in Reagensgläsern mit 10,0 ml Ninhydrin-Reagens versetzt und 60 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Dann wird 10 Min. in fließendem Wasser abgekühlt, in 100 ml Messkölbchen überführt und mit Feinsprit aufgefüllt. Nach 15–60 Min. wird in einem Spektralphotometer (z. B. BECKMAN B) bei 540 $m\mu$ mit dem Standard verglichen. (Ninhydrin-Reagens: 500 mg Ninhydrin gelöst in 17,5 ml Methylcellosolve und 7,5 ml Acetatpuffer mit pH 5,4. Acetatpuffer: 108,8 g Natriumacetat krist. in 80 ml Wasser + 20 ml Eisessig aufgefüllt mit Wasser dest. auf 300 ml.) Auf diese Weise wurden 98% einer freien Aminogruppe für VIII bestimmt. Die Methode scheint um so quantitativer zu sein, je ähnlicher die Testsubstanz gegenüber dem zu bestimmenden Material ist.

c) *Mit HCl/Methanol 4 N und Trifluoressigsäure*: 5,2 g (0,05 Mol) For-pentapeptidester VII werden mit 30 ml wasserfreier Trifluoressigsäure übergossen und bis zur vollständigen Lösung unter Verschluss geschüttelt. Bei 0° werden 30 ml Chlorwasserstoff/Methanol 4 N zugesetzt und die Lösung unter Verschluss 20 Std. bei 20° geschüttelt. Hierbei bilden sich offenbar durch Veresterung der Trifluoressigsäure 2 Phasen. Die Mischung wird im Vakuum bei 25° eingedampft und der Rückstand dreimal mit frischem Methanol unter vermindertem Druck bei 25° abgedampft. Der Rückstand wird mit 20 ml Dimethylformamid gelöst, filtriert, bei 0° mit Triäthylamin auf pH 9 gestellt und die Mischung in 500 ml Eiswasser ausgerührt. Der Niederschlag wird abgenutscht, mit Eiswasser gewaschen und im Vakuum bei 60° getrocknet. Nun wird nochmals in 15 ml Dimethylformamid unter Erwärmen gelöst und in 300 ml Eiswasser ausgerührt. Nach 20 Min. wird abgenutscht, mit viel Wasser, Äther und Petroläther gewaschen und im Vakuum bei 60° getrocknet. Ausbeute 3,7 g (74%), Smp. 200–203°, Ninhydrinwert 102%.

Reaktions-Schema 2

9. *N^γ-Tos-L- α , γ -diaminobuttersäure-methylester-sulfat*. 54,4 g (0,2 Mol) *N^γ-Tos-L- α , γ -diaminobuttersäure*¹⁴) werden in einer bei –10° hergestellten Mischung von 160 ml (4 Mol) Methanol und 14,6 ml (0,22 Mol) Thionylchlorid gelöst und 3 Std. am Rückflusskühler unter CaCl_2 -Verschluss auf 50° erwärmt. Die Lösung wird bei 45° im Vakuum eingedampft und der zähflüssige Rückstand noch zweimal mit frischem Methanol abgedampft. Das zurückbleibende Harz wird in 600 ml Chloroform und 200 ml Wasser aufgenommen, nach Eiszusatz mit konz. Ammoniak alkalisch gestellt, mit Chloroform extrahiert, mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Chloroform wird im Vakuum bei 45° abdestilliert und das zähflüssige Öl im Vakuum bei 45° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Der Ester wird in 500 ml Aceton gelöst, auf 0° abgekühlt und unter Rühren tropfenweise mit konz. Schwefelsäure bis zu einem pH von 4 versetzt. Die kristalline Fällung wird nach 3 Std. abgenutscht, mit Aceton und Äther gewaschen und im Vakuum bei 60° getrocknet. Ausbeute 42 g (62%), Smp. 189–191° (Zers.). Zur Analyse wurde dreimal aus Wasser-Methanol umkristallisiert, 16 Std. bei 70° und 0,01 Torr über P_2O_5 getrocknet. Die Substanz enthält wechselnde Mengen Kristallwasser, die bestimmt wurden (2,65%). Die Analyse bezieht sich auf die wasserfreie Substanz. Smp. 191–193° (Zers.); $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +21,6^\circ$ ($c = 1$, in Wasser); ϵ bei 256 $m\mu = 882$ (Feinsprit, 20,6 $\text{mg}\%$).

$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_{12}\text{N}_4\text{S}_3$ (670,76) Ber. C 42,99 H 5,71 S 14,33% Gef. C 43,12 H 5,95 S 14,42%

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

10. *N α -Formyl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α,γ -diaminobuttersäure-methylester (IX).* 56 g (0,2 Mol) *N α -Formyl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobuttersäure⁷* und 57,2 g (0,2 Mol) *N γ -Tos-L- α,γ -diaminobuttersäure-methylester* werden unter Erwärmen in 300 ml Dioxan/Tetrahydrofuran (1:1) gelöst, auf -10° abgekühlt, mit 43,2 g (0,21 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und 20 Std. im Eisschrank aufbewahrt. Die Mischung wird mit 10 ml Eisessig versetzt, 1 Std. bei 20° belassen, vom Dicyclohexylharnstoff abgenutscht und mit Tetrahydrofuran nachgewaschen. Das Filtrat wird im Vakuum bei 50° bis zu einem Sirup eingedampft, dieser mit 100 ml Essigester aufgekocht, abgekühlt und mit dem dreifachen Volumen Äther vermischt. Das kristalline Di-peptid wird nach 3 Std. abgenutscht, mit Äther gewaschen und im Vakuum bei 60° getrocknet. Ausbeute 68 g (62%), Smp. $152-154^\circ$. Zur Analyse wurde zweimal aus Methanol umkristallisiert. Smp. $156-157^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = -21,8^\circ$.

$C_{25}H_{32}O_8N_4S$ (548,60) Ber. C 54,73 H 5,88 N 10,21% Gef. C 54,93 H 6,06 N 10,30%

11. *N α -Formyl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α,γ -diaminobuttersäurehydrazid (X).* 55 g (0,1 Mol) Di-peptidester (IX) werden in 165 ml Alkohol erwärmt, mit 55 ml (0,9 Mol) 80-proz. Hydrazinhydrat versetzt, erhitzt bis alles gelöst, filtriert und 20 Std. bei 20° belassen. Das Hydrazid wird abgenutscht, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum bei 80° getrocknet. Ausbeute 46 g (82%), Smp. $194-196^\circ$. Zur Analyse wurde zweimal aus Methanol umkristallisiert. Smp. $196-197^\circ$ (Zers.); $[\alpha]_D^{25} = -19,2^\circ$.

$C_{24}H_{30}O_7N_6S$ (548,60) Ber. C 52,55 H 5,88 N 15,32% Gef. C 52,36 H 5,97 N 15,41%

12. *N α -Formyl-N γ -Z-L- α,γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α,γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (V).* 27,4 g (0,05 Mol) Hydrazid X werden in 160 ml 50-proz. Essigsäure, 250 ml Essigester und 35 ml (0,01 Mol) 3 N Salzsäure unter Rühren gelöst, auf -5° abgekühlt, tropfenweise mit einer Lösung von 3,63 g (0,053 Mol) Natriumnitrit in 15 ml Wasser versetzt und 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 gewaschen. Die immer noch schwach essigsäure Lösung wird bei 0° über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und bei 0° aufbewahrt.

Unterdessen werden 10,8 g (0,05 Mol) D-Phenylalanin-methylester-hydrochlorid unter Erwärmen in 15 ml Dimethylformamid gelöst, abgekühlt, mit 7,6 ml (0,055 Mol) Triäthylamin versetzt, 6 Min. bei 0° geschüttelt, mit 20 ml Essigester verdünnt, vom Triäthylamin-hydrochlorid abgenutscht, mit 20 ml Essigester gewaschen und das Filtrat auf -5° abgekühlt. Diese Lösung des Esters wird mit der Lösung des Azides vereinigt und 24 Std. im Eisschrank und 12 Std. bei 20° aufbewahrt. Man versetzt mit dem gleichen Volumen Äther und nutscht das Tripeptid nach 1 Std. ab, wäscht mit viel Äther und Petroläther und trocknet im Vakuum bei 70° . Ausbeute 20,9 g (60%), Smp. $192-194^\circ$, $[\alpha]_D^{25} = -9,1^\circ$ (vgl. 5).

13. *N α -(+)-Isopelargonyl-N γ -Z-D- α,γ -diaminobutyryl-L-threoninhydrazid (XII).* 25,3 g (0,05 Mol) *N α -(+)-Isopelargonyl-N γ -Z-D- α,γ -diaminobutyryl-L-threonin-methylester¹⁾* (Rohprodukt) werden in 130 ml Alkohol unter Erwärmen gelöst, mit 12,7 ml (0,20 Mol) 80-proz. Hydrazinhydrat versetzt und heiss filtriert. Nach 20 Std. wird das Hydrazid abgenutscht, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum bei 80° getrocknet. Ausbeute 22,8 g (90%), Smp. $199-201^\circ$. Zur Analyse wurde aus Methanol umkristallisiert, Smp. $200-201^\circ$, $[\alpha]_D^{25} = +11,4^\circ$.

$C_{25}H_{41}O_6N_5$ (507,61) Ber. C 59,14 H 8,14 N 13,79% Gef. C 58,89 H 8,15 N 13,70%

14. *N α -Formyl-N γ -[N α -(+)-Isopelargonyl-N γ -Z-D- α,γ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- α,γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α,γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (VII).* 14,7 g (0,029 Mol) *N α -(+)-Isopelargonyl-N γ -Z-D- α,γ -diaminobutyryl-L-threoninhydrazid* werden unter Rühren in 150 ml 50-proz. Essigsäure, 21 ml (0,063 Mol) 3 N Salzsäure und 150 ml Essigester gelöst und auf -5° abgekühlt. Unter starkem Rühren tropft man bei -5° eine Lösung von 2,18 g (0,03 Mol) Natriumnitrit in 10 ml Wasser zu und rührt 10 Min. bei -5° weiter. Das Azid wird bei 0° mit Essigester extrahiert und die Essigesterlösungen unter Eiszusatz mit Wasser, 1 N Natriumhydrogencarbonat und Wasser gewaschen. Die immer noch essigsäure Essigesterlösung wird bei 0° über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und mit einer vorgekühlten Lösung von 16,8 g Rohprodukt der Tripeptid-esterbase VI in 25 ml Dimethylformamid versetzt. Man lässt 24 Std. im

Eisschrank und 8 Std. bei 20° stehen, versetzt mit dem gleichen Volumen Äther, nutschts nach 20 Std. ab, wäscht mit Aceton/Äther (1:1), mit Äther und Petroläther und trocknet im Vakuum bei 60°. Die Substanz wird aus Dimethylformamid/Aceton umgefällt, Ausbeute 16,8 g (54%), Smp. 221–223°, $[\alpha]_D^{25} = -4,1^\circ$ (vgl. 7).

Deka-peptid

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 -diaminobutyryl-N γ -[N α -(+)-isopelargonyl-N γ -Z-D- α , γ -diaminobutyryl-L-threonyl]-L- α , γ -diaminobutyryl-N γ -Tos-L- α , γ -diaminobutyryl-D-phenylalanin-methylester (XIII). 9,63 g (0,01 Mol) 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 -diaminobuttersäure³⁾ und 10 g (0,01 Mol) Pentapeptidester VIII werden unter Erwärmen in 50 ml Dimethylformamid gelöst, auf –10° abgekühlt, mit 4,32 g (0,021 Mol) Dicyclohexyl-carbodiimid versetzt und 48 Std. im Eisschrank stehengelassen. Die gelartige Masse wird mit 120 ml Alkohol verrieben, mit 5 ml Eisessig und nach 30 Min. mit weiteren 120 ml Alkohol versetzt und 5 Std. bei 20° aufbewahrt. Nun wird abgenutscht, mit viel Alkohol, Äther und Petroläther gewaschen und im Vakuum bei 50° getrocknet. Das Rohprodukt wird in möglichst wenig Dimethylformamid gelöst, filtriert und mit dem vierfachen Volumen Methanol ausgefällt. Nach 5 Std. wird abgenutscht, mit Methanol, Äther und Petroläther gewaschen und im Vakuum bei 50° getrocknet. Anschliessend wird in gleicher Weise ein zweites Mal umgefällt und getrocknet. Ausbeute nach Aufarbeitung der Umfällmutterlaugen 7,6 g (39%), Smp. 245–249° (Zers.). Zur Analyse wurde aus Dimethylformamid/Methanol umgefällt. Smp. 246–249° (Zers.); $[\alpha]_D^{25} = -15,1^\circ$; ϵ bei 257 m μ = 1507 (Eisessig 92 mg%).*

$C_{97}H_{132}O_{25}N_{16}S$	Ber. C 59,61	H 6,81	N 11,47	S 1,65%
(1954,21)	Gef. „ 59,18	„ 6,92	„ 11,61	„ 1,66%

Quantitative Aminosäurezusammensetzung nach STEIN & MOORE¹⁶⁾:

Ber. Thr	2,0	Leu	1,0	Phe	1,0	Dab	6,0
Gef. „	$1,87 \pm 1,5\%$	„	$0,98 \pm 2,2\%$	„	$0,936 \pm 2,2\%$	„	$6,04 \pm 4\%$

Die Mikroanalysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung unter der Leitung der Herren Drs. H. WALDMANN und A. DIRSCHERL ausgeführt.

SUMMARY

The protected open decapeptide XIII, related to one of the four possible structures for polymyxin B₁ has been synthesized by condensing together the pentapeptides 1-2-3-4-5 and 1'-2'-6-7-8 using either the azide method or the carbodiimide procedure.

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