

SYNTHESE VON ENNIATIN-B-ANALOGEN MIT D-VALIN ANSTELLE VON D- α -HYDROXYISOVALERIANSÄURE

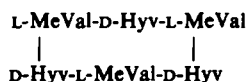
G. LOSSE und H. RAUE

Sektion Chemie der Technischen Universität Dresden

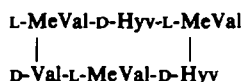
(Received in Germany 10 January 1969; Received in the UK for publication 24 January 1969)

Zusammenfassung—Die Synthese der Enniatin-B-Analogen c -[L-MeVal-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv-)₂] (A), c -[(L-MeVal-D-Val-)₂-L-MeVal-D-Hyv-] (B) und c -(L-MeVal-D-Val-)₃ (C) sowie des c -(L-MeAla-D-Hyv-)₃ wird beschrieben und die mikrobiologische Aktivität dieser Verbindungen mit Enniatin B und einer Reihe seiner Stereoisomeren verglichen.

VERSCHIEDENE AUTOREN.^{1,2} haben theoretisch nachgewiesen, dass Ester- und Amidgruppierungen einander sowohl sterisch als auch in der Elektronendichteverteilung weitgehend ähnlich sind. In letzter Zeit haben besonders Shemyakin und Mitarbeiter³ an Peptidhormonen und Depsipeptid-Antibiotika untersucht, inwieweit auch die biologische Gleichwertigkeit dieser Strukturelemente gegeben ist. Wir haben jetzt im Rahmen unserer Arbeiten über die Beziehungen zwischen Struktur und antibiotischer Wirkung bei Enniatin B und Analogen⁴ geprüft, wie sich speziell der Austausch von D- α -Hydroxyisovaleriansäure gegen D-Valin auf die Aktivität auswirkt. Dabei wurden die Hydroxysäurereste sukzessiv durch die ihnen strukturell und konfiguratativ entsprechenden α -Aminosäurereste ersetzt. Aus der folgenden Formelreihe ist ersichtlich, wie der stufenweise Ersatz der D- α -Hydroxyisovaleriansäure durch D-Valin vom Enniatin B zu einem regulär alternierend aus primären und N-methylierten Aminosäuren aufgebauten Cyclopeptid führt:*

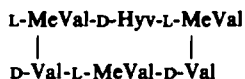


Enniatin B



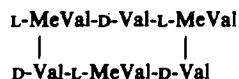
c -[L-MeVal-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv-)₂]

(A)



c -[(L-MeVal-D-Val-)₂-L-MeVal-D-Hyv-]

(B)



c -(L-MeVal-D-Val-)₃

(C)

* Abkürzungen: MeVal = $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-\underset{\text{CH}_3-\text{N}-}{\text{CH}}-\text{CO}-$, Hyv = $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-\underset{\text{O}-}{\text{CH}}-\text{CO}-$

Z = Benzyloxycarbonyl; t.Bu = tert. Butyl

Während für die Synthese des Enniatins B^{5, 6} und seiner Stereoisomeren⁴ die Fragmentkondensation von Aminoacyl-hydroxysäurederivaten zweckmassig ist, müssen für die irregulär alternierenden Analogen des Enniatins B und das Peptidanalogen *c*-(L-MeVal-D-Val-)₃ andere Aufbauprinzipien herangezogen werden. Zum Aufbau des *c*-(L-MeVal-D-Val-)₃ (C) wurde von uns ein Schema gewählt, das in der linearen Vorstufe die N-Methyl-aminosäure C-terminal und die primäre α -Aminosäure N-terminal einsetzt (Schema 1):

D-Val	L-MeVal	D-Val	L-MeVal	D-Val	L-MeVal
		Z—OH	H— ^(I) —Ot.Bu		
		Z— ^(II)	—Ot.Bu	Z— ^(II)	—Ot.Bu
		Z— ^(III)	—OH	H— ^(IV)	—Ot.Bu
Z— ^(II)	—Ot.Bu	Z—	^(V)		—Ot.Bu
Z— ^(III)	—OH	H—	^(VI)		—Ot.Bu
Z—			^(VII)		—Ot.Bu
Z—					—OH
HCl:H			^(VIII)		—OH

SCHEMA 1

Die schwierige Acylierung des N-Methyl-aminosäure-*tert*.butylesters durch N-Benzoyloxycarbonyl-D-valin wird hierbei auf früher Stufe des Syntheseweges vorweggenommen, wobei die Urethanschutzgruppe die Gewähr für das Ausbleiben von Racemisierung auch bei stärkerer Aktivierung der Aminosäure bietet.⁷ Der Versuch, die Komponenten mit Hilfe von N,N'-Carbonyldiimidazol zu verknüpfen, blieb aus sterischen Gründen erfolglos. Hingegen erwies sich Phosphoroxychlorid als geeignetes Reagens zur Herstellung der N-Methyl-peptidbindung. Durch Abänderung der Wielandschen Originalvorschrift⁸ wurde hierbei die Säurelabilität von *tert*.Butylestern berücksichtigt.

Zur Synthese des Tetrapeptids V aus Benzyloxycarbonyldipeptid III und Dipeptidester IV sowie des Hexapeptids VII aus III und VI bewährte sich die Kupplung mit N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid am besten. Vom Hexapeptid VII wurde zuerst der *tert*. Butylrest mit Trifluoressigsäure, dann der Benzyloxycarbonyl-Rest hydrolytisch abgespalten. Auch die Cyclisierung des Hexapeptidhydrochlorids VIII erfolgte mit Dicyclohexylcarbodiimid.^{9, 10} Durch fraktionierte Kristallisation des angefallenen Reaktionsproduktes konnte das durch analytische Daten und Infrarotspektrum charakterisierte Cyclopeptid *c*-(D-Val-L-MeVal-)₃ (C) erhalten werden.

Für die Synthese des Analogons B mit zwei gegenüber Enniatin B ausgetauschten D- α -Hydroxyisovaleriansäurebausteinen wurde ein Aufbauschema entworfen, das im wesentlichen bekannte Zwischenprodukte und Kupplungsmethoden ausnutzt (Schema 2):

Der auch bei der Synthese von *c*-(D-Val-L-MeVal-)₃ (C) verwendete N-Methyl-peptidester H-D-Val-L-MeVal-Ot.Bu (IV) wurde mit N-Benzoyloxycarbonyl-N-methyl-L-valin zum Tripeptidderivat (IX) acyliert, während die Kupplung von N-Benzoyloxycarbonyl-D-valin mit der Enniatin-B-Vorstufe L-MeVal-D-Hyv-Ot.Bu⁴

L-MeVal	D-Val	L-MeVal	D-Val	L-MeVal	D-Hyv
Z-OH	H	Ot.Bu	Z-OH	H	Ot.Bu
Z	(IX)	Ot.Bu	Z	(XI)	Ot.Bu
Z	(X)	OH	H	(XII)	Ot.Bu
Z		(XIII)			Ot.Bu
HCl·H		(XIV)			OH

SCHEMA 2

das Tripeptidderivat (XI) mit C-terminaler Hydroxysäure ergab. Nach selektiver Schutzgruppenabspaltung wurden Benzyloxycarbonyl-tripeptid X und Tripeptidester XII zum Hexadepsipeptidderivat verknüpft, von dem die Schutzgruppen in der oben beschriebenen Weise entfernt wurden. Das Hexadepsipeptid-hydrochlorid XIV wurde dann in der von regulär alternierenden Depsipeptiden her geläufigen Weise als Säurechlorid cyclisiert, allerdings mit einer Ausbeute, die im Vergleich zu Enniatin B und einigen seiner Stereoisomeren⁴ gering war. Beim Aufbau des Analogens A mit nur einem gegen den entsprechenden α -Aminosäurerest ausgetauschten α -Hydroxysäurebaustein wurde das von der Enniatin-B-Synthese⁴ her bekannte Tetradepsipeptid H-(L-MeVal-D-Hyv)₂Ot.Bu schrittweise verlängert, weil dieses Verfahren jede Racemisierungsgefahr vermeidet, die Säurechlorid-Cyclisierung gestattet und mit einer relativ geringen Zahl neuer Zwischenprodukte zum Ziel führt (Schema 3):

L-MeVal	D-Val	L-MeVal	D-Hyv	L-MeVal	D-Hyv
	Z-OH	H			Ot.Bu
	Z		(XV)		Ot.Bu
Z-OH	H		(XVI)		Ot.Bu
Z			(XVII)		Ot.Bu
HCl·H			(XVIII)		OH

SCHEMA 3

Die Acylierung des Tetradepsipeptid-*tert.*butylesters mit Z-D-Val-OH zu XV war mit Hilfe von Phosphoroxychlorid möglich. Bei der anschliessenden Anknüpfung der N-terminalen Aminosäure an H-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv)₂Ot.Bu (XVI) wurden N-Benzyloxycarbonyl-N-methyl-L-valin und Dicyclohexylcarbodiimid in etwa 3-molarem Überschuss eingesetzt, wodurch 96%ige Ausbeute erreicht werden konnte. Die Cyclisierung erfolgte nach Schutzgruppenabspaltung über das Säurechlorid.

Die folgende Tabelle enthält die Ergebnisse der mikrobiologischen Prüfung an *Staphylococcus aureus*, wobei im Vergleich zu Enniatin B ausser den hier beschriebenen Präparaten auch drei Enniatin-B-Stereoisomere aufgeführt sind, über deren Darstellung wir vor einiger Zeit berichtet haben.⁴ Ferner ist das Analogon c-(L-MeAla-D-Hyv)₃ angegeben, das nach den für Enniatin B beschriebenen Methoden aufgebaut wurde:⁴

	Relative Aktivität, bezogen auf Enniatin B = 100	Allgemeine Beurteilung
Enniatin B	100	Aktiv
Enantio-Enniatin B ^{11, 4}	100	Aktiv
all-L-Enniatin B ⁴	10	Inaktiv
all-D-Enniatin B ⁴	10	Inaktiv
c-(L-MeAla-D-Hyv) ₃	10	Inaktiv
c-[L-MeVal-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv) ₂]	Mindestens 25	Merklich aktiv
c-[(L-MeVal-D-Val) ₂ -L-MeVal-D-Hyv-]	Mindestens 25	Merklich aktiv
c-(D-Val-L-MeVal) ₃	10	Inaktiv

Da bei relativen Aktivitäten um 10% die zugehörige Verdünnungsstufe bereits mit der Wachstumshemmung des als Lösungsmittel verwendeten Methanols interferiert, sind Substanzen dieses niedrigen Aktivitätsgrades generell als inaktiv bezeichnet worden. Für c-(D-Val-L-MeVal)₃ (C) wurde das Testergebnis ausserdem in Suspension erhalten, weil sich die Substanz unter den angewandten Bedingungen nur unvollständig löste.

Die mindestens 25%ige Aktivität von c-[L-MeVal-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv)₂] und c-[L-MeVal-D-Val)₂-L-MeVal-D-Hyv-] bestätigt die vorausgesetzte Austauschbarkeit von D- α -Hydroxyisovaleriansäure durch D-Valin im Enniatin B bis zu einem gewissen Grade. Ausgehend von den topochemischen Beziehungen zwischen Enniatin B und seinem Enantiomeren¹¹ sowie den hier mitgeteilten Ergebnissen wäre es von besonderem Interesse, nunmehr zu prüfen, ob speziell bei Enniatin B der schrittweise Austausch von D- α -Hydroxyisovaleriansäure-Esterbindungen gegen N-Methyl-D-valin-Amidbindungen zu antibiotisch voll wirksamen Peptidanalogen führt. Zum Beispiel dürfte für c-(L-MeVal-D-MeVal)₃ eine weitgehende Ähnlichkeit mit Enniatin B erwartet werden.

Für die Ausführung der mikrobiologischen Untersuchungen danken wir Herrn Prof. Dr. W. Ahrens und seinen Mitarbeitern Institut für Technische Hygiene und Mikrobiologie der Technischen Universität Dresden.

EXPERIMENTELLES

Die optische Drehung wurde mit einem Zeiss-Kreispolarimeter mit einer Genauigkeit von $\pm 0.05^\circ$ gemessen, Schmelzpunkte sind korrigiert.

1. c-(D-Val-L-MeVal)₃ (C) und Vorstufen

L-N-Methyl-valin-tert.butylester (I). 26.5 g (0.1 Mol) N-Benzoyloxycarbonyl-N-methyl-L-valin⁵ wurden in 150 ml Methylenchlorid mit 5 g trockener, gepulverter p-Toluol-sulfonsäure und 200 ml über Natrium getrockneten kondensierten Isobutens 3 Tage bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wurde bei -10° unter Rühren in 100 ml 10%ige KHCO₃-Lösung gegossen und der Isobutenüberschuss weitgehend abgedampft. Die Methylenchloridlösung wurde nochmals mit KHCO₃-Lösung gewaschen, über K₂CO₃ getrocknet und bei 30° und 15 Torr eingedampft. Als Rückstand verblieben 26.7 g (73 mMol) roher öliges N-Benzoyloxycarbonyl-N-methyl-L-valin-tert.butylester mit $[\alpha]_D^{15} = -74.5^\circ$ (unverdünnt, ohne Berücksichtigung der Dichte).

Die N-Schutzgruppe wurde in 150 ml Methanol über 1.5 g Aktivkohle mit 5% PdCl₂¹² hydrogenolysiert. Das bei 15 Torr und 30° eingedampfte Filtrat wurde mit 50 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt, der sich abscheidende Aminosäureester in 50 ml Äther aufgenommen, über MgSO₄ getrocknet und bei 25° im Vakuum eingedampft. Sdp₁: 35° ; Ausbeute: 12.3 g (65% d.Th.); $[\alpha]_D^{20} = -5.2^\circ$ (unverdünnt, ohne

Berücksichtigung der Dichte) (Gef.: C, 65.29; H, 11.15; N, 7.67. $C_{10}H_{21}NO_2$ erfordert: C, 65.50; H, 11.15; N, 7.48%).

(N-Benzoyloxycarbonyl-D-valyl)-L-N-methyl-valin-tert.butylester (II). 2.51 g (10 mMol) gepulvertes, über Phosphorpentoxid und Silikagel getrocknetes N-Benzoyloxycarbonyl-D-valin¹³ und 1.87 g (10 mMol) L-N-Methyl-valin-tert.butylester wurden in 40 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran bei -15° unter Rühren mit 1.55 g (10 mMol) reinstem Phosphoroxychlorid und gleich darauf mit 2.03 g (20 mMol) Triäthylamin in jeweils 4 bis 5 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran versetzt. Dann wurde weitere 5 Std. bei -15° gerührt.⁸ Vom ausgefallenen Triäthylammoniumchlorid wurde abfiltriert, mit Äther nachgewaschen, mit 40 ml gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung versetzt, um restliche P—Cl-Bindungen zu hydrolysieren und die dabei frei werdende Säure zu neutralisieren, und im Vakuum eingeengt. Das dabei ausfallende Öl wurde in 50 ml Äther aufgenommen, mit 1 n H_2SO_4 , Kochsalzlösung und gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und eingedampft. Nach mehrstündigem Aufbewahren bei 0.01 Torr verblieben 3.02 g (7.12 mMol; 71% d.Th.) farbloses, zähes Öl; $[\alpha]_D^{20} = -57.5^\circ$ ($c = 1$; Benzol) (Gef.: C, 65.36; H, 8.29; N, 6.88. $C_{23}H_{36}N_2O_3$ erfordert: C, 65.68; H, 8.58; N, 6.67%).

(N-Benzoyloxycarbonyl-D-valyl)-L-N-methyl-valin (III). 3.3 g (7.8 mMol) (N-Benzoyloxycarbonyl-D-valyl)-L-N-methyl-valin-tert.butylester wurden in 10 ml wasserfreier Trifluoressigsäure acidolysiert.¹⁴ Nach Aufarbeitung wurden 2.43 g (6.7 mMol; 85% d.Th.) farblose, spröde Substanz erhalten; $[\alpha]_D^{20} = -58.7^\circ$ ($c = 1$; Benzol) (Gef.: C, 62.68; H, 7.87; N, 8.01. $C_{19}H_{28}N_2O_3$ erfordert: C, 62.62; H, 7.74; N, 7.69%).

D-Valyl-L-N-methyl-valin-tert.butylester (IV). 3.55 g (8.4 mMol) (N-Benzoyloxycarbonyl-D-valyl)-L-N-methyl-valin-tert.butylester wurden in Methanol über 0.5 g Aktivkohle mit 5% $PdCl_2$ hydrogenolysiert. Nach Aufarbeitung⁵ wurde der in nahezu quantitativer Ausbeute anfallende Ester destilliert; $Sdp_{0.005}$ 85° ; $[\alpha]_D^{20} = -149.5^\circ$ ($c = 1$; Benzol) (Gef.: C, 62.59; H, 10.44; N, 9.89. $C_{15}H_{30}N_2O_3$ erfordert: C, 62.90; H, 10.56; N, 9.79%).

Z-(D-Val-L-MeVal)-₂ Ot.Bu (V). (a) Synthese mittels Chlorameisensäureäthylester: 1.09 g (3 mMol) Z-D-Val-L-MeVal-OH wurden in 5 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran unter Rühren bei -15° mit 304 mg (3 mMol) Triäthylamin in 5 ml Tetrahydrofuran und danach mit 324 mg (3 mMol) Chlorameisensäureäthylester versetzt. Nach 10 Minuten wurden 860 mg (3 mMol) H-D-Val-L-MeVal-Ot.Bu zugegeben. Das Gemisch wurde weitere 8 Std. gerührt und 10 Std. bei bis auf 0° ansteigender Temperatur stehengelassen. Dann wurde filtriert, eingedampft und das zurückbleibende farblose, zähe Öl in 50 ml Äther mit 1 n H_2SO_4 , Kochsalzlösung und $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. 1.52 g Rohprodukt aus der getrockneten Ätherlösung zeigten $[\alpha]_D^{20} = -80^\circ$ ($c = 1$; Benzol). Bei der Chromatographie an Aluminiumoxid⁴ wurde eine Hauptfraktion von 1.15 g (1.82 mMol; 61% d.Th.) mit $[\alpha]_D^{20} = -85^\circ$ ($c = 1$; Benzol) erhalten. Gef: C, 64.96; H, 8.99; N, 8.50. $C_{34}H_{56}N_4O_7$ erfordert: C, 64.53; H, 8.92; N, 8.85%.

(b) Synthese mittels N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid: 561 mg (1.54 mMol) Z-D-Val-L-MeVal-OH wurden mit 440 mg (1.54 mMol) H-D-Val-L-MeVal-Ot.Bu. in 3 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran vereinigt und bei -15° mit 316 mg (1.54 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in 2 ml Tetrahydrofuran versetzt. Nach 3 Std. bei -15° wurde 4 Tage bei 0° aufbewahrt. Dann wurde vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, mit Äther nachgewaschen und eingedampft. Der Rückstand wurde in 20 ml Äther mit 1 n H_2SO_4 , Kochsalzlösung und $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Nach Chromatographie an Aluminiumoxid wurden als Hauptfraktion 970 mg (1.53 mMol; 99% d.Th.) farblose Substanz mit $[\alpha]_D^{20} = -85^\circ$ ($c = 1$; Benzol) erhalten.

H-(D-Val-L-MeVal)-₂ Ot.Bu (VI). 2 g (3.2 mMol) Z-(D-Val-L-MeVal)-₂ Ot.Bu ergaben nach katalytischer Hydrogenolyse⁵ 1.10 g (2.2 mMol; 69% d.Th.) farbloses Öl, das direkt zur Synthese des Hexapeptidderivates eingesetzt wurde; $[\alpha]_D^{20} = -110^\circ$ ($c = 1$; Benzol).

Z-(D-Val-L-MeVal)-₃ Ot.Bu (VII). 1.275 g (3.5 mMol) Z-D-Val-L-MeVal-OH wurden mit 1.07 g (2.16 mMol) H-(D-Val-L-MeVal)-₂ Ot.Bu in 5 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran vereinigt und bei -15° mit 650 mg (3.15 mMol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Nach 8 Std. bei -15° wurde 6 Tage bei 0° aufbewahrt. Nach Abfiltrieren wurde eingedampft und in Äther mit 1 n H_2SO_4 , Kochsalzlösung und $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Aus dem $NaHCO_3$ -Extrakt wurden 282 mg überschüssige Carboxylkomponente isoliert. Die Säulenchromatographie⁴ des Rohprodukts ergab als Hauptfraktion 1.7 g (2 mMol; 93% d.Th.) farblose amorphe Substanz; $[\alpha]_D^{20} = -140^\circ$ ($c = 1$; Benzol) (Gef.: C, 64.10; H, 9.17; N, 9.80. $C_{45}H_{76}N_6O_9$ erfordert: C, 63.96; H, 9.06; N, 9.95%).

H-(D-Val-L-MeVal)-₃ OH·HCl (VIII). 1.386 g (1.64 mMol) Z-(D-Val-L-MeVal)-₃ Ot.Bu wurden in 10 ml wasserfreier Trifluoressigsäure eine Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Eindampfen im

Vakuum wurde der Rückstand in 10 ml Toluol aufgenommen und erneut eingedampft, dann in Äther fünfmal mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft. Nach Aufbewahren bei 0·01 Torr verblieben 1·267 g (1·61 mMol; 98% d.Th.) Z-(D-Val-L-MeVal)-₃OH. Anschliessend wurde in 20 ml Methanol über 500 mg Aktivkohle mit 5% PdCl₂ hydrogenolysiert und nach Filtrieren und Eindampfen zur Überführung ins Hydrochlorid in wenig Methylenchlorid mit 15 ml 0·5 n HCl in wasserfreiem Äther versetzt. Nach einer Stunde wurde eingedampft, zunächst im Vakuum über Silikagel und festem KOH und schliesslich bei 0·01 Torr getrocknet. Es verblieben 1·021 g (1·48 mMol; 90% d.Th.) Hydrochlorid als amorphe, pulverisierbare Substanz; $[\alpha]_D^{20} = 150^\circ$ ($c = 1$; Äthanol) (Gef.: C, 57·35; H, 9·25; N, 11·80. C₃₃H₆₃ClN₆O₇ erfordert: C, 57·33; H, 9·18; N, 12·18%).

Cyclo-(D-Val-L-MeVal)-₃. 347 mg (0·5 mMol) 20 Std. im Vakuum über Silikagel aufbewahrtes H-(D-Val-L-MeVal)-₃OH-HCl wurden mit 51 mg (0·5 mMol) Triäthylamin in 100 ml Methylenchlorid zusammengegeben. Diese Lösung tropfte unter wirksamen Rühren im Laufe von 6 Std. bei -15° zur Lösung von 1·051 g (5 mMol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in 1·4 l Methylenchlorid.^{10, 15} Anschliessend wurde 8 Tage bei 0° stehengelassen. Dann wurde im Vakuum eingedampft, der Rückstand mit 100 ml Äther und 20 ml Methylenchlorid versetzt und 2 Std. mit 40 ml 50%iger Essigsäure gerührt.¹⁰ Der Dicyclohexylharnstoff wurde abfiltriert, vom Filtrat wurde die wässrige essigsäure Phase abgetrennt und die ätherische mehrmals mit gesättigter NaHCO₃-Lösung bis zur alkalischen Reaktion gewaschen. Nach Trocknen über MgSO₄ und Eindampfen wurden aus der Äther-Methylenchlorid-Lösung 320 mg farblose feste Masse erhalten. Bei der Chromatographie an Aluminiumoxid der Aktivitätsstufe II mit Cyclohexan-Methylenchlorid 1:1 traten bei Zusatz von 5% Isopropanol zum Elutionsmittel 224 mg farblose Substanz mit $[\alpha]_D^{20} = -70^\circ$ ($c = 1$; Äthanol-Methylenchlorid 1:1) aus. Diese Hauptfraktion wurde unter Ausnutzung unterschiedlicher Löslichkeit ihrer Komponenten fraktioniert. In Methylenchlorid unlöslich waren 51 mg mit $[\alpha]_D^{20} = -15^\circ$ ($c = 1$; Äthanol-Methylenchlorid 1:1); Schmp. 220–224°. Die Molekulargewichtsbestimmung durch isotherme Destillation in Chloroform ergab einen Wert von 9000, der auf ein Polymeres oder höheres Ringhomologes von c-(D-Val-L-MeVal)-₃ hindeutet. Das IR-Spektrum dieser Fraktion war bandenärmer als das der übrigen Fraktionen, es ergab keine Hinweise auf freie Amino- oder Carboxylgruppen.

Aus dem Filtrat der schwerlöslichen Fraktion fielen beim Einengen und Abkühlen 52 mg farbloses Pulver, von denen aus Methanol mit Wasser 40 mg auskristallisierten. Das IR-Spektrum dieser Fraktion weist keine freie Amino- oder Carboxylgruppe aus; charakteristisch sind die Amid-II-Bande bei 1520 cm^{-1} , die Aufspaltung der Amid-Carbonylabsorption in 1660 und 1650 cm^{-1} und NH-Valenzschwingungen bei 3380 cm^{-1} . $[\alpha]_D^{20} = -200^\circ$ ($c = 1$; Benzol-Methylenchlorid 1:1); Schmp. (Zersetzung) 330° (Gef.: N, 13·07%; Molekulargewicht 657 nach isothermer Destillation in Chloroform. C₃₃H₆₀N₆O₉ erfordert: N, 13·19%; Molekulargewicht 636·9).

2. c-[(L-MeVal-D-Val)-₂ L-MeVal-D-Hyv-] (B) und Vorstufen

Z-L-MeVal-D-Val-L-MeVal-Or.Bu (IX). 980 mg (3·7 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-N-methyl-L-valin wurden bei -15° in 3 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran mit 374 mg Triäthylamin und anschliessend unter Rühren mit 400 mg (3·7 mMol) Chlorameisensäureäthylester versetzt. Nach 15 Minuten wurden 977 mg (3·4 mMol) D-Valyl-L-N-methyl-valin-*tert*.butylester (IV) in 2 ml Tetrahydrofuran zuge tropft. Nach 6 Std. Rühren bei -15° wurde 10 Std. bei 0° stehen gelassen, dann filtriert, mit Äther nachgewaschen und im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in Äther aufgenommen und mit 1 n H₂SO₄ Kochsalzlösung und gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, getrocknet und eingedampft. Die Chromatographie des öligen Rückstands ergab als Hauptfraktion 1·4 g (2·6 mMol; 77% d.Th.) Tripeptidester; $[\alpha]_D^{20} = -150^\circ$ ($c = 1$; Benzol) (Gef.: N, 7·79. C₂₉H₄₇N₃O₆ erfordert: N, 7·87%).

Z-L-MeVal-D-Val-L-MeVal-OH (X). 1·36 g (2·5 mMol) Z-L-MeVal-D-Val-L-MeVal-Or.Bu wurden in Trifluoressigsäure acidolysiert.¹⁴ Nach Aufarbeitung und 10 Std. Aufbewahren bei 0·01 Torr verblieben 1·0 g (2·1 mMol; 84% d.Th.) farblose amorphe Substanz; $[\alpha]_D^{20} = -120^\circ$ ($c = 1$; Benzol) (Gef.: N, 8·57. C₂₃H₃₉N₃O₆ erfordert: N, 8·81%).

Z-D-Val-L-MeVal-D-Hyv-Or.Bu (XI). 1·26 g (5 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-D-valin und 1·43 g (5 mMol) L-N-Methyl-valyl-D- α -hydroxyisovaleriansäure-*tert*.butylester* wurden in 5 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran bei -15° unter Rühren mit 0·77 g (5 mMol) Phosphoroxychlorid und anschliessend tropfenweise mit 1·01 g (10 mMol) Triäthylamin in 3 ml Tetrahydrofuran versetzt und weitere 6 Std. bei -15° gerührt. Nach Filtrieren wurde mit 20 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt und im Vakuum eingengt. Das sich abscheidende Öl wurde in 50 ml Äther aufgenommen, mit 1 n H₂SO₃ Kochsalzlösung und NaHCO₃-Lösung gewaschen, getrocknet und eingedampft. 1·6 g Rohprodukt ergaben nach Chromato-

graphie an Aluminiumoxid 1.5 g farblores Öl (2.9 mMol; 58% d.Th.) (Gef.: N, 5.18-C₂₈H₄₄N₂O₇ erfordert: N, 5.38%).

H-D-Val-L-MeVal-D-Hyv-Or.Bu (XII). 1.4 g (2.7 mMol) Z-D-Val-L-MeVal-D-Hyv-Or.Bu wurden in Methanol über PdCl₂/Aktivkohle innerhalb von 2 Std. hydrogenolysiert. Das eingedampfte Filtrat wurde in 50 ml Äther aufgenommen und mit 10-ml-Portionen 1 n H₂SO₄ so lange extrahiert, bis sich der saure Auszug beim Versetzen mit NaHCO₃ nicht mehr trübte. Das aus den mit NaHCO₃ versetzten Extrakten sich abscheidende Öl wurde in Äther aufgenommen, mit Kochsalzlösung gewaschen und sofort zum Hexadepsipeptid eingesetzt: 0.66 g (1.71 mMol; 63% d.Th.).

Z-(L-MeVal-D-Val)-₂-L-MeVal-D-Hyv-Or.Bu (XIII). 956 mg (2 mMol) Z-L-MeVal-D-Val-L-MeVal-OH und 660 mg (1.7 mMol) H-D-Val-L-MeVal-D-Hyv-Or.Bu wurden in 3 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran vereinigt und bei -15° mit 408 mg (2 mMol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in 2 ml Tetrahydrofuran versetzt. Die Lösung stand 3 Std. bei -15° und 5 Tage bei 0°. Dann wurde filtriert, mit Äther nachgewaschen und eingedampft, der Rückstand in 30 ml Äther mit 1 n H₂SO₄, Kochsalzlösung und NaHCO₃-Lösung gewaschen und getrocknet. Nach Eindampfen verblieben 1.6 g farblores Öl, die an Silikagel chromatographiert wurden. Hauptfraktion: 1.2 g (1.42 mMol; 84% d.Th.); $[\alpha]_D^{20} = -120^\circ$ (c = 1; Benzol) (Gef.: C, 63.75; H, 8.97; N, 7.85. C₄₅H₇₃N₅O₁₀ erfordert: C, 63.88; H, 8.93; N, 8.27%).

H-(L-MeVal-D-Val)-₂-L-MeVal-D-Hyv-OH·HCl (XIV). 875 mg (1.03 mMol) Z-(L-MeVal-D-Val)-₂-L-MeVal-D-Hyv-Or.Bu wurden mit Trifluoressigsäure zu 812 mg Z-(L-MeVal-D-Val)-₂-L-MeVal-D-Hyv-OH acidolysiert. Nach Hydrogenolyse verblieben 651 mg H-(L-MeVal-D-Val)-₂-L-MeVal-D-Hyv-OH, zum Teil als Hydrochlorid vorliegend. Dieses Produkt wurde in 10 ml Methylchlorid mit 10 ml 0.5 n HCl in Äther versetzt, nach 2 Std. im Vakuum eingedampft, 20 Std. im Vakuum über Silikagel und festem KOH und 8 Std. bei 0.01 Torr getrocknet. Es verblieben 664 mg farblores, amorphes Hydrochlorid (0.96 mMol; 93% d.Th.); $[\alpha]_D^{20} = -35^\circ$ (c = 1; Äthanol) (Gef.: C, 57.08; H, 9.10; N, 10.26. C₃₃H₆₂ClN₅O₈ erfordert C, 57.24; H, 9.03; N, 10.12%).

Cyclo-[(L-MeVal-D-Val)-₂-L-MeVal-D-Hyv-]. 277 mg (0.4 mMol) H-(L-MeVal-D-Val)-₂-L-MeVal-D-Hyv-OH·HCl wurden mittels Thionylchlorid ins Säurechlorid überführt und in insgesamt 2 l wasserfreiem Benzol mit einem Überschuss an Triäthylamin zur Cyclisierung angesetzt.⁴ Von 80 mg Rohprodukt fielen nach der Chromatographie an Aluminiumoxid 21 mg farblose amorphe Substanz mit $[\alpha]_D^{20} = -88^\circ$ (c = 0.4; Benzol) an, die bei 150°/0.02 Torr flüchtig waren (Molekulargewicht nach isothermer Destillation in Chloroform 598. Erfordert 637.9).

Das IR-Spektrum unterscheidet sich erwartungsgemäß von dem der linearen Vorstufe durch das Fehlen von Absorptionen freier Amino- und Carboxylgruppen. Es ist dem des Enniatins B ähnlich, zeigt jedoch die Amid-II-Bande bei 1500 cm⁻¹, während die auf Absorption der Estergruppierungen zurückzuführenden Banden bei 1030, 1130, 1200 und 1400 cm⁻¹ an Schärfe und Intensität abnehmen. Die Amid-Carbonylbande bildet bei 1690 cm⁻¹ eine Schulter aus.

3. c-[L-MeVal-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv-)]₂ und Vorstufen (A)

Z-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv)-₂Or.Bu (XV). 555 mg (2.2 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-D-valin und 1.1 g H-(L-MeVal-D-Hyv)-₂Or.Bu⁴ in 3 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran wurden bei -15° unter Rühren mit 338 mg Phosphoroxchlorid und anschliessend tropfenweise mit 223 mg Triäthylamin in 2 ml Tetrahydrofuran versetzt. Nach 8 Std. Rühren bei -15° wurde filtriert, mit Äther nachgewaschen, mit 10 ml gesättigter NaHCO₃-Lösung versetzt und im Vakuum eingengt. Das ausgefallene Öl wurde in 30 ml Äther aufgenommen, von der wässrigen Phase abgetrennt und mit 1 n H₂SO₄ in mehreren Portionen so oft gewaschen, bis sich der Waschextrakt beim Versetzen mit NaHCO₃ nicht mehr trübte. Dann wurde die Ätherlösung noch mit Kochsalzlösung und gesättigter NaHCO₃-Lösung ausgezogen, über MgSO₄ getrocknet und eingedampft. Zurückbleibende 800 mg farblores Rohprodukt ergaben an Aluminiumoxid eine chromatographische Hauptfraktion von 750 mg (1.02 mMol; 46% d.Th.) als zähes Öl; $[\alpha]_D^{20} = -90^\circ$ (c = 1; Benzol) (Gef.: N, 5.98. C₃₉H₆₃N₃O₁₀ erfordert: N, 5.73%).

H-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv)-₂Or.Bu (XVI). 750 mg (1.02 mMol) Z-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv)-₂Or.Bu wurden innerhalb einer Stunde in Methanol über PdCl₂/Aktivkohle hydrogenolysiert. Das eingedampfte Filtrat wurde in 20 ml Äther aufgenommen und diese Lösung zehnmal mit je 10 ml 0.5 n H₂SO₄ extrahiert. Die mit NaHCO₃ alkalisch gestellten vereinigten Extrakte wurden zweimal mit Äther ausgezogen, die Ätherauszüge 2 Std. bei -20° über MgSO₄ getrocknet und eingedampft; 410 mg (0.68 mMol; 83% d.Th.) farbloser amorpher Rückstand wurden sofort zu XVII umgesetzt.

Z-L-MeVal-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv)-₂Or.Bu (XVII). 530 mg (2 mMol) N-Benzoyloxycarbonyl-N-methyl-L-valin und 410 mg (0.68 mMol) H-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv)-₂Or.Bu wurden in 3 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran bei -15° mit 392 mg (1.9 mMol) N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid in 2 ml Tetrahydrofuran

versetzt. Diese Lösung wurde 4 Std. bei -15° und 7 Tage bei 0° aufbewahrt. Nach Filtrieren wurde eingedampft, der Rückstand in Äther mit 1 n H_2SO_4 , Wasser und NaHCO_3 -Lösung gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Das eingedampfte Rohprodukt wurde zunächst an Aluminiumoxid chromatographiert. Nach anschließender Gelfiltration an Sephadex LH 20 in Methanol fielen 550 mg (0.65 mMol; 96% d.Th.) amorphe Substanz mit $[\alpha]_D^{20} = -115^{\circ}$ ($c = 1$; Benzol) an (Gef.: N, 6.80. $\text{C}_{43}\text{H}_{74}\text{N}_4\text{O}_{11}$ erfordert N, 6.62%).

H-L-MeVal-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv-) $_2$ OH·HCl (XVIII). Die Behandlung von 500 mg (0.59 mMol) Z-L-MeVal-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv-) $_2$ Or.Bu mit Trifluoressigsäure ergab 474 mg Z-L-MeVal-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv-) $_2$ OH, dessen Hydrogenolyse 381 mg H-L-MeVal-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv-) $_2$ OH. Das Hydrogenolyseprodukt wurde in 10 ml Methylenchlorid mit 10 ml 0.5 n HCl in Äther 2 Std. stehengelassen, eingedampft, über Silikagel und festem KOH im Vakuum und 10 Std. bei 0.01 Torr aufbewahrt. Es verblieben 368 mg (0.53 mMol; 90% d.Th.) farbloses, amorphes Hydrochlorid; $[\alpha]_D^{20} = -110^{\circ}$ ($c = 1$; Äthanol) (Gef.: C, 57.09; H, 8.95; N, 7.86. $\text{C}_{33}\text{H}_{51}\text{ClN}_4\text{O}_9$ erfordert: C, 57.16; H, 8.87; N, 8.09%).

Cyclo-L-MeVal-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv-) $_2$. 218 mg (0.13 mMol) H-L-MeVal-D-Val-(L-MeVal-D-Hyv-) $_2$ OH·HCl wurden mittels Thionylchlorid ins Säurechlorid überführt und in insgesamt 2 l wasserfreiem Benzol mit einem Überschuss an Triäthylamin zur Cyclisierung angesetzt.⁴ Von 79 mg öligem Rohprodukt verblieben nach Chromatographie an Aluminiumoxid 56 mg mit $[\alpha]_D^{20} = -100^{\circ}$ ($c = 1$; Benzol). Davon sublimierten bei $150^{\circ}/0.005$ Torr 45 mg, die aus Methanol-Wasser in feinen Nadeln kristallisierten; Schmp. $217\text{--}219^{\circ}$ (Gef.: N, 8.52. $\text{C}_{33}\text{H}_{51}\text{N}_4\text{O}_9$ erfordert: N, 8.76%). Das IR-Spektrum unterscheidet sich von dem der linearen Vorstufe durch das Fehlen von Absorptionen freier Amino- oder Carboxylgruppen; es gleicht weitgehend dem des Enniatins B, zeigt jedoch erwartungsgemäss die Amid-II-Bande als Schulter bei 1500 cm^{-1} , eine Verbreiterung der Amid-Carbonylbande und eine breite Bande bei 3350 cm^{-1} .

4. c-(L-MeAla-D-Hyv-) $_3$ und Vorstufen

Z-L-MeAla-D-Hyv-Or.Bu. Aus N-Benzoyloxycarbonyl-N-methyl-L-alanin¹⁶ ($[\alpha]_D^{20} = -39.2^{\circ}$ ($c = 1$; Äthanol); Schmp. $58\text{--}59^{\circ}$), das nach bekannter Vorschrift⁵ aus N-Methyl-L-alanin¹⁷ erhalten worden war, und D- α -Hydroxyisovaleriansäure-tert.butylester⁵ wurde mittels Benzolsulfchlorid in Pyridin^{4,6} Z-L-MeAla-D-Hyv-Or.Bu dargestellt und durch Säulenchromatographie⁴ gereinigt; Ausbeute 84% d.Th.; $[\alpha]_D^{20} = -25^{\circ}$ ($c = 1$; Benzol) (Gef.: C, 63.86; H, 8.20; N, 3.36. $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{NO}_6$ erfordert: C, 64.10; H, 7.95; N, 3.56%).

Z-L-MeAla-D-Hyv-OH. Aus Z-L-MeAla-D-Hyv-Or.Bu wurde durch Acidolyse mit wasserfreier Trifluoressigsäure^{14,4} in 92%iger Ausbeute Z-L-MeAla-D-Hyv-OH erhalten; $[\alpha]_D^{20} = -30.6^{\circ}$ ($c = 1.3$; Benzol) (Gef.: N, 3.95. $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_6$ erfordert: N, 4.15%).

H-L-MeAla-D-Hyv-Or.Bu. Die Hydrogenolyse von Z-L-MeAla-D-Hyv-Or.Bu in Methanol über $\text{PdCl}_2/\text{Aktivkohle}$ ^{5,4} ergab in 67%iger Ausbeute H-L-MeAla-D-Hyv-Or.Bu; Sdp._{0.02} 75° ; $[\alpha]_D^{20} = +18.8^{\circ}$ ($c = 0.9$; Benzol) (Gef.: N, 5.32. $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ erfordert: N, 5.42%).

Z-(L-MeAla-D-Hyv-) $_2$ Or.Bu. Z-L-MeAla-D-Hyv-OH wurde mittels Phosphorpentachlorid ins Säurechlorid überführt⁵ und mit H-L-MeAla-D-Hyv-Or.Bu zum N-Benzoyloxycarbonyl-tetradepsipeptid-tert.butylester umgesetzt, der nach chromatographischer Reinigung⁴ in 84%iger Ausbeute als zähes Öl anfiel; $[\alpha]_D^{20} = -48.8^{\circ}$ ($c = 0.9$; Benzol) (Gef.: N, 4.66. $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_9$ erfordert: N, 4.84%).

H-(L-MeAla-D-Hyv-) $_2$ Or.Bu. Z-(L-MeAla-D-Hyv-) $_2$ Or.Bu wurde in Methanol über $\text{PdCl}_2/\text{Aktivkohle}$ in 80%iger Ausbeute hydrogenolysiert,^{4,5} der erhaltene Tetradepsipeptidester ($[\alpha]_D^{20} = -38^{\circ}$ ($c = 1.1$; Benzol)) direkt zum Hexadepsipeptid umgesetzt.

Z-(L-MeAla-D-Hyv-) $_3$ Or.Bu. Z-L-MeAla-D-Hyv-OH wurde als Säurechlorid⁵ mit H-(L-MeAla-D-Hyv-) $_2$ Or.Bu zum N-Benzoyloxycarbonyl-hexadepsipeptid-tert.butylester gekuppelt; Ausbeute nach chromatographischer Reinigung 75%; $[\alpha]_D^{20} = -64.5^{\circ}$ ($c = 1$; Benzol) (Gef.: N, 5.58. $\text{C}_{39}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_{12}$ erfordert: N, 5.52%).

H-(L-MeAla-D-Hyv-) $_3$ OH·HBr. 1.1 g (1.5 mMol) Z-(L-MeAla-D-Hyv-) $_3$ Or.Bu ergaben nach Hydrogenolyse⁴ 890 mg H-(L-MeAla-D-Hyv-) $_3$ Or.Bu ($[\alpha]_D^{15} = -49.7^{\circ}$ ($c = 1$; Benzol)). Nach dessen Acidolyse mit HBr/Trifluoressigsäure⁴ wurden 755 mg (1.20 mMol; 80% d.Th.) gelbliche, spröde, hygroskopische Substanz isoliert; $[\alpha]_D^{20} = -32.3^{\circ}$ ($c = 1$; Äthanol) (Gef.: N, 6.18. $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{BrN}_3\text{O}_{10}$ erfordert: N, 6.43%).

c-(L-MeAla-D-Hyv-) $_3$. 210 mg (0.32 mMol) H-(L-MeAla-D-Hyv-) $_3$ OH·HBr wurden mittels Thionylchlorid ins Säurechlorid überführt und in 2 l wasserfreiem Benzol mit einem Überschuss an Triäthylamin zur Cyclisierung angesetzt.⁴ 80 mg öliges Rohprodukt ergaben nach Chromatographie an Aluminiumoxid 32 mg zähes Öl. Auf kurzem Wege destillierten davon bei $100^{\circ}/0.01$ Torr 29 mg (16% d.Th.) amorphe Substanz mit $[\alpha]_D^{20} = -63.5^{\circ}$ ($c = 0.6$; Benzol) (Gef.: N, 7.20; Molekulargewicht nach isothermer Destillation

in Chloroform 498. $C_{27}H_{45}N_3O_9$ erfordert: N, 7.57%; 555-6). Das IR-Spektrum dieses Produktes ähnelt zwischen 1000 und 1800 cm^{-1} dem des Enniatins B, zeigt jedoch erwartungsgemäss andere Intensitätsverhältnisse im Fingerprintgebiet und breitere Carbonylbanden. Im Bereich der CH-Valenzschwingungen ($2850\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$) treten naturgemäss ausgeprägte Unterschiede zu Enniatin B auf.

LITERATUR

- ¹ L. Pauling und R. B. Corey, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **37**, 235 (1951).
- ² J. M. O'Gorman, W. Shand und V. Schomaker, *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 4222 (1950).
- ³ M. M. Shemyakin, L. A. Shchukina, E. J. Vinogradova, G. A. Ravdel und Yu. A. Ovchinnikov, *Experientia* **22**, 535 (1966).
- ⁴ G. Losse und H. Raue, *Chem. Ber.* **101**, 1532 (1968).
- ⁵ Pl. A. Plattner, K. Vogler, R. O. Studer, P. Quitt und W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* **46**, 927 (1963).
- ⁶ M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov und A. A. Kiryushkin, *Tetrahedron* **19**, 581 (1963).
- ⁷ H. Determann, J. Heuer, P. Pfaender und M. L. Reinartz, *Liebigs Ann.* **694**, 190 (1966).
- ⁸ Th. Wieland und B. Heinke, *Ibid.* **599**, 70 (1956).
- ⁹ E. A. Morozova und S. M. Zhenodarova, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **125**, 93 (1959).
- ¹⁰ M. A. Ondetti und P. L. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4373 (1965).
- ¹¹ M. M. Shemyakin, Yu. A. Ovchinnikov, V. T. Ivanov und A. V. Evstratov, *Nature, Lond.* **213**, 412 (1967).
- ¹² R. Mozingo, *Org. Synth.* **26**, 78 (1946).
- ¹³ W. Grassmann und E. Wünsch, *Chem. Ber.* **91**, 462 (1958).
- ¹⁴ A. A. Kiryushkin, Yu. A. Ovchinnikov und M. M. Shemyakin, *Khim. Prir. Soedin.* **58** (1965).
- ¹⁵ H. Brockmann und H. Bujard, *Naturwissenschaften* **49**, 515 (1962).
- ¹⁶ U. Otto und A. Reinhold, Diplomarbeiten, T.U. Dresden, 1965.
- ¹⁷ P. Quitt, J. Hellerbach und K. Vogler, *Helv. Chim. Acta* **46**, 327 (1963).