

Hans Brockmann und Helmut Lackner¹⁾

Actinomycine, XXVIII²⁾; Synthesen von Actinomycinen und actinomycin-ähnlichen Chromopeptiden, III²⁾

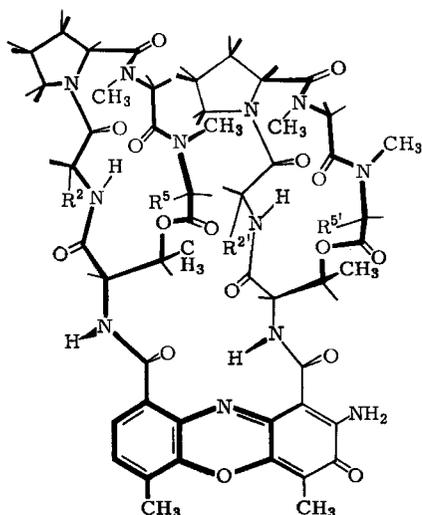
Totalsynthese von Actinomycin C₃ über Bis-*seco*-actinomycin C₃

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

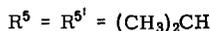
(Eingegangen am 11. Oktober 1966)

Umsetzung von Actinocinyl-dichlorid (8a; Disäurechlorid von 5) mit Estern von Aminosäuren und Peptiden führt zu Actinocinyl-bis-aminosäure- bzw. Actinocinyl-bis-peptidestern. — Verschiedene Wege zur Synthese von Bis-*seco*-actinomycin C₃ (12a) wurden erprobt und der ergiebigste zur Totalsynthese von Actinomycin C₃ (13a) benutzt.

Alle bisher bekannten Actinomycine³⁾ enthalten als Chromophor 2-Amino-4.6-dimethyl-phenoxazon-(3)-dicarbonsäure-(1.9) (Actinocin⁴⁾) (5)⁵⁾. Sie unterscheiden sich in mindestens einer der beiden Pentapeptidlacton-Gruppen (1a–d), die bei den *iso*-Actinomycinen, z. B. Actinomycin C₃ (1d) gleich und bei den *aniso*-Actinomycinen, wie Actinomycin C₂ und C_{2a} (1b bzw. 1c), verschieden sind⁵⁾. Die strukturellen



	R ² *)	R ^{2'}
1a	(CH ₃) ₂ CH	(CH ₃) ₂ CH
b	(CH ₃) ₂ CH	C ₂ H ₅ (CH ₃)CH
c	C ₂ H ₅ (CH ₃)CH	(CH ₃) ₂ CH
d	C ₂ H ₅ (CH ₃)CH	C ₂ H ₅ (CH ₃)CH



*) Bezifferung der Reste wie die der Aminosäuren⁶⁾

1) Dissertat. H. Lackner, Univ. Göttingen 1961.

2) XXVII. und II. Mittel.: H. Brockmann, H. Lackner, R. Mecke, S. v. Grunelius, H.-S. Petras und H. D. Berndt, Chem. Ber. 99, 3672 (1966).

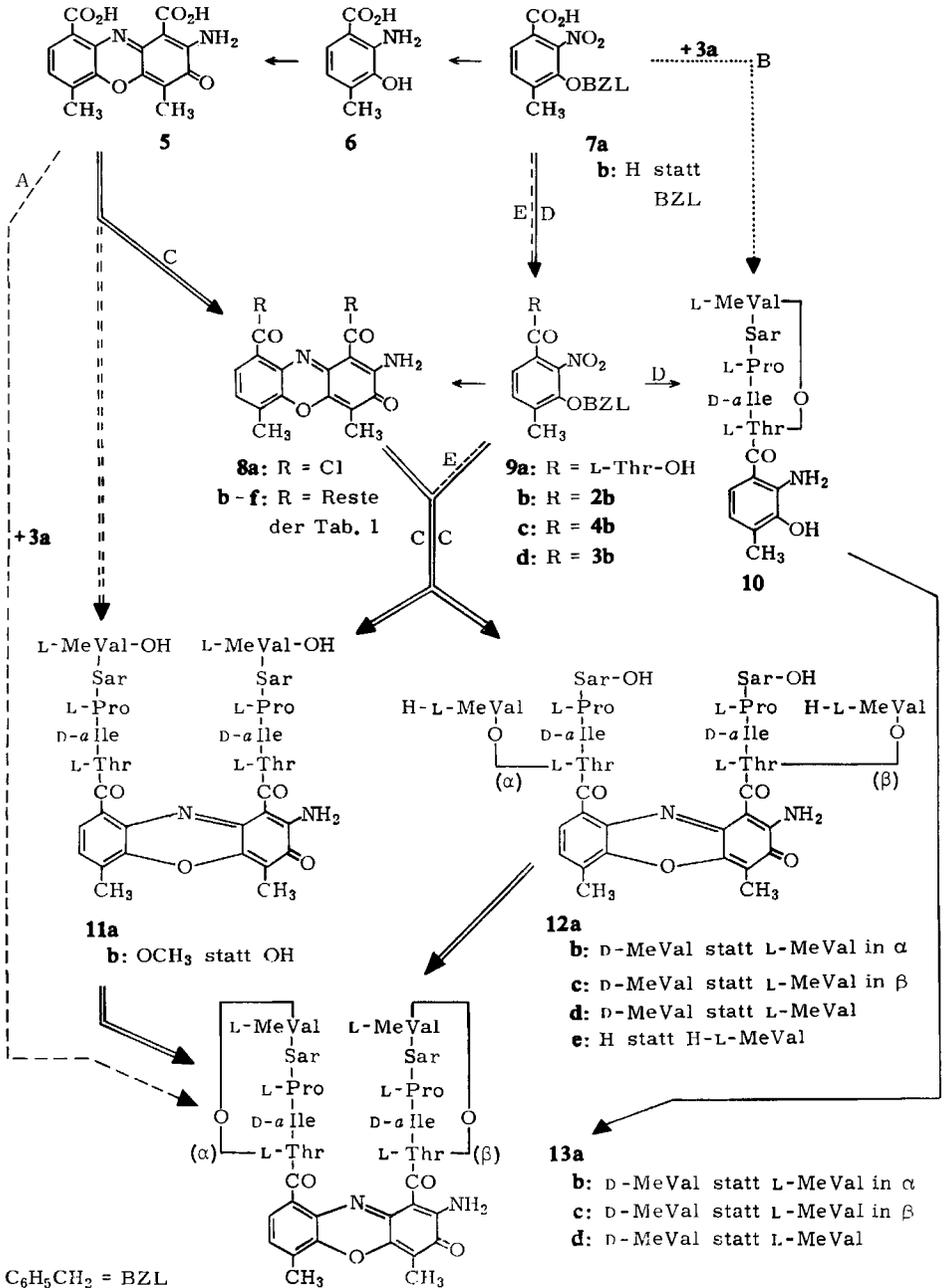
3) Bisher sind 23 Actinomycine kristallisiert isoliert worden.

4) H. Brockmann und H. Muxfeldt, Chem. Ber. 91, 1242 (1958).

5) H. Brockmann, Angew. Chem. 72, 939 (1960).

6) Bezifferung vom Chromophor ab, beginnend mit Threonin.

E. Synthese einer Vorstufe von **3b** an **7a** zu **9b** bzw. **9c**, Übertragung der **7a** → **5**-Synthese auf **9b** bzw. **9c** und Einmünden in Weg C.



Da uns daran lag, nicht nur die Konstitution von Actinomycinen durch Synthese zu bestätigen, sondern Verfahren zu finden, die Strukturvarianten der Actinomycine für biologische Untersuchungen in ausreichender Menge zugänglich machen, wurden von Anfang an Vorarbeiten für alle Wege in Angriff genommen^{2,10,12-14}). Nachdem sich deren Vor- und Nachteile gezeigt hatten, kam man auf Weg E zu den *iso*-Actinomycinen C₁ (**1a**) und C₃ (**1d**)^{15,16}) und den Strukturvarianten Actinomycin-(L-Ser-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal)¹⁷), 4,6-Didesmethyl-actinomycin C₁¹⁸), Actinomycin-(D-Thr-L-Val-D-Pro-Sar-D-MeVal)¹⁹), dem Antipoden von **1a**; und auf Weg D zu den *aniso*-Actinomycinen C₂ (**1b**) bzw. C_{2a} (**1c**) sowie **1a** und **1d**²⁰).

Im folgenden berichten wir über die Synthese von Actinocinyl-bis-peptiden auf Weg C und über die Totalsynthese von Actinomycin C₃ (**1d**≡**13a**) nach E über **9a** und **9c**.

Synthese von Actinocinyl-bis-peptiden aus Actinocin

Die Darstellung von Actinocinyl-bis-peptiden aus **5** auf Weg C schien vorteilhaft, weil **1. 5** leicht und in sehr guter Ausbeute zugänglich ist, während die Übertragung der Synthese **7a** → **5** auf mit **7a** *N*-acylierte Peptide anfangs unergiebig war, und **2. die** Farbe der Kupplungsprodukte deren Chromatographie erleichtert.

Das zunächst nur amorph erhaltene **5**⁴⁾ kristallisiert aus Dimethylformamid¹⁾ und ist ungewöhnlich schwerlöslich (Zahlen vgl. Versuchsteil). Die Actinomycine dagegen lösen sich viel besser: In unpolaren Solvenzien dank der sechs Alkylreste der nur eine CO—NH-Bindung enthaltenden Peptidringe und in Wasser, weil infolge hydrophober Wechselwirkung zwei Actinomycinmoleküle durch Ineinanderschieben der senkrecht zur Chromophorebene stehenden Peptidringe (**1a—d**) zu Dimeren „verzahnt“ werden²¹⁾. Diese stehen im Gleichgewicht mit instabileren, weniger wasserlöslichen Oligomeren, die für den negativen Temperaturkoeffizienten der Wasserlöslichkeit²²⁾ verantwortlich sind²¹⁾.

Im Elektronenspektrum (Methanol, Abbild.) ist **5** den Actinomycinen ähnlicher als der Actinocin-dimethylester¹⁰⁾. In konz. Salzsäure liegt **5** als Kation **14** vor, in

¹²⁾ Vgl. den folgenden Abschnitt.

¹³⁾ Vorläufige Mitteil.: *H. Brockmann* und *H. Bujard*, *Naturwissenschaften* **49**, 515 (1962); Synthese eines Pentapeptidlactons.

¹⁴⁾ Vorläufige Mitteil.: *H. Brockmann* und *V. Graef*, *Naturwissenschaften* **49**, 540 (1962); Cyclo-glycyl-sarkosyl-L-lysyl-D-valyl-L-prolyl.

¹⁵⁾ Vorläufige Mitteil.: *H. Brockmann* und *H. Lackner*, *Naturwissenschaften* **51**, 384, 435 (1964).

¹⁶⁾ Vorläufige Mitteil.: *H. Brockmann* und *H. Lackner*, *Naturwissenschaften* **47**, 230 (1960); **48**, 555 (1961); **51**, 407 (1964).

¹⁷⁾ Vorläufige Mitteil.: *H. Brockmann* und *H. Lackner*, *Tetrahedron Letters* [London] **1964**, 3523.

¹⁸⁾ Vorläufige Mitteil.: *H. Brockmann* und *F. Seela*, *Tetrahedron Letters* [London] **1966**, 4803; dort nach der älteren Ringbezeichnung noch als 1,8-Didesmethyl-actinomycin C₁ bezeichnet.

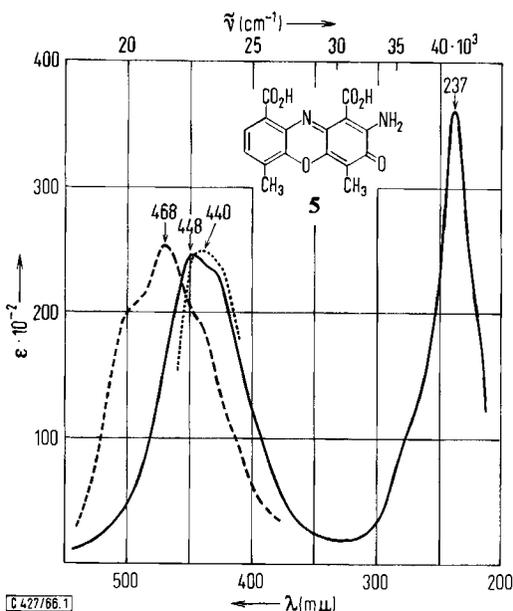
¹⁹⁾ Vorläufige Mitteil.: *H. Brockmann* und *W. Schramm*, *Tetrahedron Letters* [London] **1966**, 2331.

²⁰⁾ Vorläufige Mitteil.: *H. Brockmann* und *H. Lackner*, *Tetrahedron Letters* [London] **1964**, 3517.

²¹⁾ *W. Müller* und *I. Emme*, *Z. Naturforsch.* **20b**, 835 (1966).

²²⁾ *H. Berg*, *K.-P. Backus*, *W. Jaekel*, *G. Löber* und *K.-F. Tlach*, *Mbr. dtsh. Akad. Wiss. Berlin* **1**, 524 (1959); *K.-H. Schulmeyer*, *Diplomarb.*, Univ. Göttingen 1961.

0.001 *n* Alkalihydroxid als Di-Anion. Potentiometrische Titration in Wasser gab pK_1 6.3, pK_2 9.5. Der Farbumschlag Gelb \rightarrow Violett in Dimethylformamid nach Verbrauch von 2 Äquivv. Alkalihydroxid zeigt das Auftreten des dreiwertigen Anions **15**. Die gleiche Violettfärbung geben in Dimethylformamid mit wenig *n* Alkalihydroxid Actinocinyl-peptide, Actinomycine und deren *N*-Monoalkylderivate; nicht dagegen, wie zu erwarten, die *N*-Dialkylverbindungen.



Absorptionskurven von Actinocin (**5**)

in Methanol ———, konz. Salzsäure - - - - und 0.001 *n* NaOH - - - - -

5 läßt sich wegen seiner geringen Löslichkeit nicht unter Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) oder ähnlich wirkenden Reagenzien mit Aminosäure- oder Peptidestern kuppeln. Erfolg hatten wir dagegen mit dem noch nicht beschriebenen Actinocinyl-dichlorid (**8a**). Es entsteht durch kurzes Kochen von **5** mit Thionylchlorid; bei längerem Erwärmen wird an C-1 decarboxyliert und an C-1 oder C-7 chloriert²³⁾.

Das sehr empfindliche und daher als Rohprodukt umgesetzte **8a** gab mit Anilin ein sehr schwer lösliches Anilid **8b** und mit den Methylestern von Glycin, DL-Alanin,

²³⁾ Beim Erwärmen von 2-Desamino-2-hydroxy-actinomycinen mit Thionylchlorid wird an C-7 des Chromophors chloriert; H. Brockmann, J. Ammann und W. Müller, Tetrahedron Letters [London] 1966, 3595.

L-Threonin, L-Threonyl-D-*allo*-isoleucin und **2a** die Actinocinyl-bis-aminosäure- und Actinocinyl-bis-peptidester der Tab. 1. Mit **11b** hatten wir — als Methylester — zum ersten Mal synthetische Actinomycin C₃-säure (**11a**) in Händen.

Ein kristallisiertes, rotes Nebenprodukt bei der Darstellung von **8d**, dessen Analysenzahlen auf Chlor-descarboxy-actinocinyl-glycin-methylester paßten, zeigte, daß dem verwendeten **8a** 1(7)-Chlor-1-descarboxy-actinocinyl-chlorid beigemischt war.

Tab. 1. Actinocinyl-bis-aminosäure- und Actinocinyl-bis-peptidester aus Actinocinyl-dichlorid (**8a**)

	R	Schmp.	% Ausb.	$[\alpha]_D^{20}$ a)	ϵ_{445}
8b	NH-C ₆ H ₅	310°	40	—	zu wenig löslich
8c	DL-Ala-OCH ₃	269–272° (Zers.)	84	—	27 800 ^{b)}
8d	Gly-OCH ₃	291–293°	35	—	30 200 ^{c)}
8e	L-Thr-OCH ₃	256–259° (Zers.)	80	+122±5°	27 900 ^{b)}
8f	L-Thr-D- α Ile-OCH ₃	107–110°	30	+89±4°	26 100 ^{c)}
11b	L-Thr-D- α Ile-L-Pro-Sar-L-MeVal-OCH ₃	—	2	—	26 000 ^{c)}

a) In Chlf., b) in Methanol mit 4% Chlf., c) Methanol.

Die Ausbeuten der Actinocinyl-bis-aminosäureester sind ähnlich gut wie bei der Synthese aus **7a**^{4,10}. Die der Actinocinyl-bis-peptidester nehmen mit der Länge der Peptidketten ab, weil die Aminogruppe dem voluminösen **8a** schwerer zugänglich ist und nach der Bindung eines Peptidrestes dieser die Umsetzung der zweiten Säurechloridgruppe sterisch hindert. Der von **5** nach **11a** führende Teil des Actinomycin-Syntheseweges C ist somit präparativ bedeutungslos.

Synthese von Bis-*seco*-actinomycin C₃

Actinomycin C₃ (**13a**) wird durch 10 *n* HCl zu Bis-*seco*-actinomycin C₃ (**12a**) hydrolysiert und dieses durch verd. Alkalihydroxid zu Actinomycin C₃-des-säure (**12e**)²⁴ gespalten. **12a** läßt sich mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCCI) oder Chlorameisensäure-äthylester zu **13a** recyclieren²⁵. Damit wurde dessen Totalsynthese gleichbedeutend mit der von **12a**.

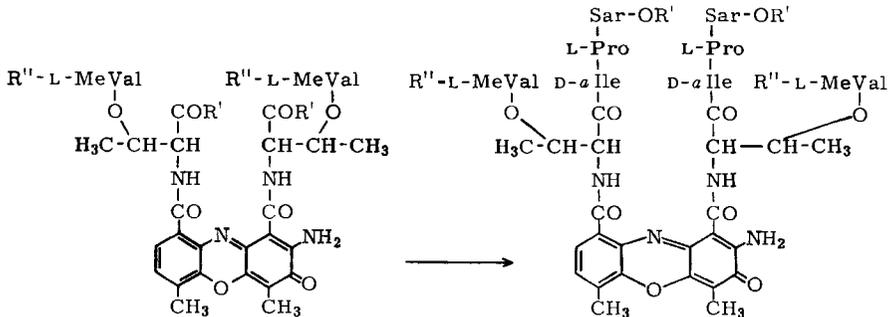
Da **12e** bereits auf Weg C²⁶), wenn auch in geringer Ausbeute, zugänglich gemacht war, lag nahe, **12a** — in Umkehrung des Abbaus **12a** → **12e** — durch Veresterung von **12e** mit *N*-Methyl-L-valin darzustellen und so die **12e**-Synthese mit der Recyclisierung **12a** → **13a** zu einer Actinomycin C₃-Totalsynthese zu kombinieren. Dabei konnte 1. statt synthetischer die besser (aus **13a**) zugängliche, native Des-säure verwendet und 2. die Veresterung bequem verfolgt werden, weil **12a** und halbseitig mit *N*-Methyl-L-valin verestertes **12e** als zwei- bzw. einsäurige Basen pherographisch leicht nachweisbar sind.

²⁴) H. Brockmann und W. Sunderkötter, *Naturwissenschaften* **47**, 229 (1960). **12a** ist dort als C₃AII bezeichnet.

²⁵) H. Brockmann, W. Sunderkötter, K. W. Ohly und P. Boldt, *Naturwissenschaften* **47**, 230 (1960).

²⁶) R. Mecke, unveröffentlicht.

Um für die Veresterung von **12e** mit *N*-Methyl-L-valin²⁷⁾ optimale Bedingungen zu finden, wurde zunächst versucht, Actinocinyl-bis-L-threonin (**16a**)¹⁰⁾ und *N*-Benzoyloxycarbonyl-*N*-methyl-L-valin (im folgenden Z-L-MeVal-OH) zu **16b** zu verestern; und zwar mit Phosgen, dessen



16a: R' = OH, H statt R''-L-MeVal

b: R' = OH, R'' = Z

c: R' = OH, R'' = H

d: R' = CH₂CN, H statt R''-L-MeVal

e: R' = CH₂CN, R'' = Z

f: R' = OH, R'' = CHO

17a: R' = BZL, R'' = Z

b: R' = H, R'' = H

c: R' = CH₃, R'' = CHO

kleines Molekül sterische Hinderung am ehesten ausschloß. Im Reaktionsprodukt war nach Abhydrieren der Schutzgruppe (Z) und Rückoxydation mit Luft²⁸⁾ pherographisch neben neutralen Anteilen und halbseitig mit Z-L-MeVal-OH verestertem **16a** nur sehr wenig **16c** nachzuweisen.

Um die bei der Phosgen-Methode eventuell störenden Carboxyle von **16a** auszuschalten, überführten wir dieses mit Chloracetonitril in **16d**, dessen Cyanmethoxyl klein genug schien, um die Veresterung von **16d** mit Z-L-MeVal-OH nicht zu hindern und außerdem ermöglichte, das gesuchte **16e** ohne weiteres mit *D*-allo-Isoleucyl-L-prolyl-sarkosin-benzylester (**19b**) zum Bis-*seco*-actinomycin C₃-Derivat **17a** umzusetzen. Das Rohprodukt aus **16d**, Z-L-MeVal-OH und Phosgen lieferte bei Chromatographie an saurem Kieselgel halbseitig mit Z-L-MeVal-OH verestertes **16d** und in sehr geringer Ausbeute eine schneller wandernde Fraktion, die als **16e** angesehen und in Tetrahydrofuran mit **19b** umgesetzt wurde. Das Kupplungsprodukt war **17a**, denn katalytische Hydrierung und Rückoxydation lieferte eine gelbe, durch Vergleich mit einem authentischen Präparat als **17b** identifizierte Verbindung.

Veresterung von **16a** mit Z-L-MeVal-OH nach dem Isovalerylchlorid-Verfahren²⁹⁾, bei dem Carboxylgruppen nicht stören, und Umsetzen des Reaktionsproduktes mit **19b** und DCCl oder Chlorameisensäure-äthylester lieferte nach Hydrierung und Luftoxydation des Reaktionsproduktes kein **17b**. Dagegen erhielten wir auf gleichem Wege aus **16a** und Formyl-*N*-methyl-L-valin und Kupplung des entstandenen **16f** mit *H*-*D*-a Ile-L-Pro-Sar-OCH₃ in sehr kleiner Menge eine gelbe Verbindung, die durch Vergleich mit einem authentischen Präparat als Diformyl-bis-*seco*-actinomycin C₃-dimethylester **17c** identifiziert wurde.

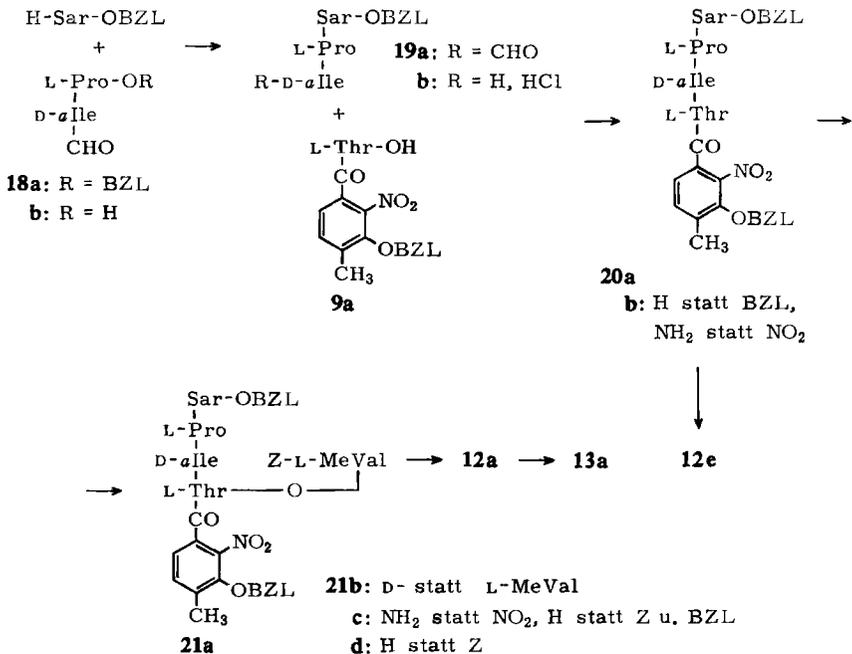
²⁷⁾ *N*-Methyl-L-valin und andere für Actinomycin-Synthesen benötigte *N*-Methyl-aminosäuren wurden durch reduktive Alkylierung der entsprechenden *N*-Benzyl-aminosäuren und diese durch Hydrierung der zugehörigen Benzylidenaminosäuren hergestellt. Dieses Verfahren, bei dem wir keine Zwischenprodukte isolierten und das in guter Ausbeute optisch reine *N*-Methyl-aminosäuren liefert, wurde unabhängig von uns auch von *P. Quitt, J. Hellerbach* und *K. Vogler* gefunden und von ihnen zuerst veröffentlicht: *Helv. chim. Acta* **46**, 327 (1963).

²⁸⁾ Um den bei der Hydrierung entstandenen Dihydro-chromophor zu dehydrieren.

²⁹⁾ *E. D. Nicolaidis, R. D. Westland* und *E. L. Wittke, J. Amer. chem. Soc.* **76**, 2887 (1954).

Die Ausbeuten waren in allen Fällen offenbar deshalb so gering, weil schon die Veresterung des ersten Threoninhydroxyls durch den benachbarten Actinocinyl- und Threonylrest sterisch gehindert wird und die des zweiten noch zusätzlich durch den Z-L-MeVal-Rest. Der Plan, **12e** mit Z-L-MeVal-OH zu **12a** = **17b** zu verestern, wurde daher aufgegeben.

Mit der Überführung von **16a** in **17b** war die Recyclisierung von **17b** zu **13a**⁻⁰ zum ersten Mal zu einer, wenn auch präparativ bedeutungslosen Actinomycin C₃-Totalsynthese erweitert. Sie rationell zu machen, scheidet wie bei allen anderen Abwandlungen des Syntheseweges C daran, daß zwei mit einem großen Actinocinylrest N-acylierte, benachbarte Aminosäure- oder Peptidreste aus sterischen Gründen in jeder Stufe nur mit sehr unterschiedlicher Ausbeute weiter zu **2b** oder **4b** aufgebaut werden können. Und da in Analogie dazu auch bei der Umsetzung von **8a** mit **3a** (Weg A) bzw. **2a** und **4a** mit starker sterischer Behinderung der zweiten Säurechloridgruppe zu rechnen war, kamen für präparativ brauchbare Actinomycinsynthesen nur die Wege B, D und E in Betracht; d. h. Bis-*seco*-actinomycin mußte von **7a** ausgehend über **9a** durch oxydative Kondensation von **21c** dargestellt werden. Als Vorstufe des luftempfindlichen, ohne Isolierung weiter zu verarbeitenden **21c** wählten wir **21a**, dessen drei Schutzgruppen bei katalytischer Hydrierung der Nitrogruppe abgespalten werden.



Bei der Synthese von **21a** wurde der Engpaß — die Veresterung des Threoninhydroxyls — an den Schluß gelegt. Die empfindliche Estergruppe hat dann keine Kupplungsreaktionen zu überstehen und der Umfang der Veresterung kann nach katalytischer Hydrierung des Reaktionsproduktes und anschließender Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) leicht photographisch aus der Menge des entstandenen **12a** ermittelt werden.

Vorstufe von **21a** war damit **20a**. **7a** stufenweise mit den vier Aminosäuren zu verknüpfen, war nicht zu empfehlen, weil nach früheren Versuchen die Ausbeute bei den höheren Stufen zurückgeht. Kupplung von **7a** mit dem fertigen Tetrapeptid hätte den Austausch von dessen aminoendständiger Schutzgruppe gegen einen **7a**-Rest bedeutet. Daher wurde mit **7a** *N*-acyliertes L-Threonin (**9a**)¹⁰ und *D*-*allo*-Isoleucyl-L-prolyl-sarkosin-benzylester-hydrochlorid (**19b**) mit DCCI oder Woodwards Reagenz³⁰ in 65-proz. Ausb. zum amorphen, lichtempfindlichen **20a** verknüpft, d.h. für die Reaktion **19b** → **20a** eine Vorstufe des Chromophors als Aminoschutzgruppe verwendet.

Zur Synthese von **19b** wurde das mit DCCI aus Formyl-*D*-*allo*-isoleucin und L-Prolin-benzylester zu 75% erhaltene, kristallisierte **18a** zum kristallisierten **18b** hydriert und dieses mit Sarkosin-benzylester und DCCI zu 70% in **19a** übergeführt. Abspalten des Formylrestes unter Intaktlassen der Estergruppe zu **19b** gelang ähnlich wie bei Methylestern³¹), jedoch unter verschärften Bedingungen, mit 10-proz. benzylalkoholischer Salzsäure.

Mit **20a** ist auch die Actinomycin C₃-des-säure **12e** bequem zugänglich geworden. Katalytische Hydrierung von **20a** zu **20b** und anschließende Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) lieferte zu 60% gelbrotes, amorphes **12e** mit $[\alpha]_D^{20}$: $-94 \pm 3^\circ$ (Methanol), das in allen Eigenschaften mit nativem **12e** übereinstimmte.

Aus **20a** erhielten wir mit *Z*-L-MeVal-OH und Phosgen oder Isovalerylchlorid sowie mit *N*-Methyl-L-valylchlorid-hydrochlorid³²) unter verschiedenen Bedingungen nur sehr wenig **21a** bzw. **21d**. Desgleichen aus **20a**, *Z*-MeVal-OH und *N,N'*-Carbonyldiimidazol³³), mit dem die Ausbeuten jedoch viel besser wurden, als — statt, wie üblich, 30 Min. in stöchiometrischem Mengenverhältnis — **20a** 75 Stdn. mit zehnfachem Überschuß an *Z*-L-MeVal-OH und *N,N'*-Carbonyldiimidazol in Tetrahydrofuran unter Ausschluß von Licht und Feuchtigkeit gekocht wurde.

Bei Chromatographie des Reaktionsproduktes an saurem Kieselgel aus Benzol/Chloroform (3:2) und Extinktionsmessung jeder Fraktion bei 366 m μ fand sich unter den so ermittelten Zonen nur eine, deren Inhaltstoff nach katalytischer Hydrierung und Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) eine einheitliche Pherogrammzone mit dem R_F -Wert von **12a** zeigte. Der gelbliche, amorphe Inhaltsstoff, auf **20a** bezogen 25%, wurde durch Elementar- und Aminosäure-Analyse⁷) als **21a** charakterisiert.

Oxydation von **21c**, des Hydrierungsproduktes von **21a**, mit Kaliumhexacyanoferrat bei pH 7.2 und Chromatographie an Cellulose gab, auf **21a** bezogen, zu 61% eine amorphe, rote Verbindung mit $[\alpha]_D^{20}$: $-62 \pm 2^\circ$ und λ_{\max} 446 m μ , $\epsilon = 25\,500$ (Methanol). Sie stimmte im IR- und Elektronenspektrum, im R_F -Wert des Pherogramms (pH 1.1) und der Papierchromatogramme verschiedener Lösungsmittelsysteme sowie in den Werten der Elementar- und Aminosäure-Analyse mit dem Dihydrochlorid von nativem *Bis-seco*-actinomycin (**12a**) überein und war damit als synthetisches **12a** identifiziert.

³⁰) R. B. Woodward, R. A. Olofson und H. Mayer, J. Amer. chem. Soc. **83**, 1010 (1961). Die Abtrennung der Nebenprodukte war mit diesem Reagenz leichter als mit DCCI.

³¹) J. C. Sheehan und Ding-Djung H. Yang, J. Amer. chem. Soc. **80**, 1154 (1958).

³²) S. Lévine, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1382 (1954).

³³) H. A. Staab, Liebig's Ann. Chem. **609**, 75 (1957); Angew. Chem. **71**, 194 (1959).

Actinomycin C₃ aus synthetischem Bis-*seco*-actinomycin C₃

Zur Überführung des synthetischen **12a**-Dihydrochlorides in **13a** verwendeten wir Chlorameisensäure-äthylester³⁴⁾, der bei der Recyclisierung von nativem **12a** eine geringere Zahl an Nebenprodukten gegeben hatte als DCCI³⁵⁾. Von den vielen, gelben Chromatogrammfraktionen (Cellulose, Butanol/Dibutyläther/10-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat, 2:3:5) des Reaktionsproduktes waren nur zwei antibiotisch wirksam. Beide kristallisierten nach Chromatographie an Aluminiumoxid. Die eine — auf das eingesetzte Bis-*seco*-actinomycin C₃ bezogen 3% — wurde durch Vergleich mit einem nativen Präparat als Actinomycin C₃ (**13a**) identifiziert (Tab. 2). Die andere, in ähnlicher Ausbeute angefallen, unterschied sich — von der spezif. Drehung abgesehen — nur wenig von **13a** (Tab. 2). Ihre Entstehung ist folgendermaßen zu erklären.

Tab. 2. Vergleich von synthetischem und nativem Actinomycin C₃

	Actinomycin C ₃ (13a) (synthetisch)	Actinomycin C ₃ (13a) (nativ)	Stereoisomeres Syntheseprodukt
Schmp.	237—240°	238—241°	240—242°
ε _{max} (Methanol) ^{a)}	24 400 (443 mμ) 32 800 (240 mμ)	24 500 (443 mμ) 33 300 (240 mμ)	24 800 (443 mμ) 38 900 (240 mμ)
IR-Spektrum (KBr)	übereinstimmend		geringe Abweichungen bei 1743 und 1245/cm
R _F	Identisch in LS I, IV, VII, X		in LS I, VII, X ~ R _F von 13a , in LS IV > R _F von 13a
[α] _D ²⁰ (c = 0.1 in Methanol)	-286 ± 10°	-310° ± 10°	-210 ± 10°
Aminosäure-Analyse ⁷⁾			
Gef. Mol Thr, <i>a</i> Ile, Pro, Sar, MeVal	1.4 ^{b)} , 1.9 2.0, 2.0, 1.9	1.5, 2.1 2.2, 2.0, 1.8	1.3, 1.9 2.0, 1.9, 1.9
C,H,N-Werte	identisch		passen auf 13a
Antibiotisch wirksame Grenzkonzentration			
<i>B. subtilis</i>	1:8.5 × 10 ⁶	1:8.0 × 10 ⁶	1:10 × 10 ⁶
<i>St. aureus</i>	1:6.5 × 10 ⁶	1:6.5 × 10 ⁶	1:6.5 × 10 ⁶

^{a)} Absorptionskurven deckungsgleich bis auf das etwas höhere ε_{240mμ} des stereoisomeren Syntheseproduktes.

^{b)} Ein Teil des Threonins wird bei der zur Aminosäurebestimmung erforderlichen Hydrolyse zerstört.

Z-L-MeVal-OH wird bei der langdauernden Umsetzung mit **20a** racemisiert; erkenntlich an der optischen Inaktivität des am Ende isolierten Z-MeVal-OH-Überschusses. Z-DL-MeVal-OH gäbe mit **20a** ein 1:1-Gemisch von **21a** und **21b**, verunreinigt mit den anteilmäßig nicht ins Gewicht fallenden Stereoisomeren, die bei der Synthese von **20a** mit DCCI durch partielle Racemisierung entstehen³⁶⁾.

Ein derartiges Gemisch würde, katalytisch hydriert und anschließend oxydiert, ein mit Stereoisomeren verunreinigtes 1:1:1-Gemisch der Bis-*seco*-actinomycine **12a—d** liefern und dieses — falls alle gleich schnell cyclisieren — ein Stereoisomere enthaltendes Gemisch aus gleichen Anteilen der Actinomycine **13a—d**.

³⁴⁾ R. A. Boissonas und J. Schumann, Helv. chim. Acta 35, 2229 (1952).

³⁵⁾ P. Boldt, unveröffentlicht.

³⁶⁾ Zur Racemisierung bei Peptidsynthesen mit DCCI vgl. F. Weygand, A. Prox und W. König, Chem. Ber. 99, 1451 (1966).

Da sich Anomere, wie Actinomycin $X_{\alpha\beta}$ und $X_{\alpha\delta}$ chromatographisch trennen lassen³⁷⁾, darf man gleiches auch für **13b** bzw. **13c** und **13a** oder **13d** annehmen. Trennung von **13b** und **13c** dagegen ist nicht zu erwarten.

Actinomycin $X_{\alpha\delta}$ ist antibiotisch zehnmal wirksamer als Actinomycin $X_{\alpha\beta}$ ³⁷⁾. Dies schließt nicht aus, daß sich Anomere, wie **13a**, **13b** und **13c** in der biologischen Aktivität gleichen, macht aber unwahrscheinlich, daß Stereoisomere, die sich von **13a** an mehr als einem Asymmetriezentrum unterscheiden (wie **13d**), antibiotisch wirksam sind.

Danach ist das zweite, antibiotisch wirksame Syntheseprodukt ein 1:1-Gemisch aus **13b** und **13c** und die annähernd gleichen Ausbeuten an **13a** und **13b** + **13c** wären dadurch bedingt, daß Z-L-MeVal-OH bei der Veresterung mit **20a** nur partiell racemisiert wird.

Da die spezifische Drehung des synthetischen Actinomycins nur wenig unter der des nativen liegt, verteilen sich die meisten der durch partielle Racemisierung entstehenden Stereoisomeren offenbar auf die vielen, antibiotisch unwirksamen Chromatogrammzonen des Cyclisierungsproduktes. Vielleicht verringern auch Unterschiede in der Cyclisierungsgeschwindigkeit die Zahl der stereoisomeren Actinomycine.

Die Gesamtausbeute über alle Stufen, bezogen auf Formyl-D-*allo*-isoleucin lag für Bis-*seco*-actinomycin (**12a—d**) bei 4.4% und für Actinomycin C_3 bei 0.13%³⁸⁾.

13a ist das erste Actinomycin gewesen, das durch Abbau vollständig aufgeklärt wurde⁴⁾. Unsere Synthese bestätigt das Ergebnis des Abbaus.

Frau M. Köppler sind wir für geschickte, unermüdliche Mitarbeit zu Dank verpflichtet. — Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und den Farbenfabriken Bayer AG, Werk Elberfeld, danken wir für Förderung unserer Arbeit.

Beschreibung der Versuche³⁹⁾

Lösungsmittelsysteme (LS) für die Chromatographie^{a)}

LS I: Butanol/Dibutyläther/10-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat^{b)} (1:2:3). — LS II: (1:1:2). — LS III: (1:3:4). — LS IV: (2:3:5). — LS V: (3:7:10).

LS VI: Butanol/Butylacetat/10-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat/Wasser (7:3:3:7).

LS VII: Butylacetat/10-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat (1:1).

LS VIII: Butanol/Dibutyläther/1.2-Dichlor-äthan/0.07 *m* Phosphatpuffer pH 7.0 (6:2:2:10).

LS IX: Butylacetat/Butanol/0.07 *m* Phosphatpuffer pH 6.0 (2:1:3).

LS X: Butanol/Dibutyläther/Diisopropyläther/7-proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat (2:1:7:10).

LS XI: Isoamylalkohol/0.07 *m* Phosphatpuffer pH 6.0 (1:1).

LS XII: Essigsäure/Ameisensäure/Wasser (2:3:15).

^{a)} Cellulosepulver (Nr. 123) und Chromatographiepapier (2043 b) von Fa. Schleicher & Schüll, Dassel.

^{b)} Alle Kresotinatlösungen mit *m*-Kresotinsäure gesättigt.

Actinocin (5): 4.3 g 2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure (**7b**) in 100 ccm Methanol wurden mit Palladium/A-Kohle aushydriert, filtriert und nach Zugabe von 150 ccm *n* NaHCO₃ unter Rühren portionsweise mit 22 g Kaliumhexacyanoferrat(III) in wenig Wasser versetzt, wobei man mit *n* NaHCO₃ stets oberhalb pH 7 hielt. Nach 30 Min. wurde mit 2 *n* HCl ange-

³⁷⁾ H. Brockmann und J. H. Manegold, Chem. Ber. 93, 2971 (1960).

³⁸⁾ Bei Klärung der Frage, ob als Nebenprodukt ein Decapeptid mit Actinocin-Chromophor entsteht, wurde später die Ausbeute bei der Cyclisierung auf 45% erhöht und damit die Actinomycin C₃-Gesamtausbeute auf 2%. J. Ammann, Dissertat., Univ. Göttingen 1963.

³⁹⁾ Schmp. wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert.

säuert und der abzentrifugierte, mit Wasser und Aceton gewaschene Niederschlag aus 500 ccm siedendem Dimethylformamid umkristallisiert. Dunkelrote Säulen (Zers. oberhalb 270°). Ausb. 90%.

$C_{16}H_{12}N_2O_6$ (328.3) Ber. C 58.55 H 3.69 N 8.53 Äquiv.-Gew. 164
Gef. *) C 58.77 H 3.77 N 8.41 Äquiv.-Gew. 171 **)

*) Zweimal umkristallisiert und fein zerrieben 12 Stdn. bei 90° i. Hochvak. getrocknet.
**) Potentiometrische Titration mit 0.05 n NaOH in Wasser.

Löslichkeit: Eine Suspension von kristallisiertem **5** in 50 ccm Lösungsmittel rührte man 5 Stdn. bei 21° und ermittelte aus der Extinktion (größtes langwelliges Maximum, fett in Klammern hinter den Löslichkeitswerten) der nach Zentrifugieren überstehenden Lösung deren Konzentration unter Zugrundelegung von ϵ_{448} (Methanol). Der durch Lösungsmittel-abhängigkeit der ϵ_{\max} -Werte bedingte Fehler wurde vernachlässigt. Löslichkeit in mg/100 ccm: Benzol 0.0; Chloroform 0.16 (460, 440); Eisessig 0.62 (456, 436); Methanol 1.44 (448, 434); Wasser 2.4 (462); Dimethylformamid 40 (461, 444), bei 5° aus Gewicht des Verdampfungsrückstandes bestimmt.

ϵ_{448} (Methanol): a) 0.246 mg feinerriebenes **5** mit 45 ccm Methanol 30 Min. unter Rückfluß gekocht und auf 50 ccm aufgefüllt. b) 0.250 mg **5** in wenig heißem Dimethylformamid gelöst, mehrmals mit Methanol i. Vak. abgedampft. Rückstand 15 Min. mit 90 ccm Methanol gekocht und auf 100 ccm aufgefüllt. In beiden Lösungen $\epsilon_{448} = 25400$.

Actinocinyl-dichlorid (8a): 260 mg fein zerriebenes **5** kochte man mit 15 ccm Thionylchlorid 6 Min. und nach Zugabe von 15 ccm absol. Benzol weitere 1–2 Min. unter Rückfluß. Nach Abfiltrieren (Glasfritte G 3) von nicht umgesetztem **5** (20 mg) wurde 1 Min. gekocht, das Lösungsmittel i. Vak. (Badtemp. 30–40°) rasch verdampft und restliches Thionylchlorid durch Abdampfen mit wenig Benzol entfernt. Das kurze Zeit i. Vak. über KOH gehaltene, dunkelrote **8a** wurde sofort umgesetzt.

Umsetzung von 8a mit Aminosäure- und Peptidestern: Das in wenig absol. Chloroform aufgenommene **8a** (1 Mol HCl enthaltend) versetzte man entweder mit überschüss. Ester oder mit der ber. Menge sowie Triäthylamin in absol. Chloroform, hielt 15 Stdn. bei 20° und wusch mit n HCl und Wasser.

Actinocinyl-dianilid (8b): Die gewaschene Reaktionslösung aus **8a** (aus 50 mg **5**) und 100 mg Anilin wurde bis zur beginnenden Trübung eingeengt und aus Chloroform an saurem Kieselgel⁴⁰⁾ chromatographiert. Aus dem Chloroformeluat der Hauptzone kristallisierte sehr schwerlösliches, rotes **8b** vom Schmp. 310°. Ausb. 29 mg.

$C_{28}H_{22}N_4O_4$ (478.5) Ber. C 70.30 H 4.64 N 11.70 Gef. *) C 69.39 H 4.57 N 11.23

*) Getrocknet 5 Stdn. bei 70° i. Hochvak.

Actinocinyl-bis-[glycin-methylester] (8d): **8a** aus 110 mg **5** und 200 mg Glycin-methylester gaben, wie bei **8b** aufgearbeitet, 55 mg **8d**, gelbrote Nadeln vom Schmp. 291–293°.

(1)7-Chlor-1-descarboxy-actinocinyl-glycin-methylester: Aus einer bei der Darstellung von **8d** erhaltenen Nebenzone, deren Eluat mit n NaHCO₃, n HCl und Wasser gewaschen, filtriert und eingedampft wurde, erhielt man nach Umkristallisieren aus Chloroform/Petroläther 14 mg dunkelrote Kristalle vom Schmp. 256–259°.

$C_{18}H_{16}ClN_3O_5$ (389.9) Ber. N 10.76 Cl 9.1 OCH₃ 7.95

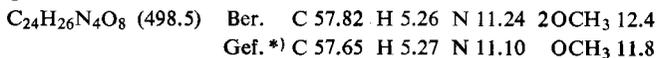
Gef. *) N 10.48 Cl 10.4 OCH₃ 6.95

*) Getrocknet 8 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

Actinocinyl-bis-[DL-alanin-methylester] (8c): Die gewaschene, eingeengte Reaktionslösung aus **8a** (aus 105 mg **5**), 300 mg DL-Alanin-methylester und Triäthylamin chromatographierte

⁴⁰⁾ Neutrales Kieselgel (Fa. Gebr. Herrmann, Köln) in 0.1 n HCl aufgeschlämmt, abgesaugt und bei 110° bis zur Fließfähigkeit getrocknet.

man aus Chloroform/Benzol (1 : 1) an saurem Kieselgel (oder an Cellulose mit LS I). **8c** aus dem mit n NaHCO₃, n HCl und Wasser gewaschenen Eluat der Hauptzone kristallisierte aus Chloroform/Petroläther in feinen, gelbroten Nadeln vom Schmp. 269–272° (Zers.), Ausb. 130 mg.



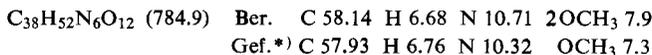
*^o) Getrocknet 7 Stdn. bei 70° i. Hochvak.

Actinocinyl-bis-[L-threonin-methylester] (**8e**): Den Eindampfrückstand der gewaschenen Reaktionslösung aus **8a** (aus 120 mg **5**), 180 mg *L*-Threonin-methylester und Triäthylamin chromatographierte man unter Nachwaschen mit Chloroform und Chloroform/Aceton (3 : 1) an einer 2.5 × 20-cm-Säule aus saurem Kieselgel⁴⁰) und den Inhaltstoff der Hauptzone mit LS II an Cellulose. Das aus der Hauptzone mit Methanol und Wasser eluierte und in Chloroform überführte **8e** (Chloroformlösung mit n NaHCO₃, n HCl und Wasser gewaschen) kristallisierte aus Chloroform/Cyclohexan. Schmp. 256–259° (Zers.). Ausb. 165 mg.



*^o) Getrocknet 8 Stdn. bei 75° i. Hochvak.

Actinocinyl-bis-[L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester] (**8f**): Den Eindampfrückstand der gewaschenen Reaktionslösung aus **8a** (aus 240 mg **5**), 450 mg *L*-Threonyl-D-allo-isoleucin-methylester²⁾ und 0.4 ccm Triäthylamin chromatographierte man mit LS III an einer 2.5 × 25-cm-Cellulosesäule. **8f** aus der Hauptzone kristallisierte aus Chloroform/Petroläther. Schmp. 107–110°. Ausb. 172 mg.



*^o) Getrocknet 5 Stdn. bei 70° i. Hochvak.

Actinocinyl-bis-[L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-methylester] (**11b**): Den Eindampfrückstand der gewaschenen Reaktionslösung aus **8a** (aus 50 mg **5**), 314 mg *L*-Threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-methylester und 0.2 ccm Triäthylamin chromatographierte man an einer 3 × 40-cm-Cellulosesäule mit LS V. Aus einer schwachen Zone mit gleichem R_F -Wert wie **11b** eluierte man mit Methanol und Wasser 4 mg amorphes, gelbes **11b**, das durch papierchromatographischen Vergleich (LS III, IV, V) mit authent. **11b** identifiziert wurde.

N-Methyl-L-valin: Zu 3.5 g (30 mMol) *L*-Valin in 60 ccm 0.5*n* methanol. KOH gab man 3.04 ccm frisch dest. Benzaldehyd und hydrierte nach 10 Min. mit 100 mg Palladiummohr (Degussa), bis die H₂-Aufnahme nach Verbrauch von 30 mMol (1/2–1 Sde.) sehr langsam wurde. Der Verdampfungsrückstand (i. Vak.) der vom Katalysator abfiltrierten Lösung wurde mit 25 ccm 98-proz. Ameisensäure und 6.6 ccm 40-proz. wäbr. Formaldehyd 10 Stdn. auf 100° erhitzt, die Lösung i. Vak. verdampft und der Rückstand in 30 ccm n HCl aufgenommen.

Den Verdampfungsrückstand dieser Lösung digerierte man mit 30–40 ccm Äthanol sowie 60 ccm Aceton, filtrierte das fast quantitativ ausgefallene KCl ab und hydrierte den Eindampfrückstand des Filtrates mit Palladium/A-Kohle (Degussa, 10% Pd) in 100 ccm 80-proz. Methanol oder Eisessig. Das beim Verdampfen der filtrierten Lösung hinterbliebene *N*-Methyl-L-valin wurde zweimal aus wenig Wasser und absol. Äthanol umkristallisiert. Farblose Säulen, Schmp. 297–300° (Zers.), $[\alpha]_D^{25}$: +32.4 ± 0.8° (c = 3.0 in 5*n* HCl), Ausb. 84%.



*^o) Getrocknet 6 Stdn. bei 60–70° i. Hochvak.

N-Methyl-L-isoleucin: Verfahren wie vorstehend. Farblose, oberhalb 300° schmelzende Kristalle mit $[\alpha]_D^{25}$: +44.7 ± 1° (c = 4.1 in 5*n* HCl). Ausb. 71%.



*^o) Getrocknet 6 Stdn. bei 60–70° i. Hochvak.

N-Methyl-*L*-threonin: Farblose Kristalle mit Schmp. 225—232° (Zers.) und $[\alpha]_D^{21}$: $-33 \pm 1.5^\circ$ ($c = 2.0$ in Wasser), $-16.7 \pm 1.5^\circ$ ($c = 3.4$ in 5*n* HCl). Ausb. 25%.

$C_5H_{11}NO_3$ (133.1) Ber. C 45.12 H 8.33 N 10.52 Gef.*) C 45.45 H 8.46 N 10.44
*) Getrocknet 6 Stdn. bei 60—70° i. Hochvak.

Formyl-D-allo-isoleucyl-L-prolin-benzylester (**18a**): Zu 12 g *Formyl-D-allo-isoleucin* (Schmp. 121°, $[\alpha]_D^{20}$: $-27 \pm 0.5^\circ$, $c = 1.7$ in Äthanol) und 19 g *L-Prolin-benzylester-hydrochlorid* ($[\alpha]_D^{20}$: $-44 \pm 1^\circ$, $c = 2.0$ in Wasser; Schmp. 145°) in 250 ccm Methylenchlorid gab man 10.3 ccm *Triäthylamin* und bei 0° 17 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in wenig Methylenchlorid und rührte 2 Stdn. bei 0° sowie 12 Stdn. bei 20°. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffs wurde mit *n* HCl, *n* NaHCO₃ und Wasser gewaschen, der i. Vak. erhaltene Eindampfrückstand in wenig Aceton aufgenommen und nach 1 Stde. bei 0° restlicher Dicyclohexylharnstoff entfernt. Verdampfen des Acetons und Umkristallisieren des Rückstandes aus Äthylacetat/Petroläther ergab **18a** als farblose Kristalle mit Schmp. 124—125° und $[\alpha]_D^{20}$: $-17.5 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2.0$ in Methanol). Ausb. 75%.

$C_{19}H_{26}N_2O_4$ (346.4) Ber. C 65.87 H 7.57 N 8.09 Gef.*) C 65.90 H 7.71 N 8.10
*) Getrocknet 6 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

Formyl-D-allo-isoleucyl-L-prolin (**18b**): Die methanolische Lösung von 4.3 g **18a** wurde mit Palladium/A-Kohle aushydriert und das nach Filtrieren und Verdampfen erhaltene **18b** aus Äthylacetat/Petroläther oder Benzol/Cyclohexan kristallisiert. Farblose Säulen mit Schmp. 134—135° und $[\alpha]_D^{20}$: $-14.2 \pm 0.5^\circ$ ($c = 3.2$ in Methanol). Ausb. 3.1 g.

$C_{12}H_{20}N_2O_4$ (256.3) Ber. C 56.25 H 7.87 N 10.92 Gef.*) C 56.23 H 7.99 N 10.83
*) Getrocknet 6 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

Formyl-D-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosin-benzylester (**19a**): 2.5 g **18b** und 2.1 g *Sarkosin-benzylester-hydrochlorid* (Schmp. 181—182°) in 70 ccm Methylenchlorid versetzte man mit 1.36 ccm *Triäthylamin* und bei 0° mit 2.2 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in wenig Methylenchlorid und rührte 2 Stdn. bei 0° sowie 12 Stdn. bei 20°. Weitere Aufarbeitung wie bei **18a**. — Der Eindampfrückstand der Acetonlösung wurde aus wenig Benzol an einer mit Benzol eingeschlammten 2.5 × 20-cm-Säule aus saurem Kieselgel chromatographiert. Nachwaschen mit Benzol entfernte Nebenprodukte, Chloroform brachte **19a** ins Eluat, das nach Waschen mit Wasser, Filtrieren und Eindampfen ein farbloses Harz mit $[\alpha]_D^{20}$: $-37 \pm 1^\circ$ ($c = 3.0$ in Methanol) ergab. Ausb. 70%.

$C_{22}H_{31}N_3O_5$ (417.5) Ber. C 63.27 H 7.48 N 10.07 Gef.*) C 63.21 H 7.49 N 9.99
Ber. Mol Ile 1.00 Pro 1.00 Sar 1.00
Gef. Mol Ile 0.97 Pro 1.03 Sar 0.97

*) Getrocknet 8 Stdn. bei 70° i. Hochvak.

D-allo-Isoleucyl-L-prolyl-sarkosin-benzylester-hydrochlorid (**19b**): 30 g **19a** in 80 ccm Benzylalkohol versetzte man mit 5.5 g HCl in 55 ccm Benzylalkohol, hielt 28 Stdn. bei 37° und verteilte über 3 Stufen zwischen Äther (oder Äthylacetat) und Wasser. Die filtrierte wäbr. Phase wurde i. Vak. bei 40° eingedampft und restliche Salzsäure durch mehrmaliges Abdampfen mit Wasser und Aceton verjagt. Nach Trocknen über KOH i. Vak. hinterblieb **19b** als weißes, hygroskopisches Pulver mit $[\alpha]_D^{20}$: $-106 \pm 3^\circ$ ($c = 1.8$ in Wasser). Ausb. 86%.

$C_{21}H_{32}N_3O_4Cl$ (426.0) Ber. C 59.19 H 7.57 Cl 8.31 N 9.87
Gef.*) C 59.09 H 8.00 Cl 8.75 N 10.20
Ber. Mol Ile 1.00 Pro 1.00 Sar 1.00
Gef. Mol Ile 0.95 Pro 1.05 Sar 0.94

*) Getrocknet 8 Stdn. bei 80° i. Hochvak.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-allo-isoleucyl-*L*-prolyl-sarkosin-benzylester (**20a**)

a) Mit *Dicyclohexylcarbodiimid*: Zu 9.0 g *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonin (**9a**)¹⁰ und 10.2 g **19b** in 200 ccm Methylenchlorid gab man 3.6 ccm *Triäthylamin* und bei 0° 5.6 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in wenig Methylenchlorid, rührte 2 Stdn. bei 0° sowie 12 Stdn. bei 20° und arbeitete auf wie bei **18a**. 1.5 g des nach Verdampfen des Acetons hinterbliebenen Rohproduktes (17 g) wurden aus wenig Benzol an einer mit Benzol eingeschlammten 1.5 × 15-cm-Säule aus saurem Kieselgel chromatographiert. Nachwaschen mit Benzol trennte eine Vorzone ab, Chloroform und Äthylacetat eluierten **20a**, das nach Verdampfen der filtrierten Lösung als gelbliches Pulver hinterblieb. $[\alpha]_D^{20}$: $-23 \pm 1^\circ$ ($c = 3.00$, in Methanol). Ausb. 66%.

$C_{40}H_{49}N_5O_{10}$ (759.9) Ber. C 63.20 H 6.50 N 9.23 Gef. *) C 62.87 H 6.63 N 9.20

Ber. Mol Thr 1.00 Ile 1.00 Pro 1.00 Sar 1.00

Gef. Mol Thr 0.70 Ile 0.88 Pro 0.89 Sar 0.81

*) Getrocknet 8 Stdn. bei 80° i. Hochvak.

b) Mit „Woodward's“ Reagenz: Die mit 0.41 ccm *Triäthylamin* neutralisierte Lösung von 1.17 g **9a** in 10 ccm Nitromethan rührte man bei 20° 7 Min. mit 0.76 g zerriebener *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-3'-sulfonat (Woodward's Reagenz³⁰), versetzte mit einer Mischung aus 1.3 g **19b**, 0.43 ccm *Triäthylamin* und 15 ccm Nitromethan, rührte 12 Stdn. bei 20° und dampfte i. Vak. bei 40° ein. Nach Waschen des in Chloroform gelösten Rückstandes mit *n* HCl und Wasser wurde das Rohprodukt aus Benzol an einer 2 × 12-cm-Aluminiumoxid-II-Säule chromatographiert, wobei Benzol den Vorlauf abtrennte und das mit Chloroform eluierte **20a** nach Waschen mit Wasser, Filtrieren und Verdampfen des Lösungsmittels als gelbliches Pulver hinterblieb. Ausb. 65%.

Actinocinyl-bis-[L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosin] (*Actinomycin C₃-des-säure*) (**12e**): Eine Lösung von 2.0 g **20a** in 30 ccm Methanol wurde mit Palladium/A-Kohle aushydriert (5 Mol H_2) (**20b**) und nach Abfiltrieren des Katalysators und Einengen auf 30 ccm mit 70 ccm 0.07 *m* Phosphatpuffer pH 7.2 versetzt. Dann gab man unter Rühren portionsweise 3.3 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* in 15 ccm Puffer hinzu, hielt dabei mit *n* NaOH stets bei pH 7.2 und rührte noch 12 Stdn. bei 20°. Die mit 2 *n* HCl angesäuerte und mit viel Wasser verdünnte Reaktionsmischung wurde mit Chloroform/Butanol (2:1) extrahiert, der Extrakt mit angesäuertem Wasser gewaschen, i. Vak. eingedampft und der Rückstand an einer 3.5 × 70-cm-Cellulosesäule (LS VI) aufgetrennt.

Das nach Zerschneiden der Säule mit Methanol und Wasser eluierte Hauptprodukt wurde dem mit Wasser verdünnten Eluat mit Chloroform/Butanol (2:1) entzogen, die organische Phase eingedampft und der in wenig Chloroform gelöste Rückstand an einer 3 × 15-cm-Säule aus saurem Kieselgel chromatographiert. Nachwaschen mit Chloroform und Chloroform/Aceton (4:1) entfernte die Kresotinsäure und wenig gelbe Nebenprodukte; mit Methanol und Wasser gelangte die Hauptmenge ins Filtrat, dessen Eindampfrückstand man in Chloroform löste und nach Waschen mit angesäuertem Wasser, Filtrieren und abermaligem Eindampfen in wenig Methanol aufnahm. Nach Zugabe von viel Äthylacetat fiel bei langsamem Abdampfen (40–50°) gelbrotes, amorphes **12e** aus. $[\alpha]_D^{20}$: $-94 \pm 3^\circ$ ($c = 0.2$ in Methanol). R_F -Werte in LS VI, VIII, XI wie die von nativem **12e**. Cyclohexan fällte die Reste aus der Mutterlauge. Ausb. 60%. Zur Analyse wurde aus Äthylacetat/Cyclohexan umgefällt.

$C_{52}H_{72}N_{10}O_{16}$ (1093.2) Ber. C 57.11 H 6.64 N 12.80 Äquiv.-Gew. 547

Gef. *) C 56.94 H 6.66 N 12.66 Äquiv.-Gew. 555**)

Ber. Mol Thr 2.0 Ile 2.0 Pro 2.0 Sar 2.0

Gef. Mol Thr 1.4 Ile 1.8 Pro 2.0 Sar 2.0

*) Getrocknet 8 Stdn. bei 100° i. Hochvak.

***) Potentiometrische Titration mit 0.05 *n* NaOH in Methanol/Wasser (1:1).

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*O*-[benzyloxycarbonyl-*N*-methyl-*L*-valyl]-*L*-threonyl-*D*-allo-isoleucyl-*L*-prolyl-sarkosin-benzylester (**21a**): Zu 11 g Benzyloxycarbonyl-*N*-methyl-*L*-valin in 65 ccm absol. Tetrahydrofuran gab man 7 g *N,N'*-Carbonyl-dimidazol³³⁾ und zusätzlich etwa 0.4 g bis zur Beendigung der CO₂-Entwicklung sowie anschließend 6.6 g **20a**. Bei 72–75° Badtemperatur wurde 75 Stdn. unter Rückfluß und Ausschluß von Luftfeuchtigkeit und Licht gekocht, dann i. Vak. eingedampft und der ölige Rückstand in 200 ccm Äthylacetat aufgenommen. Nach Durchschütteln mit 2 *n* HCl (Abtrennung von Imidazol) sowie mit *n* NaHCO₃ (Rückgewinnung von Benzyloxycarbonyl-*N*-methyl-*L*-valin) wusch man nochmals mit *n* HCl und Wasser, und erhielt nach Eindampfen i. Vak. 13 g bräunliches Harz. Dessen Lösung in 30 ccm Benzol/Chloroform (3:2) wurde an einer mit gleichem Lösungsmittel eingeschlammten 3.5 × 70-cm-Säule aus saurem Kieselgel innerhalb 48 Stdn. bei 120 ccm/Stde. Durchlaufgeschwindigkeit mit 6–7 l Benzol/Chloroform (3:2) chromatographiert. Extinktionsmessung (bei 366 m μ ; Eppendorf-Photometer) der 20–25-ccm-Fractionen gab eine Elutionskurve, nach der man die Einzelfractionen zu Sammelfractionen vereinigte. Diese wurden durch Hydrierung einer Probe, Oxydation in Methanol/0.07 *m* Phosphatpuffer pH 7.2 (1:1) mit 3 Mol Kaliumhexacyanoferrat(III) und Elektrophorese (LS XII) des mit Chloroform extrahierten Reaktionsproduktes bei pH 1.1 auf ihren Gehalt an **21a** untersucht.

Die filtrierte Äthylacetatlösung der an **21a** reichsten Sammelfraction wurde kurz mit *n* NaHCO₃, *n* HCl und Wasser gewaschen und durch Eindampfen i. Vak. sowie mehrmaliges Abdampfen mit Aceton zur Trockne gebracht. **21a** hinterblieb als ein weißes, lichtempfindliches, bei 60° sinterndes Pulver mit $[\alpha]_D^{20}$: $-8.1 \pm 0.5^\circ$ ($c = 0.8$ in Methanol). Ausb. 15%, die sich auf 25% erhöhte, wenn man weitere weniger reine, jedoch zur Herstellung von *Bis-seco-actinomycin* geeignete Fractionen hinzunahm.

C₅₄H₆₆N₆O₁₃ (1007.2) Ber. C 64.36 H 6.61 N 8.35 Gef. *) C 64.19 H 6.66 N 8.30
 Ber. Mol Thr 1.00 Ile 1.00 Pro 1.00 Sar 1.00 MeVal 1.00
 Gef. Mol Thr 0.70⁴¹⁾ Ile 1.00 Pro 1.00 Sar 0.97 MeVal 1.16

*) Getrocknet 5 Stdn. bei 60° i. Hochvak.

*Bis-seco-actinomycin C*₃ (**12a**): Eine Lösung von 1.0 g **21a** in 40 ccm Methanol wurde mit Palladium/A-Kohle aushydriert (6 Mol H₂) und nach Filtrieren mit 100 ccm 0.07 *m* Phosphatpuffer pH 7.2 versetzt. In die mit *n* NaOH stets auf pH 7.2 gehaltene Lösung gab man innerhalb 15 Min. 1.5 g Kaliumhexacyanoferrat(III) in 15 ccm Puffer, rührte noch 12 Stdn. bei 20° und extrahierte nach Verdünnen mit viel Wasser mit Butanol/Chloroform (1:1). Der i. Vak. erhaltene Eindampfrückstand (711 mg) des mit *n* HCl und Wasser gewaschenen Extraktes wurde an einer 3.5 × 50-cm-Cellulosesäule (LS VI) chromatographiert, die Hauptzone herausgeschnitten und das daraus mit Methanol und Wasser eluierte Produkt dem Eluat mit Butanol/Chloroform (1:1) entzogen. Den Eindampfrückstand des mit angesäuertem Wasser gewaschenen Extraktes adsorbierte man aus wenig Chloroform an einer 2 × 8-cm-Säule aus saurem Kieselgel, wusch zur Entfernung der Kresotinsäure mit Chloroform/Aceton (4:1) und Aceton nach und eluierte das rote **12a** mit Methanol und danach abwechselnd Methanol und 0.07 *m* Na₂HPO₄. Der i. Vak. erhaltene Eindampfrückstand des Eluates wurde nach Aufnehmen in Butanol/Chloroform (1:1) mehrmals mit 0.1 *n* HCl gewaschen, filtriert, i. Vak. zur Trockne gedampft und der Rückstand in möglichst wenig Methanol gelöst. Beim Versetzen mit viel Äthylacetat, langsamem Einengen bei 40–45° und Abkühlen fiel das Dihydrochlorid von **12a** als gelbrotes Pulver aus. $[\alpha]_D^{20}$: $-62 \pm 2^\circ$ ($c = 0.15$ in Methanol). Ausb. 425 mg (61%). *R_F*-Werte in LS VI, VIII, IX wie die von nativem **12a**. Zur Analyse wurde nochmals unter Wasserausschluß umgefällt.

⁴¹⁾ Ein Teil des Threonins wird bei der zur Aminosäurebestimmung notwendigen Totalhydrolyse zerstört.

$C_{64}H_{96}N_{12}O_{18}] 2 Cl$ (1392.4) Ber. C 55.21 H 6.95 Cl 5.09 N 12.07 Säureäquiv. 4.0
 Gef.*) C 55.44 H 7.20 Cl 3.95 N 12.10 Säureäquiv. 3.8**)
 Ber. Mol Thr 2.0 Ile 2.0 Pro 2.0 Sar 2.0 MeVal 2.0
 Gef. Mol Thr 1.2⁴¹⁾ Ile 1.9 Pro 2.0 Sar 2.0 MeVal 1.7

*) Stark hygroskopisch. Getrocknet 10 Stdn. bei 70–80° i. Hochvak.

**) Potentiometrische Titration mit 0.05 *n* NaOH in Methanol/Wasser (1:1).

Actinomycin C₃ (13a): Unter Feuchtigkeitsausschluß versetzte man 300 mg des *Dihydrochlorides* von 12a in 1500 ccm absol. Methylenchlorid bei 0° mit 80 mg (0.1 ccm) *Tributylamin*, dann mit 0.1 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* und nach 10 Min. bei 0° mit 0.25 ccm *Tributylamin*, erwärmte 15 Min. auf 3° und hielt 30 Min. bei 20°. Danach wurde wieder auf 0° gekühlt, mit 0.1 ccm *Chlorameisensäure-äthylester* versetzt und weiter genau wie oben verfahren. Dieses wiederholte man noch zweimal, zuletzt mit der doppelten Menge *Chlorameisensäure-ester* und Base. Nach 12 Stdn. bei 18° wurde 0.1 ccm *Tributylamin* hinzugegeben, 3 Stdn. auf 37° erwärmt und die eingeeengte, mit *n* HCl, *n* NaHCO₃ und Wasser gewaschene Lösung zur Trockne verdampft. Chromatographie des Rückstandes an einer 3.5 × 35-cm-Cellulosesäule (LS IV) gab zwei gegen *St. aureus* und *B. subtilis* antibiotisch wirksame Zonen, die geschnitten und mit Methanol und Wasser eluiert wurden. Die aus den Eluaten nach Verdünnen mit Wasser gewonnenen Chloroformextrakte wusch man dreimal mit *n* NaHCO₃, Wasser, *n* HCl und wiederum Wasser, adsorbierte deren Eindampfrückstände an zwei mit Benzol eingeschlammten 1 × 2-cm-Aluminiumoxid-II-Säulen und eluierte mit Äthylacetat die wirksamen Anteile der Rohprodukte. Die Äthylacetatlösungen wurden nach Filtration über zwei 1 × 2-cm-Säulen aus saurem Kieselgel mit *n* HCl sowie Wasser gewaschen, filtriert und i. Vak. eingedampft. Die in wenig Benzol gelösten und mit einem Tropfen Methanol versetzten Rückstände kristallisierten bei vorsichtiger Zugabe von Cyclohexan (50°), und man erhielt aus der einen auf Cellulose langsamer laufenden Fraktion 9 mg (3.2%) *Actinomycin C₃* (13a). Dieses wurde zusammen mit der Ausbeute aus zwei weiteren Ansätzen zweimal aus Benzol/Methanol/Cyclohexan umkristallisiert. Rote Nadeln mit Schmp. 238–241° und $[\alpha]_D^{25}$: $-286 \pm 10^\circ$ (*c* = 0.1 in Methanol).

$C_{64}H_{90}N_{12}O_{16}$ (1283.5) Ber. C 59.90 H 7.08 N 13.09 Gef.*) C 60.31 H 7.29 N 12.78
 Ber. Mol Thr 2.0 Ile 2.0 Pro 2.0 Sar 2.0 MeVal 2.0
 Gef. Mol Thr 1.3⁴¹⁾ Ile 1.9 Pro 2.0 Sar 2.0 MeVal 1.9

Die andere, etwa in gleicher Menge entstandene, bakteriostatisch wirksame Fraktion wurde ebenfalls wie oben zweimal umkristallisiert. Rote Nadeln mit Schmp. 243–245° und $[\alpha]_D^{25}$: $-210 \pm 10^\circ$ (*c* = 0.1 in Methanol).

Gef.*) C 59.50 H 7.21 N 12.75

Gef. Mol Thr 1.3 Ile 1.9 Pro 2.0 Sar 2.0 MeVal 1.9

*) Getrocknet 24 Stdn. bei 120° i. Hochvak. Hartnäckiger Lösungsmittleinschluß.

[427/66]