

worden waren, lag nahe, Actinomycine durch veresternde Cyclisierung synthetischer Actinomycinsäuren darzustellen und den schwierigsten Schritt dieser Synthese, die Cyclisierung, zunächst an Actinomycinsäuren zu studieren, die aus nativen Actinomycinen stammen.

Als daher deren Alkalihydrolyse zu Actinomycinsäuren eingehender untersucht wurde^{7,8)}, ergab sich, daß ein erheblicher Anteil durch Abbau des Chromophors verloren geht und die Peptidringe nicht nur durch Verseifung der Lactongruppen geöffnet werden, sondern auch durch β -Eliminierung. Dabei entstehen Actinocinyl-bis-pentapeptide, die in einer oder beiden Peptidketten α -Amino-crotonsäure statt L-Threonin enthalten. Das Verseifungsprodukt ist ein chromatographisch schwer trennbares Gemisch mit relativ niedrigem Gehalt an Actinomycinsäure (z. B. **2a** oder **2b**).

Die Zerstörung des Chromophors wird weitgehend unterbunden, wenn man die durch katalytische Hydrierung leicht zugänglichen Dihydro-actinomycine zur Lactonspaltung einsetzt⁷⁾, und die β -Eliminierung unterbleibt fast ganz bei Spaltung mit methanol. 2*n* Natriummethylat. Unter diesen Bedingungen erhielt Döring⁸⁾ erstmals Actinomycin C₃-säure (**2b**), die frei von α -Amino-crotonsäure enthaltenden Actinocinyl-bis-pentapeptiden war, trotz chromatographischer Reinigung jedoch nicht den ϵ_{445} -Wert synthet. Actinomycin C₃-säure (**2b**)⁹⁾ erreichte.

Zu besseren Ergebnissen kamen wir mit 99,2proz. methanol. 4*n* Natriummethylat ohne chromatographische Reinigung des Verseifungsproduktes. Die Dihydroverbindung von **1a** gab so zu 92% eine Actinomycin C₁-säure mit $\epsilon_{445} = 24100$ und $[\alpha]_D^{25} : -84^\circ$ (synthet. **2a**¹⁰⁾: $\epsilon_{445} = 26200$; $[\alpha]_D^{25} : -117^\circ$, Methanol).

Laut ϵ_{445} -Wert könnte ein derartiges Präparat 90% **2a** enthalten, nicht jedoch der spezif. Drehung nach, die dann bei -105° liegen müßte statt bei -84° . Diese Diskrepanz führen wir auf partielle Racemisierung der *N*-Methyl-L-valinreste zurück. Sie würde auch erklären, warum das Diazomethan-Methylierungsprodukt unseres Actinomycin C₁-säure-Präparates im Ring-Papierchromatogramm neben der Hauptzone (mit 82% des Methylierungsproduktes) drei schwächere, schneller wandernde Zonen (mit den restlichen 18%) zeigt.

Mit Präparaten, die nach diesen Befunden etwa 74% **2a** enthielten, haben wir in über 200 Ansätzen die Recyclisierung zu **1a** versucht. Dabei war zu berücksichtigen, daß die Carboxyle in Gegenwart der zu veresternden Hydroxyle aktiviert werden müssen und die Cyclisierung davon abhängt: 1. wieweit sich Konformationen ausbilden können, in denen der enge 16gliedrige Peptidlactonring weitgehend präformiert ist, 2. wieweit in derartigen Konformationen die Threoninhydroxyle den aktivierten Carboxylen zugänglich sind und 3. in welchem Umfang andere Reaktionen mit der Cyclisierung konkurrieren.

Bei der Bis-*seco*-actinomycin C₃-Synthese²⁾ ließ sich die Veresterung der Threoninhydroxyle von Actinocinyl-bis-L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosin mit Ben-

⁷⁾ A. Boiteux, Diplomarb., Univ. Göttingen 1957.

⁸⁾ G. Döring, Dissertat., Univ. Göttingen 1960.

⁹⁾ H. Lackner, Dissertat., Univ. Göttingen 1960.

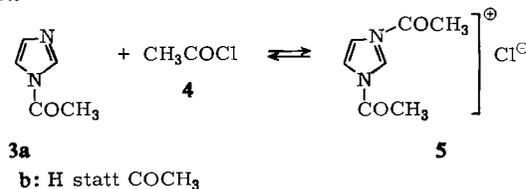
¹⁰⁾ H. Brockmann und H. Lackner, Naturwissenschaften 51, 384 (1964).

zyloxy-carbonyl-*N*-methyl-*L*-valin allein mit Carbonyldiimidazol erzwingen. Daher lag nahe, mit diesem Reagenz auch die cyclisierende Veresterung von **2a** zu versuchen. Erfolg hatten wir weder mit Carbonyldiimidazol noch mit Thionyl-diimidazol, was daran liegen konnte, daß auch bei ausreichender Vororientierung der Peptidketten die Veresterung des Threoninhydroxyls mit den voluminösen Azolidgruppen durch Nachbargruppen verhindert wird.

Um zu sehen, wie weit sterische Verhältnisse die Veresterung mit einem niedermolekularen, weniger sperrigen Säurederivat beeinflussen, wurde **2a** in Tetrahydrofuran mit Acetylchlorid/Pyridin umgesetzt. Überraschend zeigte das Ringchromatogramm des Reaktionsproduktes neben mehreren, schneller als **2a** wandernden Zonen eine schwache, im Plattentest gegen *B. subtilis* wirksame mit dem R_F -Wert von Actinomycin C₁ (**1a**).

In der Annahme, daß über ein gemischtes Essigsäure-**2a**-anhydrid lactonisiert wird, haben wir zunächst die Bedingungen beim Umsetzen von **2a** mit Pyridin und Acetylchlorid variiert und dann Base, Säurederivat und Lösungsmittel ausgewechselt: Pyridin gegen Imidazol, Acetylimidazol, 1,2,4-Triazol, Tributylamin und Triäthylamin; Acetylchlorid gegen Acetanhydrid, Isovalerylchlorid, Thionylchlorid, Phosgen und Chlorameisensäure-äthylester; Tetrahydrofuran gegen Dioxan, Acetonitril, Methylenchlorid und Nitromethan.

Vom wenig **1a** liefernden **2a**/Phosgen/Triäthylamin-Gemisch abgesehen, fanden wir **1a** ausschließlich in Ansätzen mit Imidazol (**3b**) und Isovalerylchlorid, Acetanhydrid oder besser Acetylchlorid (**4**). Das aktivierende Reagenz ist im letzten Fall nicht Acetylimidazol (**3a**), denn dieses gab mit **2a** in Tetrahydrofuran kein **1a**; wohl aber, wenn man nachträglich **4** zusetzte. Geringer **4**-Überschuß (Molverhältnis $4/3a = 1.1 - 1.5$) war günstig, größerer verhinderte die Cyclisierung. Wir nehmen an, daß aus **3a** und **4** das 1,3-Diacetyl-imidazoliumchlorid (**5**) entsteht, das mit den Carboxylen von **2a** unter Bildung eines gemischten Essigsäure-Actinomycin C₁-säureanhydrides reagiert.



Bei diesen Vorversuchen ließen wir das beim Vereinigen von Imidazol und Acetylchlorid bzw. Isovalerylchlorid ausgefallene Imidazoliumchlorid in der Reaktionslösung. Bei Versuchen, die Cyclisierung von **2a** zu **1a** mit **3a/4** optimal zu machen, wurde zunächst 1 Mol **4** in Tetrahydrofuran mit 2 Mol **3b** zu **3a** umgesetzt, die vom Imidazoliumchlorid befreite, mit 1.5 Mol Acetylchlorid versetzte Lösung von einem hellgelben Niederschlag dekantiert und zu **2a** in Tetrahydrofuran gegeben.

Die besten Ausbeuten lieferten Ansätze, die an **2a** 2 mmolar, an **3a** und **4** 0.9 bzw. 1.35 molar waren und 50–100 Min. bei 55° gehalten wurden. Auffällig war, daß bei zehnfach kleinerer **3a**- und **4**-Konzentration verschwindend wenig **1a** entstand, obgleich der Überschuß gegen **2a** auch dann noch groß war.

Das partialsynthetische Actinomycin C₁ (**1a**) — aus dem Reaktionsprodukt durch Chromatographie aus Äthylacetat an Aluminiumoxid IV und durch präparative Ring-Papierchromatographie (Butylacetat/10proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat) abgetrennt — kristallisierte aus Äthylacetat/Ligroin in roten Bipyramiden vom Schmp. 247–248° korr. und wurde durch C,H,N-Werte, Aminosäure-Analyse, physikalische Daten und bakteriostatische Wirksamkeit gegen *B. subtilis* mit nativem Actinomycin-C₁ identifiziert. Die Ausbeute lag bei 18%. Da das eingesetzte Actinomycin C₁-säure-Präparat nur 74% **2a** enthielt, waren aus reinem **2a** etwa 25% **1a** zu erwarten; tatsächlich lieferte synthet. **2a** 25–30% **1a**^{10,11}).

Ob die *N*-Methyl-L-valinreste von **2a** auch mit dem Threoninhydroxyl der anderen Peptidkette oder gar mit dem anderer **2a**-Moleküle reagieren, bleibt zu klären. Am meisten wird die **1a**-Ausbeute offenbar durch Acetylierung der Threoninhydroxyle geschmälert. Daß unter geeigneten Bedingungen die Cyclisierung mit der Acetylierung der Threoninreste konkurrieren kann, liegt vielleicht daran, daß deren Hydroxyle dem voluminösen **5** sterisch weniger zugänglich sind als die Carboxyle der *N*-Methylvalinreste; und das Ausbleiben der Cyclisierung bei größerem Acetylchlorid-Überschuß oder zehnfach kleinerer **3a**- bzw. **4**-Konzentration, daran, daß dann die Threoninhydroxyle bevorzugt durch Acetylchlorid verestert werden, im ersten Fall, weil dieses überschüssig ist, im zweiten, weil sich in der verdünnteren Lösung nur wenig **5** bildet.

Die mit der Recyclisierung von nativem **2a** erreichte Actinomycin-Partialsynthese liegt späteren, über Actinomycinsäure laufenden Totalsynthesen von Actinomycinen und deren Strukturvarianten zugrunde^{9–14}), von denen einige in der folgenden Mitteilung eingehender beschrieben werden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und den Farbenfabriken Bayer AG, Werk Elberfeld, danken wir für Unterstützung unserer Arbeit.

Beschreibung der Versuche

Actinomycin C₁-säure (2a): Eine Suspension von 500 mg *Actinomycin C₁* (**1a**) und 400 mg Pd-Kohle-Katalysator (10% Pd) in 20 ccm Methanol schüttelte man 30 Min. unter *Wasserstoff* und filtrierte die hellgelb gewordene Lösung unter *Wasserstoff* durch eine G4-Fritte in eine eisgekühlte Mischung aus 100 ccm 5 *n* methanol. *Natriummethylat* und 1 ccm Wasser. Nach 5 Stdn. versetzte man die dunkelbraune Lösung unter *Wasserstoff* bei 0° mit 105 ccm 5 *n* HCl, gab den entstandenen, NaCl enthaltenden, hellgelben Brei in 400 ccm Wasser, extrahierte die anfangs gelbe, dann an der Luft rot gewordene Lösung (Luftoxydation der Dihydro-actinomycin C₁-säure) erschöpfend mit Chloroform und verdampfte die vereinigten, zweimal mit 5proz. wäbr. Natriumchlorid durchgeschüttelten Auszüge i. Vak.

¹¹) *Farbenfabriken Bayer AG*. (Erf. *H. Brockmann*, *J. H. Manegold* und *H. Lackner*), D. A. S. 1 172 680 K1 12 p., C. 1965, 3924.

¹²) *H. Brockmann* und *H. Lackner*, *Tetrahedron Letters* [London] 1964, 3523; *H. Brockmann* und *H. Lackner*, *Tetrahedron Letters* [London] 1964, 3517; *H. Brockmann* und *H. Lackner*, *Naturwissenschaften* 51, 435 (1964).

¹³) *H. Brockmann* und *F. Seela*, *Tetrahedron Letters* [London] 1965, 4803.

¹⁴) *H. Brockmann* und *W. Schramm*, *Tetrahedron Letters* [London] 1966, 2331.

Die Verdampfungsrückstände aus acht Ansätzen löste man in 30 ccm Chloroform, versetzte unter Rühren mit 270 ccm Petroläther, fällte den abzentrifugierten Niederschlag nochmals in gleicher Weise um und erhielt so 3.8 g amorphes, gelbes **2a** mit $[\alpha]_D^{25}$: $-84 \pm 6^\circ$ ($c = 0.2$, Methanol); $-58 \pm 6^\circ$ ($c = 0.2$, Aceton), das im Ringchromatogramm (Butanol/Butylacetat/3proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat¹⁵⁾) (7 : 3 : 10) nur eine Zone bildete. λ_{\max} (ϵ) (Methanol): 445 (24 100); 426 (23 600); 238 $m\mu$ (42 300). Die IR-Spektren von **1a** und **2a** unterscheiden sich nur in der Lage der CO-Bande (1745/cm bei **1a**, 1735/cm bei **2a**).

$C_{62}H_{90}N_{12}O_{18}$ (1291.5) Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Pro 2.0 Sar 2.0 MeVal 2.0
Gef.¹⁶⁾ Mol Thr 1.3¹⁷⁾ Val 1.8 Pro 2.0 Sar 1.9 MeVal 1.9
Äquiv.-Gew. Ber. 645.8 Gef.*¹⁾ 639

*¹⁾ Potentiometrische Titration in Glykolmonomethyläther/Wasser (4:1) mit 0.05 *n* NaOH.

Actinomycin C₁ (**1a**) aus *Actinomycin C₁-säure* (**2a**): Zu 24.5 g (0.36 Mol) Imidazol in 300 ccm wasserfreiem Tetrahydrofuran gab man unter Rühren 12.8 ccm (0.18 Mol) *Acetylchlorid*, rührte eine Stde. bei 55°, saugte den farblosen Niederschlag ab, versetzte das Filtrat unter Rühren bei 55° mit 19.2 ccm (0.27 Mol) *Acetylchlorid* und rührte das Gemisch noch eine Stde. bei gleicher Temp. 167 ccm der von einem hellgelben Niederschlag dekantierten Lösung gab man zu 500 mg **2a** in 35 ccm wasserfreiem Tetrahydrofuran, hielt 100 Min. bei 55°, goß in eine Mischung aus 500 ccm Eiswasser, 50 ccm 2 *n* HCl und 50 ccm 25proz. wäbr. Natriumchlorid und extrahierte mit Chloroform. Der Chloroformauszug wurde mit 0.1 *n* HCl und dann zweimal mit 5proz. wäbr. Natriumchlorid durchgeschüttelt, verdampft und die Lösung des Rückstandes in 60 ccm Benzol auf eine 3.6 × 20-cm-Säule aus Aluminiumoxid IV gegeben. Beim Nachwaschen mit 500 ccm Äthylacetat wanderten 27% der auf die Säule gegebenen Menge (gemessen mit Photometer „Eppendorf“ bei 436 $m\mu$) ins Filtrat (Verdampfungsrückstand des Eluates: Äthylacetatfraktion). Dann wurden mit 400 ccm Aceton 4% und mit 400 ccm Methanol 46% der auf die Säule gegebenen Menge eluiert, der Rest blieb in einer gelben Zone am oberen Rand der Säule.

Das Ring-Papierchromatogramm (Butylacetat/10proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat) der Äthylacetatfraktion zeigte eine Hauptzone mit dem R_F -Wert von **1a** und eine schneller wandernde Nebenzone. Die Acetonfraktion gab vier Zonen, von denen die langsamste den R_F -Wert von **1a** zeigte. Von den fünf Zonen der Methanolfraktion blieb die langsamste in der Nähe des Startkreises, während die schnellste fast den R_F -Wert von **1a** erreichte.

Die Äthylacetatfraktionen aus zwei Ansätzen mit 500 mg **2a** wurden auf 16 Bögen (Schleicher & Schüll 2043 b) im System Butylacetat/10proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat im Ringverfahren chromatographiert. Den Verdampfungsrückstand des Methanoleuates der Hauptzone gab man in Benzol gelöst auf eine 2.2 × 8-cm-Säule aus Aluminiumoxid IV und wusch mit Äthylacetat nach, wobei nur eine schmale, braune Zone am oberen Rand der Säule blieb. Das beim Verdampfen des Äthylacetateluates hinterbleibende **1a** kristallisierte aus Äthylacetat/Ligroin (80–100°) in roten Bipyramiden vom Schmp. 247–248° korr. (Zers.). Ausb. 176 mg, $[\alpha]_D^{25}$: $-327 \pm 15^\circ$ ($c = 0.2$, Methanol); $-294 \pm 15^\circ$ ($c = 0.2$, Aceton). λ_{\max} (ϵ) (Methanol): 443 (25 000), 241 $m\mu$ (34 000), [natives **1a** $[\alpha]_D^{25}$: $-331 \pm 5^\circ$ ($c = 0.2$, Methanol); $-288 \pm 5^\circ$ ($c = 0.2$, Aceton); λ_{\max} (ϵ) (Methanol): 443 (25 100); 241 $m\mu$ (34 100)]. IR-Spektrum identisch mit dem von nativem *Actinomycin C₁*. Im Ring-Papierchromatogramm a) Butylacetat/10proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat; b) Butylacetat/Dibutyläther/3proz. wäbr. Natrium-

¹⁵⁾ Alle in dieser Arbeit verwendeten Natrium-*m*-kresotinat-Lösungen waren mit *m*-Kresotinsäure gesättigt.

¹⁶⁾ Aminosäurebestimmung nach H. Brockmann und J. H. Manegold, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **343**, 86 (1965).

¹⁷⁾ Ein Teil des Threonins wird bei der zur Aminosäurebestimmung erforderlichen Totalhydrolyse zerstört.

β -sulfonat (3:1:10); c) Butanol/Dibutyläther/Dipropyläther/7proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat (2:1:7:10) gleiche R_F -Werte wie natives Actinomycin C₁.

C₆₂H₈₆N₁₂O₁₆ (1255.4) Ber. C 59.31 H 6.91 N 13.39 Gef.*) C 59.21 H 7.20 N 13.13

*) 14 Stdn. bei 115° i. Hochvak. getrocknet.

Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Pro 2.0 Sar 2.0 MeVal 2.0

Gef.¹⁶⁾ Mol Thr 1.3 Val 1.9 Pro 2.0 Sar 2.0 MeVal 2.0

Bakteriostatische Wirksamkeit gegen *B. subtilis* bis zur Verdünnung 1 : 5.8 · 10⁶ (0.17 µg/ccm).
Actinomycin C₃: 1 : 7.4 · 10⁶ (0.13 µg/ccm).

[262/67]