

Hans Brockmann und Helmut Lackner

Actinomycine, XXXIII¹⁾; Synthesen von Actinomycinen und actinomycin-ähnlichen Chromopeptiden, VI²⁾

Totalsynthese der Actinomycine C₁, C₂, i-C₂ und C₃ über *N*-[2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-pentapeptidlactone; ein weiterer Beweis für die Bis-pentapeptid-Struktur der Actinomycine

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 17. Januar 1968)

Die *N*-[2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-Derivate **6** und **9** von *cyclo*-[L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal-O_{Thr}] und *cyclo*-[L-Thr-D-allo-L-Pro-Sar-L-MeVal-O_{Thr}] werden dargestellt und oxydativ zu den *iso*-Actinomycinen C₁ (**7**) und C₃ (**10**) bzw. den *aniso*-Actinomycinen C₂ (**8**) und i-C₂ (**11**) kondensiert. Damit ist auch durch Synthese bewiesen, daß die Actinomycine zwei Pentapeptidlacton-Gruppen enthalten. — Zwei Derivate (**14a** und **15a**) der Actinomycin C₁-säure (**13b**) werden synthetisiert, in denen entweder die α- oder die β-Peptidkette zum Peptidlactonring geschlossen ist.

Daß die zehn Aminosäuren der Actinomycine zu zwei Pentapeptidlactonringen gehören und nicht zu einem Decapeptid-dilactonring, ist zuerst durch oxydativen Abbau der Actinomycine C₂ (**8**) und C₃ (**10**) zu *N*-Oxal-*cyclo*-[L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-L-valyl-O_{Thr}] bewiesen worden^{1,3)}.

Im folgenden berichten wir ausführlicher über den durch Synthese erbrachten Beweis für die Bis-pentapeptid-Struktur der Actinomycine⁴⁾.

Die beiden zuerst entwickelten Verfahren zur Totalsynthese von Actinomycinen über ein Bis-*seco*-actinomycin⁵⁾ oder eine Actinomycinsäure²⁾ waren für diesen Beweis unbrauchbar. Denn bei beiden werden in letzter Stufe zwei am Chromophor benachbarte Peptidketten mit cyclisierenden Reagenzien behandelt, so daß Ringschluß in zwei Richtungen möglich ist: 1. Innerhalb jeder Kette zu zwei Pentapeptidlactonringen und 2. zwischen beiden Ketten zu einem Decapeptid-dilactonring. Ob das synthetische Actinomycin ein Actinocinyl-bis-pentapeptidlacton ist oder ein Decapeptid-dilacton-Derivat, das den Chromophor als Brücke enthält, bleibt daher offen.

1) XXXII. Mitteil.: H. Brockmann und P. Boldt, Chem. Ber. **101**, 1940 (1968).

2) V. Mitteil.: H. Brockmann und H. Lackner, Chem. Ber. **101**, 1312 (1968).

3) H. Brockmann und P. Boldt, Naturwissenschaften **50**, 19 (1963).

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

5) H. Brockmann und H. Lackner, Chem. Ber. **100**, 353 (1967).

Beweisend wird die Synthese dagegen, wenn man — nach Verfahren D des früher erörterten Actinomycin-Syntheseschemas⁵⁾ — die Cyclisierung vor die oxydative Kondensation legt und zwei mit vorgefertigter Pentapeptidlacton-Gruppe verknüpfte Moleküle 2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure (**3c**) miteinander kondensiert. Um so aus den leicht oxydablen und daher in situ zu kondensierenden Pentapeptidlacton-Derivaten **6** und **9** Actinomycin C₁ (**7**) bzw. Actinomycin C₃ (**10**) zu synthetisieren, brauchten wir als stabile Vorprodukte von **6** und **9** die *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-pentapeptidlactone **5a** und **5b**.

Synthese der *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-pentapeptidlactone **5a** und **5b**

Für die Synthese von **5a** und **5b** kamen in Frage: 1. Verknüpfung eines vorgefertigten Pentapeptidlactons⁶⁾ mit 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure (**3b**) und 2. Aufbau des Pentapeptidlactons am **3b**-Rest als *N*-terminaler Schutzgruppe. Für uns war naheliegend, **5a** und **5b** nach 2. darzustellen und zwar durch Cyclisierung von **4c** und **4d** mit dem zur Lactonisierung der Actinomycinsäuren bewährten Acetylchlorid/Acetylimidazol^{2,7)}. Denn die Benzylester von **4c** und **4d** waren schon bekannt²⁾, und mit dem **3b**-Rest wird von Anfang an eine auch unter den relativ rauen Lactonisierungsbedingungen stabile *N*-terminale Schutzgruppe verwendet, die sich später ohne Gefährdung des Lactonringes direkt in den Actinocinylrest überführen läßt. **4c** und **4d** erhielten wir aus den Methylestern **4a** und **4b**, die in besserer Ausbeute zugänglich sowie leichter zu verseifen sind als die Benzylester und diesen analog nach **1—4** dargestellt wurden.

Die *N*-Formyl-tripeptide **1a** und **1b**²⁾ gaben bei Kupplung mit *N*-Methyl-L-valinmethylester und Dicyclohexylcarbodiimid zu 60–65% **2a** und **2b** und diese bei Entformylierung mit 1,5*n* methanol. Salzsäure zu 90% die Tetrapeptid-methylesterhydrochloride **2c** und **2d**. Deren Verknüpfung mit *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonin (**3a**)⁸⁾ unter Verwendung von Woodward's Reagenz⁹⁾ führte in 65proz. Ausbeute zu den geschützten Pentapeptidestern **4a** und **4b** und deren milde Verseifung zu amorphem **4c** und **4d**.

Bei der Verseifung wird der *N*-Methyl-L-valinrest von **4a** und **4b** nicht nennenswert racemisiert. Denn Hydrierung von **4c** zu **4f** und dessen Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) gab zu 85% Actinomycin C₁-säure (**13b**) mit $[\alpha]_D^{20}$: $-123 \pm 3^\circ$ ($c = 0.25$ in Methanol) [synthetische Actinomycin C₁-säure aus dem hydrogenolytisch gespaltenen Benzylester von **4c**: $[\alpha]_D^{20}$: $-121 \pm 3^\circ$; Actinomycin C₁-säure mit *N*-Methyl-D-valin statt *N*-Methyl-L-valin²⁾: $[\alpha]_D^{20}$: $-46 \pm 2^\circ$].

Racemisierung des *N*-Methyl-L-valinrestes hätte wahrscheinlich die **5a**- bzw. **5b**-Ausbeute bei der Lactonisierung wenig geschmälert. Denn bei der Cyclisierung einer Actinomycin-C₁-säure, die *N*-Methyl-D-valin statt *N*-Methyl-L-valin enthielt, war die Actinomycin C₁-Aus-

6) H. Brockmann und H. Bujard, Naturwissenschaften **49**, 515 (1962).

7) H. Brockmann und J. H. Manegold, Chem. Ber. **100**, 3814 (1967); Naturwissenschaften **51**, 383 (1964).

8) H. Brockmann, H. Lackner, R. Mecke, G. Troemel und H.-S. Petras, Chem. Ber. **99**, 717 (1966).

9) R. B. Woodward, R. A. Olofson und H. Mayer, J. Amer. chem. Soc. **83**, 1010 (1961).

beute praktisch ebenso groß wie bei der Cyclisierung von Actinomycin C₁-säure (**13b**); offenbar deshalb, weil: 1. Der *N*-Methyl-valinrest unter den Lactonisierungsbedingungen relativ schnell racemisiert wird und 2. die Cyclisierung weitgehend stereoselektiv ist²⁾.

4c und **4d** — mit Acetylchlorid/Acetylimidazol in gleicher Weise umgesetzt wie Actinomycinsäuren bei der Lactonisierung zu Actinomycinen²⁾ — gaben ein blaßgelbes, komponentenreiches Reaktionsprodukt, aus dem durch Vortrennung an Aluminiumoxid IV und Durchlaufchromatographie der dabei angefallenen „Äthylacetatfraktion“ an saurem Kieselgel (Benzol/Chloroform, Extinktionsmessung der Fraktionen bei 366 m μ) **5a** und **5b** in 20proz. Ausbeute abgetrennt wurden.

Chromatographie der „Äthylacetatfraktion“ an Cellulose (Butanol/Dibutyläther/10proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat, 3 : 7 : 10) und Schichtchromatographie der Hauptfraktion an neutralem Fluoreszenz-Kieselgel erhöhte die Ausbeute auf 30%; ein Verfahren, das außerdem schneller und bequemer ist als die Durchlaufchromatographie, weil die **5a**- bzw. **5b**-Zone durch Löschung der Kresotinat- bzw. Kieselgel-Fluoreszenz sichtbar wird. Um den **5a**- oder **5b**-Gehalt einer Zone zu ermitteln, wurde eine Probe nach Hydrierung mit Kaliumhexacyanoferrat(III) zum Actinomycin oxydiert und dessen Menge papierchromatographisch bestimmt.

5a und **5b**, farblose, allmählich durchkristallisierende Harze, halten hartnäckig Lösungsmittel fest und wurden durch Umfällen aus Chloroform/Benzol/Petroläther in Pulver verwandelt. Sie sind bakterio-statisch unwirksam. Ihre spezif. Drehung — $[\alpha]_D^{20}$: $-14.5 \pm 1.5^\circ$ für **5a** und $[\alpha]_D^{20}$: $+8.5 \pm 1^\circ$ für **5b**, beide mit $c = 0.7$ in Methanol — ist verglichen mit der von Actinomycinen bemerkenswert niedrig; die Lactoncarbonylgruppe absorbiert ähnlich wie in Actinomycinen bei $\tilde{\nu} = 1740/\text{cm}$. Das osmomtrisch in Chloroform bestimmte Mol.-Gew. von **5a** und **5b** stimmte innerhalb der Fehlergrenze mit dem berechneten überein; unsere Präparate enthielten demnach keine nennenswerten Mengen an Dimeren **12a** bzw. **12b**, wie sie durch „verdoppelnde“ Cyclisierung entstehen könnten. Eine massenspektrometrische Mol.-Gew.-Bestimmung versagte infolge Instabilität und leichter Abspaltung der Schutzgruppe.

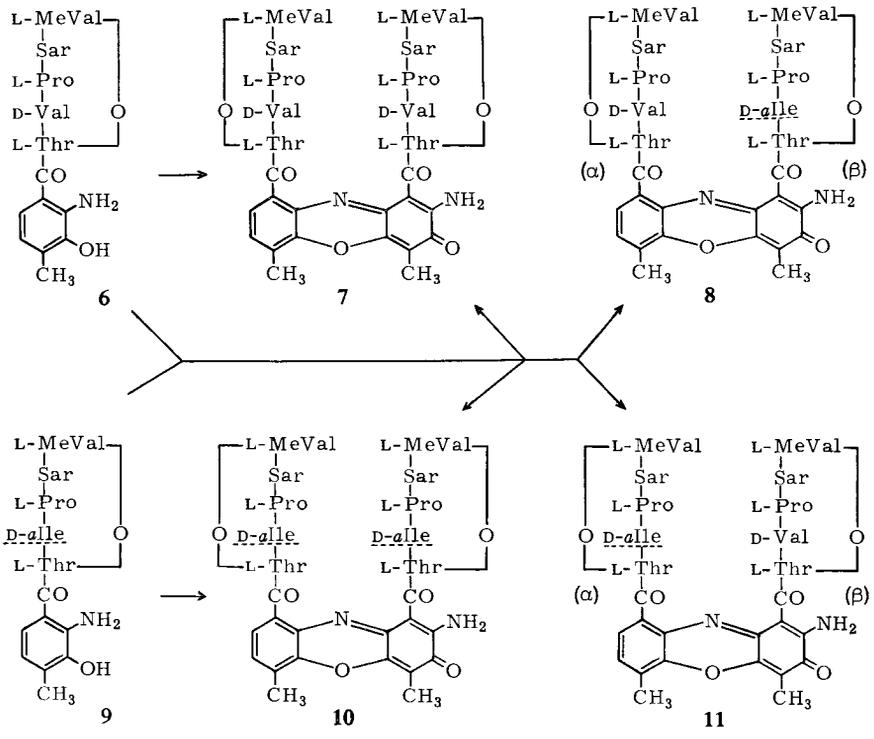
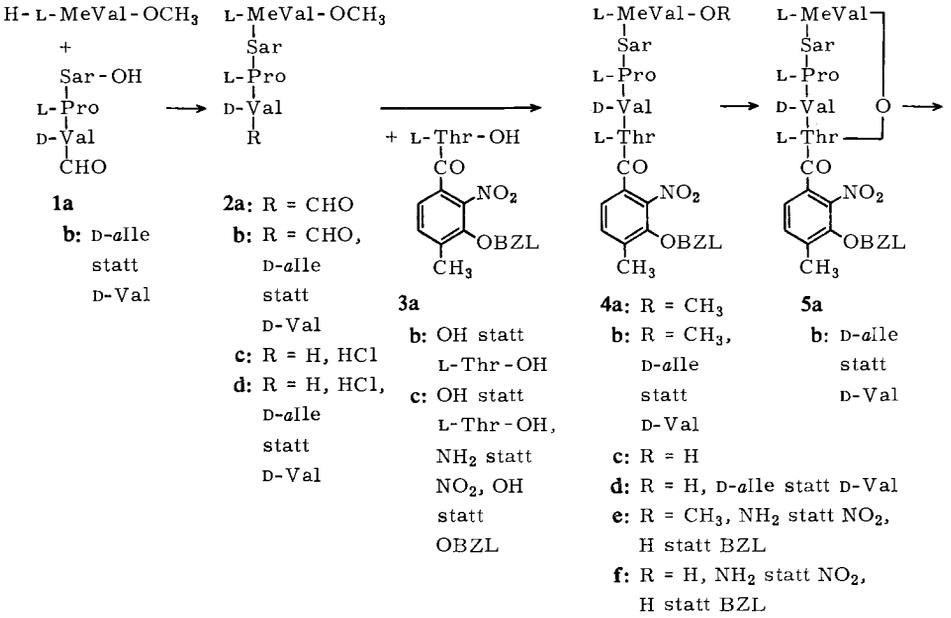
Nach einer früher geäußerten Hypothese¹⁰⁾ entstehen die Actinomycine *in vivo* durch oxydative Kondensation von zwei Molekülen eines mit **3c** *N*-acylierten Pentapeptidlactons wie **6** oder **9**. Aus zellfreien Extrakten von *Streptomyces antibioticus* hat man eine „Phenoxazinon-Synthetase“ isoliert^{11, 12)}, die **3c** — kürzlich in Actinomycin produzierenden *Streptomyces*-Kulturen nachgewiesen¹³⁾ — in Actinocin verwandelt. Von Interesse ist, ob sich mit diesem Enzym und **6** oder **9** als Substrat eine enzymatische Actinomycin-Partialsynthese durchführen läßt und ob bei enzymatischer Mischkondensation eines äquimolaren **6/9**-Gemisches äquimolare Mengen Actinomycin C₂ (**8**) und i-C₂ (**11**) entstehen.

¹⁰⁾ H. Brockmann, G. Bohnsack, B. Franck, H. Gröne, H. Muxfeldt und C. H. Siling, *Angew. Chem.* **68**, 70 (1956).

¹¹⁾ H. Weissbach und E. Katz, *J. biol. Chemistry* **236**, PC 18 (1961).

¹²⁾ E. Katz und H. Weissbach, *J. biol. Chemistry* **237**, 882 (1962).

¹³⁾ G. Schwoerer, Diplomarb., Univ. Göttingen 1968.



Überführung der *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-pentapeptidlactone **5a** und **5b** in die Actinomycine C_1 , C_2 , *i*- C_2 und C_3

Hydrierung von **5a** zu **6** und dessen Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) gab zu 85% kristallisiertes Actinomycin C_1 (**7**). In gleicher Ausbeute erhielten wir aus **5b** über **9** kristallisiertes Actinomycin C_3 (**10**). Bemerkenswert ist die gute Übereinstimmung in den $[\alpha]_D$ -Werten der synthetischen und nativen Actinomycinpräparate (Tab.).

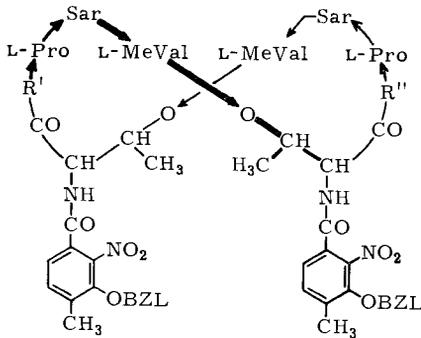
Synthetische Actinomycine und Actinomycinsäure-Derivate

Actinomycin	Schmp. (Zers.)	$[\alpha]_D^{20}$ (c) in Methanol	λ_{\max} in Methanol	R_{C_1} -Werte ^{a)}	Bakteriostat. Wirksamkeit ^{b)}
C_1 (7) aus 5a	244–245°	$-328 \pm 10^\circ$ (0.15)	25400 (443) 33100 (241)	1.0	1.0
nativ	246–247°	$-327 \pm 10^\circ$ (0.22)	25000 (443) 34000 (241)	1.0	1.0
C_3 (10) aus 5b	241–242°	$-319 \pm 10^\circ$ (0.20)	25200 (443) 34100 (241)	2.0 ^{c)}	1.0
nativ	238–241°	$-321 \pm 10^\circ$ (0.20)	24800 (443) 33600 (240)	2.0 ^{c)}	1.0
C_2 / <i>i</i> - C_2 (8 / 11) aus 5a / 5b	244–246°	$-325 \pm 10^\circ$ (0.23)	25700 (443) 33400 (241)	1.4 ^{c)}	1.0
C_2 (8) nativ	244–246°	$-325 \pm 10^\circ$ (0.20)	25300 (443) 33400 (240)	1.4 ^{c)}	1.0
C_1 -säure-(α)-lacton-(β)-methylester (14a)	228–235°	$-195 \pm 4^\circ$ (0.23)	24600 (448) 23900 (434) ^{e)} 38100 (235) ^{e)}	0.84 ^{d)}	0
C_1 -säure-(β)-lacton-(α)-methylester (15a)	183–190°	$-132 \pm 3^\circ$ (0.23)	24500 (445) 23600 (426) 43200 (237)	0.60 ^{d)}	0
C_1 -säure-dimethylester (13a)	148–156°	$-141 \pm 3^\circ$ (0.26)	26400 (445) 25200 (426) 43300 (238)	0.70 ^{d)}	0

a) Papier-rundchromatogramm, R_F -Wert von Actinomycin $C_1 = 1.0$. b) Verdünnungstest gegen *B. subtilis*; Wirksamkeit von Actinomycin C_3 (1 : 6–25 × 10⁶) = 1.0. c) LS I (vgl. Versuchsteil). d) LS IV. e) Schulter

Mit der Überführung von **6** und **9** in **7** und **10** ist auch durch Synthese bewiesen, daß die zehn Aminosäurereste der Actinomycine zu zwei Pentapeptidlacton-Gruppen gehören. Dabei ist Voraussetzung, daß die Pentapeptidlacton-Gruppen von **6** und **9** während und nach der oxydativen Kondensation unverändert bleiben und nicht in einen Decapeptid-dilactonring übergehen. Sie ist erfüllt, weil eine derartige Ring-erweiterung nur über eine Vierzentren-Umesterung denkbar wäre, für die es keine Parallele gibt und die außerdem — wie das Kalottenmodell zeigt — sterisch nicht möglich ist.

Daß man aus **4c** und **4d** Actinomycine darstellen kann, die mit Actinomycin C_1 bzw. C_3 identisch sind, wäre kein Beweis für deren Bis-pentapeptidlacton-Struktur, wenn Acetylchlorid/Acetylimidazol die *N*-Acyl-pentapeptide **4c** und **4d** dimerisierend cyclisierte; d. h., wenn unsere Cyclisierungsprodukte im Widerspruch zur osmometrisch ermittelten Mol.-Gew.-Zahl nicht **5a** und **5b** sondern die Decapeptid-dilacton-Derivate **12a** und **12b** wären. Diese Möglichkeit hat sich auf Grund folgender Überlegungen und Befunde ausschließen lassen:



- 12a:** R', R'' = D-Val
b: R', R'' = D-Alle
c: R', R'' = D-Val,
 NH₂ statt NO₂, H statt BZL
d: R', R'' = D-Alle,
 NH₂ statt NO₂, H statt BZL

Oxydation eines äquimolaren 6/9-Gemisches sollte ein äquimolares Gemisch der Actinomycine C₁ (7), C₂ (8), i-C₂ (11) und C₃ (10) liefern. Aus einem äquimolaren 12c/12d-Gemisch dagegen könnten durch intramolekulare 12c- bzw. 12d-Kondensation zwar zwei Decapeptid-dilactone mit zwei Valin- bzw. zwei *allo*-Isoleucinresten und dem Chromophor als Brücke entstehen, nicht aber zwei analog gebaute Stellungs-isomere, die wie Actinomycin C₂ (8) einen Valin- und einen *allo*-Isoleucinrest enthalten. Mit anderen Worten, liefert Misch-Kondensation der aus 4c und 4d dargestellten Cyclisierungsprodukte neben Actinomycin C₁ und C₃ die Actinomycine C₂ und i-C₂ in gleicher Menge, so haben die Cyclisierungsprodukte in Übereinstimmung mit der osmometrisch ermittelten Mol.-Gew.-Zahl die Konstitution 5a bzw. 5b und die Actinomycine Bis-pentapeptidlacton-Struktur. Entsteht dagegen *kein* Actinomycin C₂ und i-C₂, so gelten 12a und 12b, und die zehn Aminosäurereste von Actinomycin C₁ und C₃ gehören zu einem Decapeptid-dilactonring, der den Chromophor als Brücke enthält; im Widerspruch zu Mol.-Gew.-Zahl und Ergebnis des oxydativen Abbaus¹⁾.

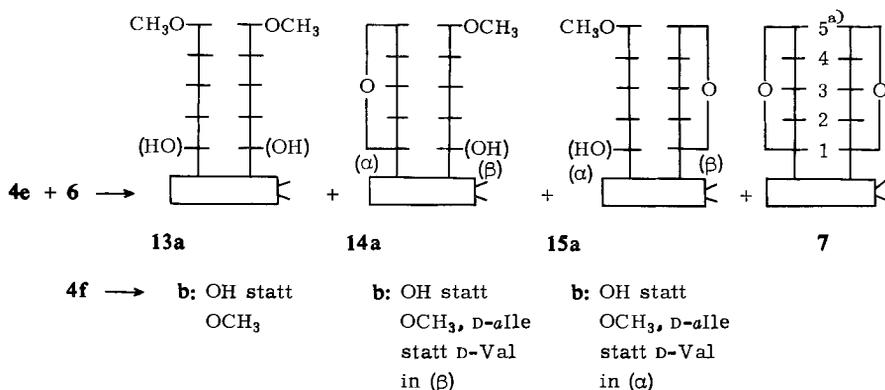
Hydrierung eines äquimolaren Gemisches der aus 4c und 4d erhaltenen Cyclisierungsprodukte, Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) und Chromatographie des zu 95% angefallenen, gelbroten Kondensationsproduktes an Cellulose (Butanol/Dibutyläther/10proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat, 3 : 7 : 10) lieferte gleiche Mengen an kristallisiertem Actinomycin C₁ und C₃ sowie in doppelt so großer Ausbeute eine kristallisierte Fraktion, die in spezif. Drehung, Elektronenspektrum, R_F-Werten, antibiotischer Wirksamkeit (Tab.), Analysenzahlen, osmometrisch ermitteltem Mol.-Gew. und IR-Spektrum mit Actinomycin C₂ (8) übereinstimmte. Diese Befunde sowie Herkunft und Ausbeute charakterisieren die Fraktion als äquimolares Gemisch aus Actinomycin C₂ (8) und i-C₂ (11), bestätigen die für die 4c- und 4d-Cyclisierungsprodukte gefundenen Mol.-Gew.-Zahlen und damit deren Formeln 5a und 5b und beweisen ohne Zuhilfenahme von Mol.-Gew.-Bestimmungen die Bis-pentapeptidlacton-Struktur der vier Actinomycine.

Synthese von Actinomycin C₁-säure-(α)-lacton-(β)-methylester (14a) und Actinomycin C₁-säure-(β)-lacton-(α)-methylester (15a)

Actinomycin C₂ (8) und i-C₂ (11) leiten sich formal von Actinomycin C₁ (7) dadurch ab, daß ein Valinrest von 7 am γ-C-Atom methyliert ist; bei 8 im β-Peptidring, bei 11 im α-Peptidring. Der Mehrgehalt an einer C-Methylgruppe beeinflusst die

spezif. Drehung und antibiotische Wirksamkeit nicht merklich, wohl aber die Löslichkeit und damit die R_F -Werte. Actinomycin C₁ (7) und Actinomycin C₂ (8) sind durch Verteilungschromatographie leicht zu trennen. Dagegen wirkt sich die verschiedene Stellung der zusätzlichen C-Methylgruppe in 8 und 11 so wenig auf die R_F -Werte aus, daß ein 8/11-Gemisch selbst an 2.5 m-Cellulosesäulen bei 120stdg. Laufzeit keine Auftrennung zeigte.

Das gleiche darf man bei anderen, analog strukturierten stellungsisomeren *aniso*-Actinomycinen erwarten. Auch sie werden daher bei der hier beschriebenen Synthese ebenso wie bei der Darstellung über ein Bis-*seco*-actinomycin⁵⁾ oder eine Actinomycinsäure²⁾ als nicht trennbare Isomerenpaare anfallen. Eine Synthese, die zu den einzelnen Partnern dieser Paare führt, muß daher so angelegt sein, daß bei der oxydativen Mischkondensation Vorprodukte der *aniso*-Actinomycine entstehen, deren Trennbarkeit zu erwarten ist; z.B. 14b und 15b, die, wenn trennbar, mit Acetylchlorid/Acetylimidazol einheitliches Actinomycin C₂ (8) und i-C₂ (11) liefern würden.



^{a)}1-5 = Aminosäuresequenz L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal

Da sich Actinocinyl-peptide chromatographisch schwerer trennen lassen als ihre Ester, wurde zunächst geprüft, ob die Methylester 14a und 15a trennbar sind. Beide waren außerdem von Interesse, weil ihr Verhalten gegen Desoxyribonucleinsäuren zeigen mußte, wieweit die Fähigkeit der Actinomycine, mit DNS Komplexe zu bilden, von der Struktur ihrer Peptidgruppen abhängt¹⁴⁾.

Zur Synthese von 14a und 15a wurde ein durch Hydrierung von 4a/5a gewonnenes, äquimolares 4e/6-Gemisch mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxydativ zum 13a/14a/15a/7-Gemisch kondensiert, das sich sowohl papierchromatographisch wie an der Cellulosesäule (LS IV) in vier der Menge nach annähernd gleiche Hauptfraktionen (in Richtung zunehmender R_F -Werte beziffert) zerlegen ließ. Fraktion IV war Actinomycin C₁ (7), Fraktion II Actinomycin C₁-säure-dimethylester (13a); identifiziert durch Vergleich mit einem durch oxydative Kondensation von 4e erhaltenen und an Cellulose (LS II) gereinigten Präparat (Tab.).

¹⁴⁾ W. Müller, Habilitationsschrift, Univ. Göttingen 1967.

Die beiden übrigen gelbroten, amorphen, antibiotisch unwirksamen Fraktionen waren laut C-, H-, N-Werten, Methoxylgehalt und NMR-Spektren die gesuchten Isomeren; die langsamer wandernde **14a**, die andere **15a**¹⁵⁾. Sie unterscheiden sich außer in den R_F -Werten in der spezif. Drehung (Tab.). Die Absorptionskurven gleichen — abgesehen von etwas kleineren ϵ -Werten und einer geringen bathochromen Verschiebung des langwelligen Maximums bei **14a** — der Actinomycin-C₁-säure-Kurve²⁾.

Die unerwartet großen R_F -Wert-Unterschiede von **14a** und **15a** machen es wahrscheinlich, daß sich auch die aus **4f** und **9** entstehenden Säuren **14b** und **15b** noch trennen lassen. Damit würden die reinen *aniso*-Actinomycine C₂ und *i*-C₂ zugänglich.

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

Beschreibung der Versuche¹⁶⁾

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

LS I: Butanol/Dibutyläther/10proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat^{b)} (2 : 3 : 5). — LS II: (1 : 1 : 2). — LS III: (3 : 7 : 10). — LS IV: (9 : 10 : 19). — LS V: (1 : 4 : 5).

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

LS VII: Butanol/Butylacetat/10proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat (1 : 5 : 6).

LS VIII: Chloroform/Methanol (19 : 1).

a) Cellulosepulver (Nr. 123) und Chromatographiepapier (2043b) von Fa. Schleicher & Schüll, Dassel. — Kieselgel für präparative Schichtchromatographie: „Merck“ PF₂₅₄, für Säulen: Firma Gebrüder Herrmann, Köln.

b) Alle Kresotinalösungen mit *m*-Kresotinsäure gesättigt.

Formyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-methylester (**2a**): Zu 7.76 g krist. *Formyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin* (**1a**)²⁾ und 4.5 g *N-Methyl-L-valin-methylester-hydrochlorid* in 150 ccm Methylenchlorid gab man 3.45 ccm *Triäthylamin* sowie bei 0° 5.36 g in wenig Methylenchlorid gelöstes *Dicyclohexylcarbodiimid* und rührte 2 Stdn. bei 0° und 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 gelöst und eine Stde. (0°) später erneut ausgefallener *Dicyclohexylharnstoff* entfernt. Verdampfen des Acetons ergab ein harziges Rohprodukt, aus dem sich an einer 3.2 × 30-cm-Säule aus saurem Kieselgel¹⁷⁾ mit Chloroform/Benzol (1 : 4) ein Vorlauf (u. a. restlichen *Dicyclohexylharnstoff* enthaltend) abtrennen ließ, während Äthylacetat (oder auch viel Chloroform) **2a** eluierte. Dies hinterblieb nach Waschen mit Wasser, Filtrieren und Verdampfen des Lösungsmittels *i*. Vak. als amorphes, weißes Pulver mit $[\alpha]_D^{20}$: $-91 \pm 2^\circ$ ($c = 1.1$ in Methanol). Ausb. 65%.

C₂₁H₃₆N₄O₆ (440.5) Ber. C 57.25 H 8.24 N 12.72 Gef. *) C 57.20 H 8.17 N 12.55

*) Getrocknet 7 Stdn. bei 65° *i*. Hochvak.

Formyl-D-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-methylester (**2b**): 2.83 g *Formyl-D-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosin* (**1b**)²⁾, 1.57 g *N-Methyl-L-valin-methylester-hydrochlorid*,

15) Über die Zuordnung der beiden Isomeren zu **14a** und **15a** durch NMR-Spektrometrie vgl. H. Lackner, Chem. Ber., in Vorbereitung.

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

17) Neutrales Kieselgel in 0.1 *n* HCl aufgeschlämmt und bei 110° bis zur Fließfähigkeit getrocknet.

1.19 ccm *Triäthylamin* und 1.87 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in 60 ccm Methylenchlorid ergaben, wie für **2a** beschrieben, zu 61 % bereits mit Chloroform von der 3 × 15-cm-Kieselgel-säule eluierbares **2b**. Weißes Pulver mit $[\alpha]_D^{20}$: $-99 \pm 3^\circ$ ($c = 2.0$ in Methanol).

$C_{22}H_{38}N_4O_6$ (454.6) Ber. C 58.13 H 8.43 N 12.33 Gef. *) C 58.44 H 8.49 N 12.21

*) Getrocknet 10 Stdn. bei 75° i. Hochvak.

D-Valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-methylester-hydrochlorid (2c): 7.27 g **2a** in 52.5 ccm 1.5 *n* methanol. HCl (2.7 g HCl in 50 ccm Methanol) hielt man 16 Stdn. bei 20° und verteilte dann über drei Stufen zwischen Äthylacetat und Wasser. Die filtrierte, wäßr. Peptid-lösung wurde i. Vak. bei 40° eingedampft und das amorphe **2c** nach mehrmaligem Abdampfen mit Wasser und Aceton i. Vak. über KOH getrocknet. Ausb. 90%. $[\alpha]_D^{20}$: $-153 \pm 4^\circ$ ($c = 0.54$ in Methanol).

$C_{20}H_{37}N_4O_5Cl$ (449.0) Ber. C 53.50 H 8.31 N 12.48 Cl 7.90

Gef. *) C 53.40 H 8.51 N 12.05 Cl 7.91 Äquiv.-Gew. 438 **)

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 85° i. Hochvak.

**) Potentiometrische Titration mit 0.1 *n* NaOH in Wasser.

D-allo-Isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-methylester-hydrochlorid (2d): Aus 2.2 g **2b** in 15 ccm 1.5 *n* methanol. HCl erhielt man, wie für **2c** beschrieben, zu 89% **2d** als weißes Pulver mit $[\alpha]_D^{22}$: $-143 \pm 4^\circ$ ($c = 0.6$ in Methanol).

$C_{21}H_{39}N_4O_5Cl$ (463.0) Ber. C 54.47 H 8.49 N 12.11 Cl 7.66

Gef. *) C 54.51 H 8.64 N 12.10 Cl 7.56 Äquiv.-Gew. 450 **)

*) Getrocknet 10 Stdn. bei 80° i. Hochvak.

**) Potentiometrische Titration mit 0.1 *n* NaOH in Wasser.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-methylester (4a): 5.59 g *N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonin (3a)*⁸⁾ und 1.99 ccm *Triäthylamin* in 40 ccm Nitromethan wurden 8 Min. bei 20° mit 3.65 g zerriebenem *N-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-3'-sulfonat*⁹⁾ gerührt, sodann mit 6.46 g **2c** — in 40 ccm Nitromethan mit 2.05 ccm *Triäthylamin* neutralisiert — versetzt und weitere 12 Stdn. bei 20° gerührt. Den bei 40° i. Vak. erhaltenen, in Chloroform gelösten und mit *n* HCl und Wasser gewaschenen Eindampfrückstand gab man nach abermaligem Wegdampfen des Lösungsmittels und Aufnehmen in Benzol (wenn schwerlöslich, mit geringem Chloroformzusatz) auf eine 3 × 30-cm-Säule aus Aluminiumoxid II-III („Merck“). Nachwaschen mit wenig Benzol trennte einen kleinen Vorlauf ab (1%), mit Chloroform gelangte die Hauptmenge von **4a** (45–55%) ins Filtrat, während Äthylacetat und gegebenenfalls Aceton weitere geringe **4a**-Anteile (10–15%) eluierten¹⁸⁾. Aus den vereinigten, mit angesäuertem Wasser (HCl) gewaschenen und filtrierten Chloroform- und Äthylacetateluaten erhielt man nach Verdampfen der Lösungsmittel i. Vak. **4a** als gelbliches Pulver mit $[\alpha]_D^{20}$: $-54 \pm 2^\circ$ ($c = 0.9$ in Methanol). Ausb. 65%.

$C_{39}H_{54}N_6O_{11}$ (782.9) Ber. C 59.83 H 6.95 N 10.74 Gef. *) C 59.97 H 7.00 N 10.85

*) Getrocknet 10 Stdn. bei 85° i. Hochvak.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-methylester (4b): Aus 1.55 g **3a**, 0.56 ccm *Triäthylamin*, 1.03 g *N-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-3'-sulfonat* und 1.86 g mit 0.57 ccm *Triäthylamin* neutralisiertem **2d** in 40 ccm Nitromethan erhielt man, wie für **4a** beschrieben, zu 66% **4b** als blaßgelbes Pulver. $[\alpha]_D^{20}$: $-59 \pm 2^\circ$ ($c = 0.9$ in Methanol).

$C_{40}H_{56}N_6O_{11}$ (796.9) Ber. C 60.29 H 7.08 N 10.55 Gef. *) C 60.49 H 7.09 N 10.65

*) Getrocknet 10 Stdn. bei 85° i. Hochvak.

¹⁸⁾ Die außerdem gewonnene Methanolfraction (ca. 30%) war sehr unrein und gab nach Hydrierung und oxydativer Kondensation zu 35% **13a**.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin (**4c**): 1.54 g **4a** in 8.5 ccm Aceton und 2.2 ccm *n* NaOH wurden unter Rühren 75 Min. auf 40° erwärmt, mit 60 ccm Wasser verdünnt und von den nicht verseiften **4a**-Anteilen durch zweimaliges Ausschütteln mit Äthylacetat befreit. Die mit 2*n* HCl angesäuerte wäbr. Phase lieferte nach Ausschütteln mit Äthylacetat und Waschen des Extraktes mit angesäuertem Wasser, Filtrieren und Eindampfen i. Vak. 0.82 g **4c**. Durch nochmaliges Verseifen des **4a**-Restes stieg die Gesamtausb. auf 78%. Farbloses Pulver mit $[\alpha]_D^{20}$: $-47 \pm 2^\circ$ ($c = 1.0$ in Methanol)¹⁹⁾.

$C_{38}H_{52}N_6O_{11}$ (768.9) Ber. C 59.36 H 6.82 N 10.99
Gef. *) C 59.63 H 6.94 N 10.60 Äquiv.-Gew. 781 **)

*) Getrocknet 10 Stdn. bei 80° i. Hochvak.

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

Überführung von **4c** in Actinomycin C₁-säure (**13b**): 100 mg **4c** in 10 ccm Methanol wurden mit Palladium-Kohle aushydriert, filtriert und nach Einengen auf 5 ccm sowie Zugabe von 10 ccm 0.07*m* Phosphatpuffer pH 7.2 mit 140 mg Kaliumhexacyanoferrat(III) in wenig Puffer unter Rühren oxydiert. Das nach 4 Stdn. mit Chloroform/Butanol (2:1) extrahierte, mit angesäuertem (HCl) Wasser gewaschene und i. Vak. zur Trockne gedampfte Rohprodukt chromatographierte man an einer 3 × 20-cm-Cellulosesäule (LS VI) und eluierte die herausgeschnittene Hauptzone mit Methanol und Wasser. Das mit *n* HCl angesäuerte Eluat wurde mit Chloroform/Butanol (2:1) extrahiert und der Eindampfrückstand des Extraktes nach Adsorbieren (Chloroform) an einer 2 × 5-cm-Säule aus saurem Kieselgel durch Waschen mit Chloroform/Aceton (4:1) von Kresotinsäure befreit. Das rote Methanoleluat, mit viel Wasser verdünnt, extrahierte man mit Chloroform, filtrierte und fällte den Verdampfungsrückstand des Extraktes aus Chloroform und Petroläther um. Das gelbrote Pulver stimmte in *R_F*-Werten, spezif. Drehung und Absorptionsspektrum mit Actinomycin C₁-säure (**13b**) überein. Ausb. 85%.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-allo-iso-leucyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin (**4d**): 1.96 g **4b** in 11 ccm Aceton und 2.75 ccm *n* NaOH wurden wie **4a** verseift und ergaben zu 80% farbloses, amorphes **4d**. $[\alpha]_D^{20}$: $-50 \pm 2^\circ$ ($c = 0.75$ in Methanol).

$C_{39}H_{54}N_6O_{11}$ (782.8) Ber. C 59.83 H 6.95 N 10.74
Gef. *) C 59.92 H 6.94 N 10.39 Äquiv.-Gew. 780 **)

*) Getrocknet 10 Stdn. bei 80° i. Hochvak.

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

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-cyclo-[*L*-threonyl-*D*-valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valyl-*O*T_{hr}] (**5a**): Zu 28.6 g Imidazol („Fluka“ reinst) in 350 ccm wasserfreiem Tetrahydrofuran gab man unter Rühren am Rückflußkühler bei 20° 14.9 ccm Acetylchlorid, rührte eine Stde. bei 55° und saugte rasch vom weißen Niederschlag ab. Das warme Filtrat wurde unter Rühren mit weiteren 22.4 ccm Acetylchlorid versetzt, noch eine Stde. bei 55° gerührt und anschließend vom hellgelben Niederschlag in ein auf 55° vorgewärmtes Reaktionsgefäß dekantiert.

Die Mischung aus 1.13 g **4c** in 30 ccm absol. Tetrahydrofuran (55°) und 350 ccm warmer Reagenzlösung hielt man 2 Stdn. bei 55°, verdampfte i. Vak. und wusch die Chloroformlösung des Rückstandes mit *n* HCl und Wasser. Nach Verdampfen des Chloroforms wurde das Rohprodukt aus Benzol an einer 2.5 × 10-cm-Aluminiumoxid-IV-Säule adsorbiert,

¹⁹⁾ J. Meienhofer [J. org. Chemistry **32**, 1143 (1967)] fand später für ein auf anderem Wege hergestelltes **4c**-Präparat: $[\alpha]_D^{20}$: -56° ($c = 1.0$ in Methanol).

mit Benzol gewaschen und durch Eluieren mit Äthylacetat und Methanol in zwei Fraktionen zerlegt. Die i. Vak. eingedampfte „Äthylacetatfraktion“ (1.1 g) ließ sich nach a, b oder c weiterreinigen.

a) *Reinigung an saurem Kieselgel*: 1.05 g der „Äthylacetatfraktion“ chromatographierte man aus Benzol/Chloroform (1 : 3) an einer 2×50 -cm-Säule aus saurem Kieselgel¹⁷⁾ auf dem Fraktionssammler. Aus den in 15-ccm-Anteilen aufgefängenen Fraktionen konnte anhand der durch Extinktionsmessung bei 366 m μ (Photometer „Eppendorf“) erhaltenen Elutionskurve eine Sammelfraktion gewonnen werden, von der eine Probe durch Hydrieren und Oxydation größtenteils in Actinomycin C₁ (7) überging (Papierchromatogramm, LS II). Diese Sammelfraktion — auf gleiche Weise nochmals gereinigt — ergab als Hauptfraktion **5a**, das — in Chloroform aufgenommen, mit Wasser gewaschen, filtriert und zur Trockne gedampft — aus wenig Chloroform mit Benzol und Petroläther gefällt wurde. Weißes Pulver mit $[\alpha]_D^{20}$: $-14.5 \pm 1.5^\circ$ ($c = 0.7$ in Methanol), das in Form seines lösungsmittelhaltigen Harzes sehr langsam durchkristallisierte. Ausb. 18%.

C₃₈H₅₀N₆O₁₀ (750.8) Ber. C 60.78 H 6.71 N 11.19

Gef. *) C 60.79 H 6.88 N 10.80 Mol.-Gew.²⁰⁾ 700 (Chloroform)

*) Getrocknet 20 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

b) *Reinigung an saurem Kieselgel und durch Schichtchromatographie*: Eine schnellere Reinigung von 2.1 g der „Äthylacetatfraktion“ gelang an einer 3.6×50 -cm-Säule aus saurem Kieselgel wie oben, wobei Chloroform/Benzol (3 : 1) einen Vorlauf, Chloroform/Äthylacetat (1 : 1) hingegen als Hauptfraktion nahezu reines **5a** eluierte. Dieses wurde, wie unten, durch präparative Schichtchromatographie nachgereinigt. Ausb. 22%, bezogen auf **4c**. $[\alpha]_D^{20}$: $-14 \pm 1^\circ$ ($c = 1.0$ in Methanol). Gef. C 60.70 H 6.88 N 11.27. Mol.-Gew.²⁰⁾ 756 (Chloroform) (**5a** schließt hartnäckig Lösungsmittel ein und wurde daher 30 Stdn. bei 110° i. Hochvak. getrocknet).

c) *Reinigung an Cellulosepulver und durch präparative Schichtchromatographie*: 0.95 g der „Äthylacetatfraktion“ ließen sich an einer 3.5×55 -cm-Cellulosesäule (LS III) in kurzer Zeit in mehrere langsam wandernde Zonen und eine schnellaufende, breitere Hauptzone — alle erkenntlich durch Löschung der Kresotinatfluoreszenz bei Einstrahlung von langwelligem UV-Licht²¹⁾ — auftrennen, deren Inhalt nach Zerschneiden der Säule mit Methanol und Wasser eluiert und den mit viel 0.2*n* NaHCO₃ verdünnten Eluaten durch Chloroform entzogen wurde. Den Eindampfrückstand der mit *n* NaHCO₃ und Wasser gewaschenen, **5a** enthaltenden Hauptfraktion (545 mg, Prüfung auf **5a** durch Überführen einer Probe in Actinomycin C₁ wie oben) reinigte man auf sechs 40×20 -cm-Platten mit je 35 g Kieselgel PF₂₅₄ (mit 95 g Wasser aufgetragen, lufttrockene Platten 3 Stdn. bei 120° aktiviert²²⁾). Nach 3–4maligem Lösungsmitteldurchlauf (LS VIII) wurde die zweitschnellste und größte Zone (Fluoreszenzlöschung!) herausgeschabt und deren Inhalt mit Methanol eluiert. Aus dem in Chloroform aufgenommenen, mit angesäuertem (HCl) Wasser gewaschenen, filtrierten Eindampfrückstand (i. Vak.) erhielt man aus wenig Chloroform mit Benzol und Petroläther 290 mg (31%, bezogen auf **4c**) amorphes, für präparative Zwecke genügend reines **5a**.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-cyclo-[*L*-threonyl-*D*-allo-isoleucyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valyl-*O*-Thr.] (**5b**): 1.12 g **4d** wurden mit 350 ccm Acetylchlorid/Acetylimidazol-Reaktionslösung, wie bei **5a** beschrieben, cyclisiert und das Reaktionsgemisch nach a) auf-

²⁰⁾ Dampfdruck-Osmometer, Modell 301 A, Fa. Mechrolab Inc., Mountain View (Calif.).

²¹⁾ Bei Verwendung des roten Leuchtpigmentes „Rot N“ (nachleuchtend, Fa. Riedel de Haën AG, Seelze) waren die Zonen ebenfalls gut zu erkennen. — UV-Lampe in beiden Fällen: PL 327, Fa. Heraeus, Hanau.

²²⁾ H. Halpaap, Chemie-Ing.-Techn. **35**, 488 (1963).

gearbeitet, wobei die Nachreinigung an der zweiten Kieselgelsäule entfiel (2.7×10 -cm-Aluminiumoxid-IV-Säule, Äthylacetatfraktion 0.97 g, 2.2×60 -cm-Kieselgelsäule). Die anhand der Elutionskurve herausgetrennte Hauptfraktion ergab zu 19% **5b**, sehr langsam durchkristallisierendes Harz und nach Fällen aus wenig Chloroform mit Benzol und Petroläther ein amorphes, weißes Pulver mit $[\alpha]_D^{20}$: $+8.5 \pm 1^\circ$ ($c = 0.7$ in Methanol).

$C_{39}H_{52}N_6O_{10}$ (764.9) Ber. C 61.24 H 6.85 N 10.99

Gef. *) C 60.93 H 6.98 N 11.08 Mol.-Gew.²⁰) 720 (Chloroform)

*) Getrocknet 20 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

Actinomycin C₁ (7) aus 5a: Die mit *Palladium-Kohle* aushydrierte Lösung von 100 mg **5a** in 25 ccm Methanol wurde auf 10 ccm eingengt, mit 20 ccm 0.07 *m* Phosphatpuffer pH 7.2 versetzt und bei pH 7.2 (mit 0.1 *n* NaOH stets nachreguliert) durch portionsweise Zugabe von 140 mg *Kaliumhexacyanoferrat(III)* in 3 ccm Puffer unter Rühren oxydiert. Nach 12 Stdn. verdünnte man mit 150 ccm Wasser, extrahierte mit Chloroform und wusch den Extrakt mit angesäuertem (HCl) Wasser. Das i. Vak. erhaltene, rohe — aus Äthylacetat/Cyclohexan auch kristallisierende — Actinomycin wurde an einer 3×30 -cm-Cellulosesäule (LS I) chromatographiert und die Hauptfraktion nach Zerschneiden der Säule mit Methanol und Wasser eluiert. Das Eluat verdünnte man mit 0.2 *n* NaHCO₃, extrahierte mit Chloroform und wusch den Extrakt mit *n* NaHCO₃, *n* HCl und Wasser. Der Eindampfrückstand (i. Vak.) kristallisierte aus Äthylacetat/Cyclohexan und ergab nach Umkristallisieren **7**, rote Nadeln oder Bipyramiden mit Schmp. 244–245°. Ausb. 85%.

$C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$ (1255.5) Ber. C 59.31 H 6.91 N 13.38 Gef. *) C 59.47 H 7.08 N 13.16

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

Actinomycin C₃ (10) aus 5b: 100 mg **5b** wurden — wie bei **7** für **5a** beschrieben — zu 85% in **10** übergeführt, rote Nadeln oder Bipyramiden mit Schmp. 241–242°.

$C_{64}H_{90}N_{12}O_{16}$ (1283.5) Ber. C 59.89 H 7.07 N 13.09 Gef. *) C 59.84 H 7.19 N 12.94

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

Oxydative Kondensation eines 5a/5b-Gemisches zu Actinomycin C₁ (7), Actinomycin C₃ (10) und Actinomycin C₂/i-C₂ (8/11): Nach gemeinsamer Hydrierung von 120 mg **5a** und 123 mg **5b** mit *Palladium-Kohle* in 25 ccm Methanol wurde die das 6/9-Gemisch enthaltende Lösung auf 15 ccm eingengt, mit 30 ccm 0.07 *m* Phosphatpuffer pH 7.2 versetzt und durch portionsweise Zugabe von 320 mg *Kaliumhexacyanoferrat(III)* in 5 ccm Puffer unter Rühren bei pH 7.2 (mit 0.1 *n* NaOH stets nachreguliert) oxydiert. 8 Stdn. später verdünnte man mit 200 ccm Wasser, extrahierte mit Chloroform und wusch den Extrakt mit angesäuertem (HCl) Wasser. Das beim Eindampfen i. Vak. hinterbliebene rohe Actinomycingemisch (196 mg) trennte sich an einer 3.6×50 -cm-Cellulosesäule (LS III) in drei Haupt- und drei kleine Nebenfraktionen, die — in Richtung zunehmender *R_F*-Werte beziffert — nach Zerschneiden der Säule mit Methanol und Wasser eluiert und den mit 0.2 *n* NaHCO₃ verdünnten Eluaten mit Chloroform entzogen wurden. Die mit *n* NaHCO₃, *n* HCl und Wasser gewaschenen, filtrierten Chloroform-Extrakte wurden verdampft und die Actinomycine der drei Hauptzonen aus Äthylacetat/wenig Methanol/Cyclohexan zweimal umkristallisiert. Die Ausbeute an den drei Nebenfraktionen ermittelte man aus deren $\epsilon_{443 \text{ m}\mu}$ -Werten (Methanol) unter Zugrundelegung von $\epsilon_{443} = 25000$.

Actinomycin C₁ (7) aus Hauptzone I: 43 mg, in allen Eigenschaften mit **7** aus **5a** identisch.

Actinomycin C₂/i-C₂ (8/11) aus Hauptzone II: 88 mg. Schmp. 244–246° (Zers.).

$C_{63}H_{88}N_{12}O_{16}$ (1269.5) Ber. C 59.61 H 6.99 N 13.24

Gef. *) C 59.71 H 7.15 N 13.01 Mol.-Gew.²⁰) 1267 (Chloroform)

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

Actinomycin C₃ (10) aus Hauptzone III: 44 mg, in allen Eigenschaften mit **10** aus **5b** identisch.

Nebenzone I (Säulenkopf): ca. 9 mg.

Nebenzone II (vor Hauptzone II): ca. 0.3 mg.

Nebenzone III (Vorlauf): ca. 3 mg.

Actinomycin C₁-säure-dimethylester (13a): Das aus 160 mg **4a** in 20 ccm Methanol durch Hydrierung mit *Palladium-Kohle* entstandene **4e** wurde nach Einengen auf 15 ccm und Zugabe von 15 ccm 0.07 *m* Phosphatpuffer pH 7.2 mit 220 mg *Kaliumhexacyanoferrat(III)*, wie unten für **14a** und **15a** beschrieben, oxydiert und das rohe **13a** entsprechend aufgearbeitet (3 × 40-cm-Cellulosesäule, LS II oder VII). Gelbrotes, amorphes, bei 148–156° schmelzendes Pulver. Ausb. 80%.

C₆₄H₉₄N₁₂O₁₈ (1319.5) Ber. C 58.25 H 7.18 N 12.74 2CH₃O 4.70
Gef. *) C 58.09 H 7.30 N 12.57 CH₃O 4.88

*) Getrocknet 15 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

Actinomycin C₁-säure-(α)-lacton-(β)-methylester (14a) und Actinomycin C₁-säure-(β)-lacton-(α)-methylester (15a): Das aus 210 mg **4a** und 200 mg **5a** in 80 ccm Methanol durch Hydrieren mit *Palladium-Kohle* entstandene äquimolare **4e/6**-Gemisch wurde nach Einengen auf 50 ccm und Zugabe von 50 ccm 0.07 *m* Phosphatpuffer pH 7.2 mit 0.6 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* in wenig Puffer unter Rühren bei pH 7.2 (mit *n* NaOH nachreguliert) oxydiert. Vier Stdn. später verdünnte man mit 200 ccm Wasser, extrahierte mit Chloroform und trennte den mit angesäuertem (HCl) Wasser gewaschenen und i. Vak. eingedampften Extrakt an einer 4 × 70-cm-Cellulosesäule (LS IV) in 4 Hauptzonen auf. Man schnitt sie aus der Säule heraus, eluierte mit Methanol und Wasser, extrahierte die mit 0.2 *n* NaHCO₃ verdünnten Eluate mit Chloroform und verdampfte die mit *n* NaHCO₃, *n* HCl und Wasser gewaschenen Chloroformauszüge i. Vak. Die Rückstände aus den Zonen I–III (in Richtung zunehmender *R_F*-Werte beziffert) nahm man in wenig Chloroform auf, filtrierte und erhielt durch Fällen mit Benzol/Petroläther amorphes, rotgelbes **14a**, **13a** und **15a**. **7** (aus Zone IV) wurde aus Äthylacetat/Cyclohexan umkristallisiert.

14a (Fraktion I): 60 mg.

C₆₃H₉₀N₁₂O₁₇ (1287.5) Ber. C 58.77 H 7.05 N 13.06 1CH₃O 2.41
Gef. *) C 58.45 H 6.99 N 12.79 CH₃O 2.30

*) Getrocknet 15 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

13a (Fraktion II): 68 mg, identisch mit **13a** aus **4a**.

15a (Fraktion III): 64 mg.

C₆₃H₉₀N₁₂O₁₇ (1287.5) Ber. C 58.77 H 7.05 N 13.06 1CH₃O 2.41
Gef. *) C 58.23 H 7.04 N 12.85 CH₃O 2.44

*) Getrocknet 15 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

7 (Fraktion IV): 65 mg, identisch mit **7** aus **5a**.