Chem. Ber. **103**, 2476–2500 (1970)

Helmut Lackner

Actinomycine, XXXV[1]; Synthesen von Actinomycinen und actinomycin-ähnlichen Chromopeptiden, VIII[1]

Totalsynthese von *aniso*-Actinocinyl-peptiden und *aniso*-Actinomycinen über deuterium-markierte Vorstufen

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 19. März 1970)

Der Aufbau kurzkettiger *aniso*-Actinocinyl-peptidester (**16**, **19**) und actinomycin-ähnlicher *aniso*-Actinocinyl-pentapeptid-Paare wird beschrieben. Jeweils *eines* der zwei Stellungsisomeren ist an C-8 des Chromophors deuteriert; dadurch sind beide stets NMR-spektroskopisch unterscheidbar und zuzuordnen. Man erhält so z. B. die in α oder β lactonisierten Actinomycin C_1-säuren **34b** und **36b** sowie zwei isomere *aniso*-Actinocinyl-peptide mit nur *einem* α- bzw. β-ständigen Pentapeptidlacton als Peptidteil (**24a**, **25a**). Weiterhin gelingt erstmals die getrennte Synthese und Zuordnung der beiden Stellungsisomeren eines nicht trennbaren *aniso*-Actinomycin-Paares, die der Actinomycine C_2 (**1b**) und i-C_2 (**2b**).

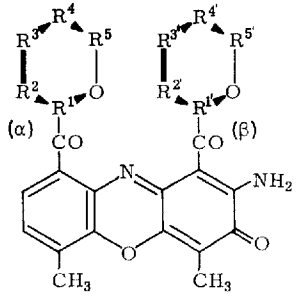
Actinomycines, XXXV[1]; Syntheses of Actinomycines and Actinomycine-like Chromopeptides, VIII[1]

Syntheses of *aniso*-Actinocinyl Peptides and *aniso*-Actinomycines Utilizing Deuterium-labelled Intermediates

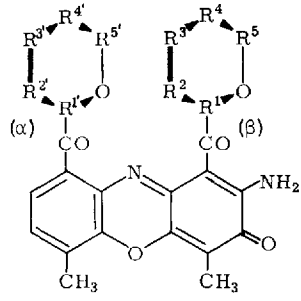
Syntheses of short-chain *aniso*-actinocinyl peptide esters (**16**, **19**) and actinomycine-like *aniso*-actinocinyl pentapeptide pairs are described. Since *one* of the two structural isomers is always deuterated at C-8 position of the chromophore, both can be distinguished and assigned by NMR-spectrometry. For example, the monolactones **34b** and **36b** of actinomycine C_1 (D) acid as well as the two isomeric *aniso*-actinocinyl peptides containing only *one* pentapeptide lactone (α or β position) (**24a**, **25a**) were obtained. Furthermore the separate synthesis and identification of the two structural isomers of a non-separable pair of *aniso*-actinomycines, actinomycine C_2 (**1b**) and i-C_2 (**2b**), was achieved.

In *aniso*-Actinomycinen (**1a**) ist – im Gegensatz zu *iso*-Actinomycinen – der Actinocinylrest mit zwei *verschiedenartigen* Pentapeptidlacton-Gruppen verknüpft, deren Vertauschung das zu **1a** stellungsisomere Actinomycin **2a** ergibt. Bei geringen Peptidketten-Unterschieden (z. B. in den Actinomycinen C_2 (**1b**) oder i-C_2 (**2b**) eine CH_2-Gruppe) zeigen die Isomeren praktisch gleiche Eigenschaften und sind dann nicht trennbar.

[1] XXXIV. bzw. VII. Mitteil.: *H. Brockmann* und *E. Schulze*, Chem. Ber. **102**, 3205 (1969).



1a: R^1-R^5, $R^{1'}$-$R^{5'}$ = Aminosäurereste
b: $R^1 = R^{1'}$ = L-Thr;
R^2 = D-Val/$R^{2'}$ = D-*a*lle;
$R^3 = R^{3'}$ = L-Pro; $R^4 = R^{4'}$ = Sar;
$R^5 = R^{5'}$ = L-MeVal



2a: $R^{1'}$-$R^{5'}$, R^1-R^5 wie in **1a**
b: $R^{1'}$-$R^{5'}$, R^1-R^5 wie in **1b**

Da die nativen, biologisch sehr wirksamen *aniso*-Actinomycine wie C_2[2], $X_{0\alpha}$, $X_{0\beta}$, $X_{0\gamma}$, $X_{0\delta}$, X_{1a}, X_2[3], E_1, F_1, F_2, F_4[4] und Z_1[5] vermutlich in der Regel[6] als einheitliche Isomere auftreten, während die bisher beschriebenen Syntheseverfahren[7–9] stets zu Gemischen wie **1b**/**2b** führen, war ein Syntheseweg von Interesse, der die Stellungsisomeren getrennt liefert. Man könnte dann sowohl die Eigenschaften beider Isomeren vergleichen und — falls Unterschiede vorhanden — die nativen *aniso*-Actinomycine sicher zuordnen[10] als auch neuartige, z. B. α- *oder* β-seitig markierte Actinomycine aufbauen.

Die Synthese der *aniso*-Actinocinyl-peptid-Paare mit nur unvollständigem Bispentapeptidlacton-Teil sollte 1. klären, welche Peptidketten-Unterschiede eine Isomerentrennung noch gestatten, 2. Vorstufen für den Aufbau einheitlicher *aniso*-Actinomycine liefern und 3. über ihr bakteriostatisches und chemisches Verhalten Auskunft geben. — Anhand einiger kurzkettiger, auch für NMR-Untersuchungen[11] und die Zuordnung von Actinomycin-Abbauprodukten interessanter *aniso*-Actinocinyl-Verbindungen werden zunächst Synthesemöglichkeiten und die Identifizierung der Isomeren erörtert.

---

[2] *H. Brockmann* und *H. S. Petras*, Naturwissenschaften **48**, 218 (1961); *H. Brockmann* und *P. Boldt*, ebenda **50**, 19 (1963).

[3] *H. Brockmann* und *J. H. Manegold*, Chem. Ber. **95**, 1081 (1962).

[4] *H. Brockmann*, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe [Wien] **18**, 1 (1960); *G. Schmidt-Kastner*, Naturwissenschaften **43**, 131 (1956).

[5] *H. Brockmann* und *J. H. Manegold*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **343**, 86 (1965).

[6] Bewiesen ist es für Actinomycin C_2 (**1b**)[2]. Vgl. auch l. c. [10].

[7] *H. Brockmann* und *H. Lackner*, Chem. Ber. **100**, 353 (1967).

[8] *H. Brockmann* und *H. Lackner*, Chem. Ber. **101**, 1312 (1968).

[9] *H. Brockmann* und *H. Lackner*, Chem. Ber. **101**, 2231 (1968).

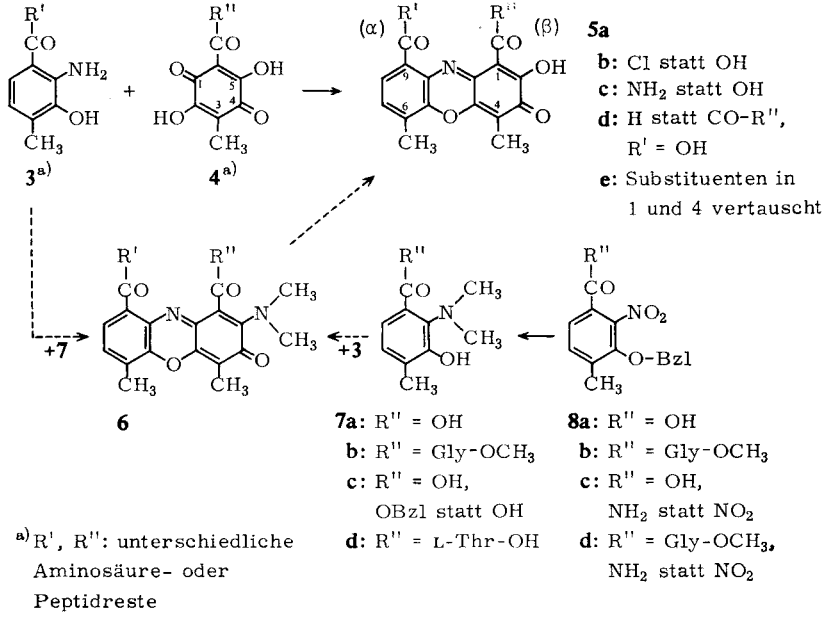
[10] Wie an Actinomycin C_2 gezeigt, gelingt die Zuordnung auch durch gezielten Abbau, erfordert aber dann größere, bei interessanten Nebenactinomycinen oft nicht verfügbare Substanzmengen und oxydationsunempfindliche Peptidteile: *H. Brockmann* und *P. Boldt*, Chem. Ber. **101**, 1940 (1968).

[11] Bezüglich der NMR-spektrometrischen Untersuchung aller in dieser Mitteil. beschriebenen Verbindungen vgl. eine weitere Mitteil.: *H. Lackner*, Chem. Ber., in Vorbereitung.

Synthese kurzkettiger *aniso*-Actinocinyl-peptide

Einheitliche *aniso*-Actinocinyl-Verbindungen entstehen 1. bei gezielter Synthese und 2. durch Misch-Synthese beider Isomeren mit anschließender Trennung und Zuordnung.

Bei einer — analog der des Actinocinins (**5d**)[12] — gezielten Synthese durch Kondensation von **3** und **4** sollte bereits neben dem abtrennbaren *iso*-Produkt (aus **3**) nur *eine aniso*-Verbindung (**5a**) entstehen, die über **5b** einheitliches **5c** ergäbe[13,14]. Jedoch ist in **4** die bei der **5d**-Synthese bevorzugt kondensierende C-1-Carbonylgruppe durch den voluminösen C-6-Substituenten so behindert, daß auch das C-4-Carbonyl mit der 3-Aminogruppe reagiert und dann **5e** gebildet wird.



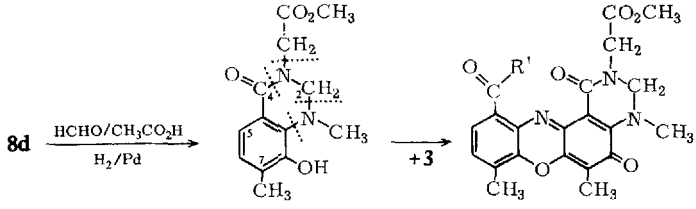
a) R', R'': unterschiedliche Aminosäure- oder Peptidreste

Eine gezielte Synthese über **6** konnte gelingen, falls unerwartet auch Dimethylaminophenole wie **7** mit **3** kondensierten: Aufgrund der *N*-Methylgruppen sollte dann **7** nur den *chinoiden* Phenoxazonteil bilden und so R'' stets nach β gelangen. Kochen von **6** mit verd. Säure gäbe **5a**.

Vorversuche hatten gezeigt[15], daß **7a** durch reduktive Methylierung (Formaldehyd/Wasserstoff/Palladium) von **8c** und dieses bei selektiver Hydrierung von **8a** entsteht. Ebenso aus **8b**[12] über **8d** **7b** zu gewinnen, schien auch zunächst möglich. — Überraschenderweise paßte jedoch das NMR-Spektrum des krist. **8d**-Methylierungsproduktes [δ: 5-H (vgl. **9**) d 7.48, 6-H d 7.03, OH 5.97, CH_2 s 4.53 und s 4.30, CH_3O 3.75, CH_3N 2.79 (3 H), CH_3 2.29 ppm[16]]

12) *H. Brockmann* und *H. Muxfeldt*, Chem. Ber. **91**, 1242 (1958).
13) *H. Brockmann, H. Gröne* und *G. Pampus*, Chem. Ber. **91**, 1916 (1958).
14) Als Modellsubstanzen genügen häufig die 2-Desamino-2-hydroxy-actinocinyl-Verbindungen.
15) *H. Lackner*, Diplomarbeit, Univ. Göttingen 1957.
16) Deuterochloroform, Tetramethylsilan als int. Standard.

nicht für eine **7b**-Struktur: ein CH_3N- und das NH-Signal fehlten, dafür war ein CH_2-Signal überzählig und das des Glycins nicht aufgespalten (**8b**: J_{CH_2NH} ~8 Hz). Acetylierung der Verbindung verschob das 5-H-Dublett (infolge long range-Kopplung von 6-H mit der Nachbarmethylgruppe leicht zuzuordnen) nach 7.83 ppm (6-H 7.12), das Hydroxylsignal fehlte. Diesen Befunden und seiner Herkunft nach kam für das **8d**-Methylierungsprodukt in Einklang mit den Analysenzahlen nur die 1.2.3.4-Tetrahydro-chinazolon-Struktur **9** in Betracht. Sie wurde durch Mol.-Gew.-Bestimmung (*m/e* 264) und Fragmentierung (vgl. **9**) im Massenspektrometer [*m/e* 135 sowie 163 ($C_9H_9NO_2$) und 191 ($C_{10}H_{11}N_2O_2$)] bestätigt[17]. — Die sterischen Voraussetzungen sind hier offenbar für eine Ringschluß-Reaktion besonders günstig[18].



Im Gegensatz zu **8d** ließ sich **8c** auch mit Methyljodid/Alkali glatt methylieren (**7c**). Das letztlich gesuchte **7d** war jedoch auch über **7a** oder **7c** nicht zugänglich. Dagegen scheint nach Modellversuchen eine oxydative Kondensation von **9** mit **3** zu einem tetracyclischen Produkt wie **10** in geringer Ausbeute möglich.

Bei der *gemeinsamen* Darstellung der *aniso*-Actinocinyl-peptid-Isomeren durch oxydative Mischkondensation zweier in R′ und R″ verschiedener 2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl-Derivate (z. B. **3** + **17**) entstehen die beiden *aniso*-Verbindungen (α-R′/β-R″ bzw. α-R″/β-R′) zusammen mit den *iso*-Produkten (R′/R′ bzw. R″/R″) (vgl. **16**, **19**, **15**, **18**). Zur Unterscheidung der Isomeren sollte nun eine mit einer bestimmten R′/R″-Anordnung gekoppelte Markierung eingeführt werden, die 1. bequem und sicher zu erkennen, 2. ohne Einfluß auf die Kondensation und die Eigenschaften der Endprodukte und 3. von der R′- bzw. R″-Zusammensetzung unabhängig war.

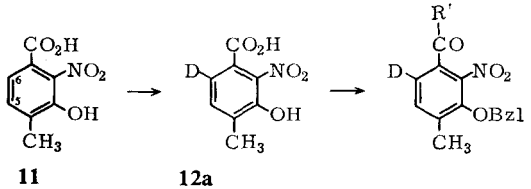
Für den Einbau nutzten wir die bei der Kondensationsreaktion unterschiedliche Umwandlung der Aminophenol-Vorstufen aus: Bildet ein Reaktionspartner den *benzoiden* Teil des entstehenden Actinocinylrestes, so werden 5-H und 6-H zu 7-H bzw. 8-H des Actinocinyls, beim Übergang in den *chinoiden* Teil hingegen werden sie abgespalten. Ersetzt man nun in *einem* Vorprodukt (mit R′) 6-H durch Deuterium (**14**), dann sind nach Mischkondensation von **14** mit z. B. unmarkiertem **17** (R″) zwei der vier Actinocinyl-Verbindungen an C-8 deuteriert, und zwar jene, deren benzoide Hälften aus **14** stammen und die somit R′ in α tragen: **15** und **16**. Das *iso*-Produkt **15** (R′/R′) ist wie **18** (R″/R″) gut identifizierbar; **16** (R′/R″) und das unmarkierte Isomere **19** (R″/R′) lassen sich nun stets NMR- oder massenspektrometrisch zuordnen oder, falls nicht trennbar, bestimmen.

[17] Für die Aufnahme der Massenspektren danke ich Herrn Prof. Dr. *G. Spiteller* sowie Herrn Dr. *G. Remberg*. Gerät: Varian-MAT SM-1b; Bruttoformeln aus Massenzahlen.

[18] Vgl. auch *J. R. Feldmann* und *E. C. Wagner*, J. org. Chemistry **7**, 31 (1942).

Für die Deuterierung – mit Rücksicht auf später hinzukommende, empfindliche Peptidreste zu Synthesebeginn – war die 2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure (**11**)[12] prädestiniert. Das 6-H ihres Dianions (2 Mol Kaliumhydroxid) ließ sich mit Deuteriumoxid in 30 Stdn. bei 100° zu 83–87% (Gleichgew.) austauschen (**12a**). Geringer Alkaliüberschuß hemmte naturgemäß die Reaktion.

Der Deuterierungsgrad ging aus dem **12a**-NMR-Spektrum[11] (Tetradeuteromethanol) hervor: das leicht verbreiterte Singulett bei δ = 7.34 ppm (6-H-Reste + 5-H) entsprach 1.13–1.17 H. Genauere Werte gab der deuterochloroform-lösliche Ester **12c** [6-H (δ = 6.99 ppm) 0.14 H, 5-H (7.42) 1.00 H; Deuterierungsgrad: 0.86], dessen Spektrum infolge schwacher Kopplung von 5-H mit der 4-Methylgruppe (δ = 2.35 ppm) zugleich die 6-Stellung des Deuteriums bewies. Entsprechend führte die Decarboxylierung von **12a** zum 4-Deutero-6-nitro-kresol (**12b**) (s δ = 7.43 und 7.94 ppm, Unschärfe durch Deuterium- und *m*-Kopplung; Deuterochloroform). Massenspektren[17] von **12a** und **12c** bestätigten einen Deuterierungsgrad von 0.85.



11 **12a**

12a, Ausgangsprodukt für alle markierten Zwischenverbindungen, gab bei Veresterung mit methanolischer Salzsäure zu 82% **12c** und dessen Hydrierung **14a**, den Kondensationspartner für die Darstellung von *aniso*-Actinocinyl-peptiden mit R′ = Methoxyl (**16a**, **19a**; **24a**, **25a**). Verknüpfung von **12a** und L-Threonyl-D-valin-methylester[19] mit Dicyclohexylcarbodiimid zu **13c** und dessen Hydrierung lieferte **14b** für den Aufbau von *aniso*-Actinocinyl-bis-dipeptidestern (**16b**, **19b**). – Trotz der alkalischen Reaktionsbedingungen gelang auch die Benzylierung[20] **12a** → **13a** ohne Deuteriumverlust. Die Blockierung der 3-Hydroxylfunktion legte zugleich das Deuterium an C-6 fest, und **13a** ließ sich unbedenklich als markierte, N-terminale, später den Actinocinylrest bildende Peptidschutzgruppe verwenden (vgl. 2. Abschnitt).

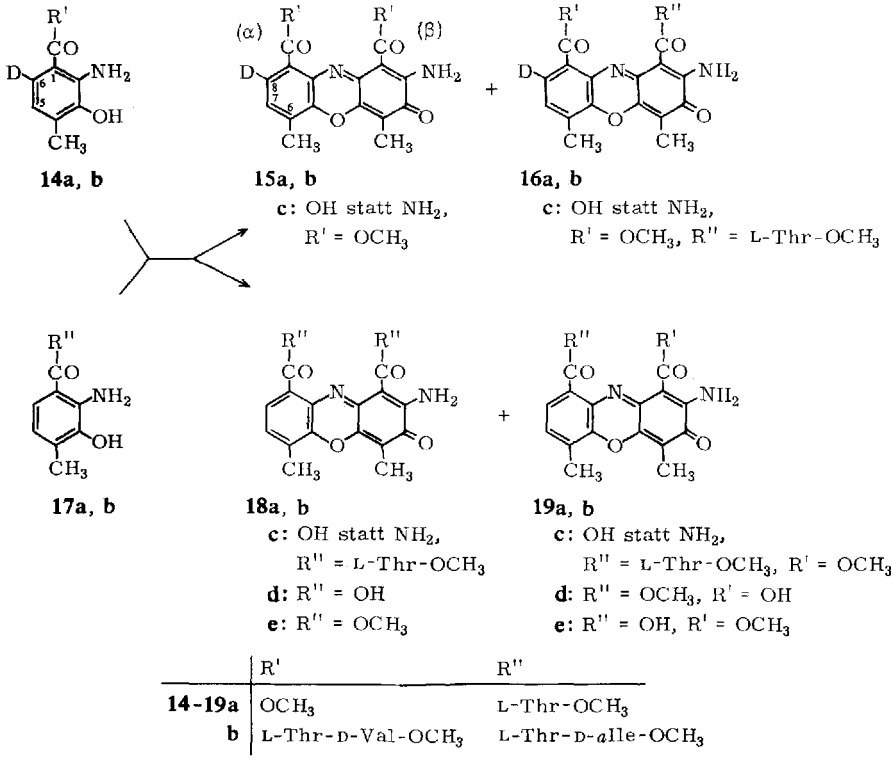
Als einfachstes *aniso*-Actinocinyl-peptid-Paar entstanden zunächst die beiden Actinocinyl-L-threonin-bis-methylester **16a** und **19a** (Tab. 1) durch Oxydation eines äquimolaren **17a**[21]/**14a**-Gemisches mit Kaliumhexacyanoferrat(III) in Dimethylformamid/Methanol/Phosphatpuffer pH 7.2 (9:1:10)[22] bei 80°. Die an Cellulose von den *iso*-Produkten **15a** und **18a**[21] und auch voneinander getrennten, krist. Isomeren unterschieden sich beträchtlich in R_F- und Drehwerten, weniger in Schmpp.

[19] *H. Brockmann, H. Lackner, R. Mecke, S. v. Grunelius, H. S. Petras* und *H. D. Berndt*, Chem. Ber. **99**, 3672 (1966).

[20] *W. G. Hanger, W. C. Howell* und *A. W. Johnson*, J. chem. Soc. [London] **1958**, 496.

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

[22] Bei 20° in Methanol/Phosphatpuffer (1:1) erhält man, da **14a** und **17a** vermutlich verschieden rasch oxydiert werden, sehr wenig **19a** (vgl. auch **24a**, **25a**). Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches hängt außerdem stark vom eingestellten pH-Wert ab[23].



14a, b **15a, b** **16a, b**

c: OH statt NH_2, $R' = OCH_3$

c: OH statt NH_2, $R' = OCH_3$, $R'' =$ L-Thr-OCH_3

17a, b **18a, b** **19a, b**

c: OH statt NH_2, $R'' =$ L-Thr-OCH_3

d: $R'' = OH$

e: $R'' = OCH_3$

c: OH statt NH_2, $R'' =$ L-Thr-OCH_3, $R' = OCH_3$

d: $R'' = OCH_3$, $R' = OH$

e: $R'' = OH$, $R' = OCH_3$

	R'	R''
14-19a	OCH_3	L-Thr-OCH_3
b	L-Thr-D-Val-OCH_3	L-Thr-D-*a*lle-OCH_3

und Absorptionsspektren (Tab. 1). Ihre Zuordnung gelang wie erhofft über die NMR-Spektren[11]: Das Produkt mit dem kleineren R_F-Wert gab – ebenso wie **18a** – neben dem 7-H ein 8-H-Dublett, war somit undeuteriert und folglich **19a** (L-Thr–OCH_3 = R'' in α). Beim Isomeren **16a** fehlte – wie auch bei **15a** – das 8-H Signal und 7-H zeigte ein Singulett; hier hatte das markierte **14a** den benzoiden Ring gebildet (L-Thr-OCH_3 = R'' in β). Eine schwache Kopplung 7-H/6-Methyl bestätigte die 8-Stellung des Deuteriums. Der massenspektrometrisch ermittelte **15a**-Deuterierungsgrad von 0.85 (NMR: 0.84 ± 0.02)[24] bewies, daß bei der Kondensation – falls R' nach α gelangt – kein Deuterium verloren geht.

Unmarkiertes, fast **19a**-freies **16a** erhielten wir auch aus L-Threonin-methylester und dem Säurechlorid des Actinocin-monomethylesters **19d** bzw. **19e**, der neben **18e** zu 35% durch Diazomethan-Methylierung einer Actinocin(**18d**)-Suspension in Methanol/Äther entstanden war[23]. Der fragliche Monomethylester war somit **19d**.

Die isomeren Desaminierungsprodukte **16c** und **19c**, durch Kochen von **16a** bzw. **19a** mit 50proz. Essigsäure zugänglich[12], unterschieden sich ebenfalls voneinander sowie auch von den *iso*-Verbindungen **15c**, **18c** (Tab. 1). Das Isomere mit dem größeren R_F-Wert war nach Herkunft (aus **16a**) und NMR-Spektrum (kein 8-H) **16c**.

[23] *H. Lackner*, Dissertat., Univ. Göttingen 1961.

[24] Da auch hier beide Werte übereinstimmen, wurde für Actinocinyl-peptide auf massenspektrometrische Deuteriumbestimmungen verzichtet; vor allem, da sie bei längerkettigen Verbindungen infolge zu geringer Molekülstabilität unsicherer und schwierig sind.

16c stimmte in allen Eigenschaften (Tab. 1) mit dem Dimethylester einer aus dem Säurehydrolysat von Actinomycin C gewonnenen Verbindung, früher als Desamino-actinocinyl-threonin[25] bezeichnet, überein. Die nunmehr bewiesene β-Stellung des Threonins im Abbauprodukt sowie der Befund, daß **19c** und **18c** im veresterten Hydrolysat nicht auftreten, zeigen eine besondere Säurestabilität der Actinocin-Threonin-Bindung in β. Entsprechend sollte auch von Actinomycinen unbekannter Struktur die Aminosäure [1] des β-Peptidringes selektiv faßbar sein.

Das unmarkiert schon bekannte[2] *aniso*-Actinocinyl-bis-dipeptidester-Paar **16b**, **19b** entstand durch Mischkondensation von **14b** und **17b**[19] und ist – obgleich nur in der Stellung einer CH_2-Gruppe verschieden – an langen Cellulosesäulen noch trennbar[19] (Tab. 1). Die fast gleichen NMR-Spektren[11] zeigen für das langsamer

Tab. 1. Vergleich der *iso*- und *aniso*-Actinocin-Derivate **15**, **18**, **16** und **19**

	R′ bzw. R″ in α	R′ bzw. R″ in β	Schmp.	$[\alpha]_D^{20}$ (*c* in Methanol)	ε_{max} (λ_{max}) in Methanol	R_F-Werte [a]	D an C-8
19d	OCH_3	OH	295–300° (Zers.)	–	27700 (432) 41000 (236)	–	–
15a	OCH_3	OCH_3	>195° (Zers.)	–	30500 (433) 36700 (240)	~3.0[d]	+
16a	OCH_3	L-Thr–OCH_3	262–264° (Zers.)	+96 ± 2° [b] (0.14)	27100 (447) 26700 (428) 41300 (238)	2.1	+
19a	L-Thr–OCH_3	OCH_3	255–258° (Zers.)	+137 ± 3° [b] (0.15)	28400 (446) 28500 (430) 46300 (239)	1.2	–
18a	L-Thr–OCH_3	L-Thr–OCH_3	256–259° (Zers.)	+130 ± 3° [c] (0.10)	27900 (444) 26900 (425) 41500 (239)	1.0	–
15b	L-Thr-D-Val–OCH_3	L-Thr-D-Val–OCH_3	111–115°	–58 ± 2° (0.16)	25600 (445) 24500 (426) 40800 (239)	1.0[e]	+
16b	L-Thr-D-Val–OCH_3	L-Thr-D-*a*lle–OCH_3	110–114°	–73 ± 2° (0.15)	26300 (445) 25300 (427) 40800 (239)	1.3	+
19b	L-Thr-D-*a*lle–OCH_3	L-Thr-D-Val–OCH_3	110–115°	–61 ± 2° (0.16)	26100 (445) 25100 (427) 40500 (239)	1.5	–
18b	L-Thr-D-*a*lle–OCH_3	L-Thr-D-*a*lle–OCH_3	105–110°	–75 ± 2° (0.15)	26500 (445) 25500 (426) 41400 (239)	1.9	–
	2-Desamino-2-hydroxy-actinocin-Derivate:						
15c	OCH_3	OCH_3	>200° (Zers.)	–	18700 (439) [b]	0.72[f]	+
16c	OCH_3	L-Thr–OCH_3 (synth.)	239–242° (Zers.)	–61 ± 2° [b] (0.14)	19100 (447) [b]	1.0	+
	OCH_3	L-Thr–OCH_3 (nativ)	237–240° (Zers.)	–62 ± 2° [b] (0.12)	19000 (447) [b]	1.0	–
19c	L-Thr–OCH_3	OCH_3	236–238° (Zers.)	–49 ± 2° [b] (0.11)	19300 (436) [b]	0.33	–
18c	L-Thr–OCH_3	L-Thr–OCH_3	207–212° (Zers.)	–80 ± 2° [b] (0.11)	22800 (447) [b]	0.28	–

[a] 32 cm-Rundchromatogramm. [b] Methanol/Chloroform (1 : 1). [c] Chloroform.
[d] LS III (vgl. Versuchsteil). [e] LS V, **18a**: 0.48. [f] LS VII.

wandernde Isomere Struktur **16b** (kein 8-H, somit D-Val in α), für das schnellere **19b** (D-*a*lle in α) an. Die durch Abbau getroffene Zuordnung und damit auch die α-Stellung des D-Valin enthaltenden Peptidringes in nativem Actinomycin C_2 (**1b**), dessen Partialhydrolyse zur (unmarkierten) **16b**-Säure führte[2], konnten so bestätigt werden.

[25] *H. Brockmann* und *H. Gröne*, Chem. Ber. **91**, 773 (1958).

Auf gleiche Weise lassen sich sowohl *aniso*-Actinocinyl-peptide mit anderen bzw. mehr Aminosäuren oder andersartigen Resten[26,27] als auch Isomeren-Paare mit in 4- und 6-Stellung unterschiedlich substituiertem Chromophor aufbauen und NMR- oder massenspektrometrisch zuordnen. Damit werden zahlreiche Modellsubstanzen zur Strukturaufklärung seltener *aniso*-Actinomycine wie auch zum Studium von Actinomycin-Polynucleotid-Wechselwirkungen[27] bequem zugänglich. Substitutionsreaktionen an C-7 oder C-8 des Chromophors[28] sind mit Hilfe der Deuterierung besonders einfach zu verfolgen.

Synthesen von actinomycin-ähnlichen *aniso*-Actinocinyl-peptiden

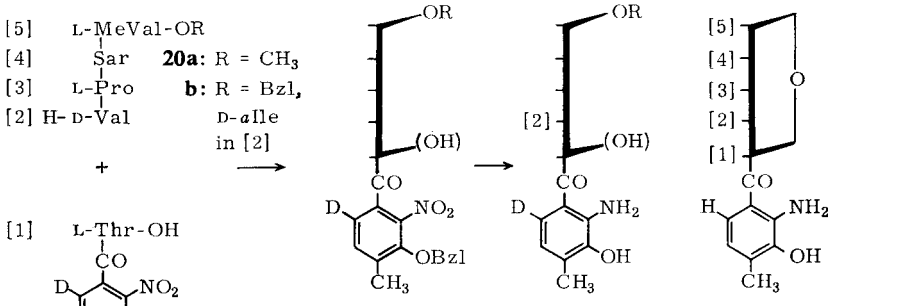
Bei der Synthese einheitlicher *aniso*-Actinocinyl-pentapeptide, hinsichtlich der Zuordnung nun kein Problem mehr, waren Trennschwierigkeiten zu erwarten, da infolge der größeren Kettenlängen sich kleine Peptidkettendifferenzen noch weniger auf die Eigenschaften der Isomeren auswirken als z. B. in **16b**, **19b**. Anfangs wurden daher einige α- und β-seitig stärker verschiedene Isomerenpaare, die sowohl ihrer bakteriostatischen Eigenschaften wegen als auch bezüglich des Einflusses polarer Gruppen auf die Trennbarkeit interessierten, aufgebaut. Dazu ließen sich die Actinomycin-Syntheseverfahren über Actinomycinsäuren[8] und *N*-[2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-pentapeptid-lactone[9] so kombinieren, daß für zahlreiche neue Verbindungen wenige markierte Zwischenprodukte ausreichten.

Verknüpfen von **13b** (aus **13a**-Säurechlorid und L-Threonin[21]) mit dem Tetrapeptidester **20a**[9] und *Woodwards* Reagenz[29] führte zum *N*-terminal geschützten Pentapeptidester **21a** und dessen milde Alkaliverseifung zu **21b**, das sich zu **23e** lactonisieren läßt[9]. Dementsprechend gaben **13b** und **20b**[8] markiertes **21c**. **21a**, **21b** bzw. **21c** — zusammen mit den jeweiligen undeuterierten Zwischenprodukten hydriert — lieferten die für die Mischkondensationen benötigten markierten Reaktionspartner **22a**, **22b** und **22c**.

Das zunächst aufgebaute *aniso*-Actinocinyl-pentapeptid-Paar **24a**/**25a** (vgl. Formelschema **24**—**33**) mit jeweils nur *einem* Pentapeptidlacton als Peptidteil entstand bei der Kaliumhexacyanoferrat(III)-Oxydation (80°[22]) eines 5 : 1-Gemisches[30] von **14a** und **23a**[9]. Die vier Reaktionsprodukte trennten sich an Cellulose: im Vorlauf war 8-Deutero-actinocin-dimethylester (**15a**), in der oberen Zone I Actinomycin C_1 (**33b**); die mittleren Zonen II und III gaben zwei Verbindungen, die ihren Eigenschaften und Analysenzahlen nach **25a** und **24a** sein mußten (Tab. 2). Die gut darauf passenden NMR-Spektren[11] wiesen das rascher wandernde Isomere aus Zone III als **24a** (kein 8-H: Peptidlacton in β), das langsamere aus Zone II als **25a** (8-H: Peptidlacton in α) aus.

Die krist. Isomeren unterscheiden sich deutlich in Schmp. und Drehwert, geringfügig im IR-Spektrum sowie in der Kurvenform des sonst dem von Actinomycin C_1 ähnlichen Ab-

[26] Z. B. Äthanolamin, Äthylenimin, 2-Diäthylamino-äthylamin.
[27] *W. Müller* und *D. M. Crothers*, J. molecular Biol. **35**, 251 (1968).
[28] *H. Brockmann*, *J. Ammann* und *W. Müller*, Tetrahedron Letters [London] **1966**, 3595.
[29] *R. B. Woodward*, *R. A. Olofson* und *H. Mayer*, J. Amer. chem. Soc. **83**, 1010 (1961).
[30] Der **14a**-Überschuß verhindert, daß zuviel kostbares Cyclopeptid infolge Selbstkondensation zu Actinomycin C_1 verloren geht.



sorptionsspektrums (Tab. 2). Beide sind im Verdünnungstest gegen *Bac. subtilis* und *Staph. aureus* unwirksam, in den Bindungskonstanten ihrer DNS-Komplexe[27] — mit 2.0×10^3 (**24a**) und 3.6×10^4 (**25a**) erheblich unter denen von Actinomycinen ($2-5 \times 10^6$) — hingegen verschieden.

Versuche, **24a** und **25a** bequemer durch Mischkondensation von **14a** und **22d** zu **24b**/**25b** und deren Lactonisierung[31] aufzubauen, verliefen wegen weitgehender Desaminierung des Chromophors während der Ringschlußreaktion unbefriedigend.

Als erstes Actinocinyl-bis-pentapeptid-Paar wurden die Actinomycin C_1-säure-monomethylester **26a**/**26b** synthetisiert, um deren Trennung und die Lactonisierung zu **28** bzw. **29** zu versuchen. Die Kondensation eines äquimolaren **22a**/**22d**-Gemisches (aus **21a** und **21e**[8]) gab neben etwa gleichen Mengen Actinomycin C_1-säure (**31b**)[8] und dem Dimethylester **26c**[9] in doppelter Ausbeute ein an Cellulose zwar gut abtrennbares, sich aber nicht weiter auftrennendes Produkt, das nach Herkunft, Eigenschaften (Tab. 2), Ausbeute und NMR-Spektrum ein 1 : 1-Gemisch von **26a**/**26b** war (Deuterierungsgrad: etwa 0.4[32]).

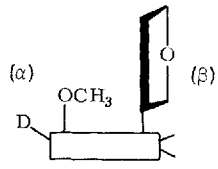
Für die Lactonisierung genügte das Isomerengemisch, da die Reaktionsprodukte infolge Blockierung der Carboxygruppen besser zu trennen sind. Umsetzen von **26a**/**26b** mit Acetylchlorid/Acetylimidazol[31] führte aber wie befürchtet nicht zu den Lactonestern **28**/**29**[9], sondern zu zwei an Cellulose trennbaren, neutralen, gelbroten, fast übereinstimmenden Verbindungen mit jeweils einem Acetyl- und einem Methoxylrest

---

[31] *H. Brockmann* und *J. H. Manegold*, Chem. Ber. **100**, 3814 (1967).

[32] Die NMR-Spektren der längerkettigen Actinocinyl-peptide sind, besonders wenn Carboxygruppen vorliegen, relativ breitbandig (Deuterochloroform). Sie werden scharf, wenn man die Peptidketten z. B. durch Lactonisierung in bestimmten Konformationen festlegt.

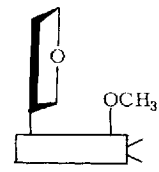
14a + 23a →



24a

b: Lacton geöffnet

+

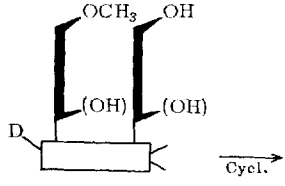


25a

b: Lacton geöffnet

+ 15a
+ 33b

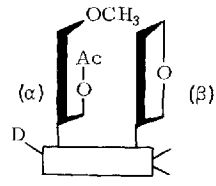
22a + 22d →



26a

b: α- u. β-Peptid vertauscht, H statt D

c: OCH_3 statt OH in β

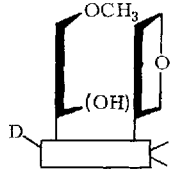


27a

b: α- u. β-Peptid vertauscht, H statt D

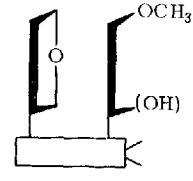
c: α-Peptid statt β-Peptid

22a + 23a →



28

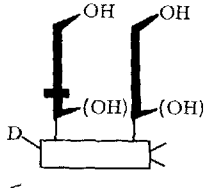
+



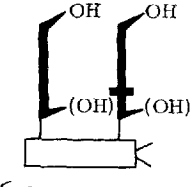
29

+ 26c
+ 33b

22c + 22d →



+



30a

b: D-*a*lle statt D-Val

c: D-Val statt D-*a*lle

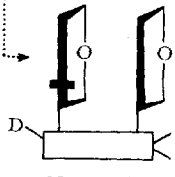
31a

b: D-Val statt D-*a*lle

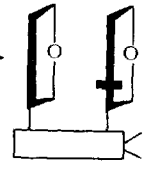
Cycl.

Cycl.

23c + 23a →



+



32a~2b (Act. i-C_2)

b: D-*a*lle statt D-Val (~Act. C_3)

33a = 1b (Act. C_2)

b: D-Val statt D-*a*lle (Act. C_1)

▬ D-*a*lle statt D-Val in [2]

(Ausb. je 18%). Laut Daten (Tab. 2), Herkunft und den sehr ähnlichen NMR-Spektren handelte es sich hier um die am Threonin acetylierten Lactonester **27a** (größerer R_F-Wert; an C-8 deuteriert) und **27b**.

Die freien Peptidketten lassen sich somit wie in Actinomycinsäuren[8] cyclisieren. Eine gleichzeitige *Acetylierung* der Threoninhydroxyle wird jedoch durch deren sterisch sehr ungünstige Lage (u. a. Abschirmung durch die Nachbarpeptidkette) nicht verhindert, sondern nur soweit verzögert, daß die Ringschlußreaktion der freien Peptidketten — durch Präformierung unterstützt — trotz des großen Acetylchloridüberschusses[31] mit ihr konkurrieren kann (vgl. Cyclisierung von **34a** und **36a**: Ausb. 67 und 55%). Erst wenn infolge blockierter Carboxylgruppen oder aus sterischen Gründen (z. B. „falsche" Aminosäuren in den Ketten[8]) die Lactonisierung behindert ist, überwiegt die Acetylierung. Entsprechend gibt **26c** in guter Ausbeute das Diacetat **27c** (Daten im Versuchsteil).

Sowohl **26a**/**26b** als auch die Acetate sind bakteriostatisch unwirksam.

Zwecks Zuordnung der unmarkiert schon bekannten[9] Actinomycin C_1-säure-lactonester **28**, **29** wurde dann ein **22a**/**23a**-Gemisch kondensiert und die Isomeren an Cellulose sowohl von den entstandenen *iso*-Produkten **26c** und **33b** (Actinomycin C_1) als auch voneinander getrennt (Tab. 2). Den NMR-Spektren nach war das rascher wandernde Isomere an C-8 deuteriert und somit **28** (Lactonring in β[33]).

Die bisher beschriebenen Produkte eignen sich nicht für den Weiterbau zu stellungsisomeren *aniso*-Actinomycinen. Daß diese bei kleinen Peptidkettenunterschieden selbst nicht trennbar sind, wurde schon bei der ersten Synthese eines Actinomycin C_2/i-C_2-Gemisches[8] vermutet. Dort fehlte jedoch der nun über eine Markierung leicht zu führende Nachweis, daß das Syntheseprodukt *beide* Isomere enthielt und nicht wie natives Actinomycin C_2 nur eines.

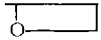
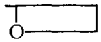
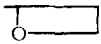
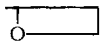
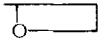
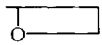
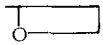
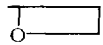
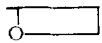
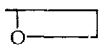
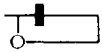
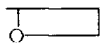
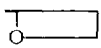
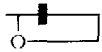
So gab die Kondensation von **22d** und **22c** das Actinomycinsäuregemisch **31b** (C_1)/**30b** (C_3) sowie **31a** (C_2) bzw. **30a** (i-C_2) im Verhältnis 1 : 1 : 2[8] (s. Versuchsteil), das — da eine Trennung von **30a**/**31a** infolge der Carboxygruppen aussichtslos war — wie üblich cyclisiert wurde. Das Reaktionsprodukt erwies sich nach Trennung an Cellulose als ein 1 : 1 : 2-Gemisch der Actinomycine C_1 (**33b**, obere Zone I) und C_3 (**32b**, Zone III) sowie einer krist. Verbindung mit allen Eigenschaften von Actinomycin C_2 (**33a**, Zone II). Den NMR-Spektren nach war **32b** im Gegensatz zu **33b** an C-8 zu 85 ± 5% deuteriert, während die Fraktion aus Zone II einen genau halb so hohen Deuteriumgehalt zeigte und somit als 1 : 1-Gemisch der *aniso*-Actinomycine C_2 (**33a**, unmarkiert) und i-C_2 (**32a**, markiert) identifiziert war. Trennungsversuche an 3m langen Cellulosesäulen mißlangen; die NMR-Spektren von **32a**/**33a**-Anteilen aus einer langsamer und einer schneller wandernden Hälfte der verbreiterten Zone wiesen auf gleichen Deuteriumgehalt hin.

Synthese der getrennten *aniso*-Actinomycine C_2 (1b) und i-C_2 (2b)

Beim Aufbau einheitlicher *aniso*-Actinomycine durch Mischkondensation mußte somit die Isomerentrennung bereits an einer gut in Actinomycine überführbaren Vorstufe erfolgen. Die unerwartet leichte Trennbarkeit der Lactonester **28**/**29** gab

[33] In der Tabelle einer vorhergehenden Mitteil.[9] sind versehentlich die Daten der Zeilen 7 und 8 (für dort **14a** und **15a**) vertauscht. Die Zuordnung im Text ist richtig und mit der hier für **28** und **29** getroffenen identisch.

Tab. 2. Synthetische *aniso*-Actinocinyl-peptide und *aniso*-Actinomycine

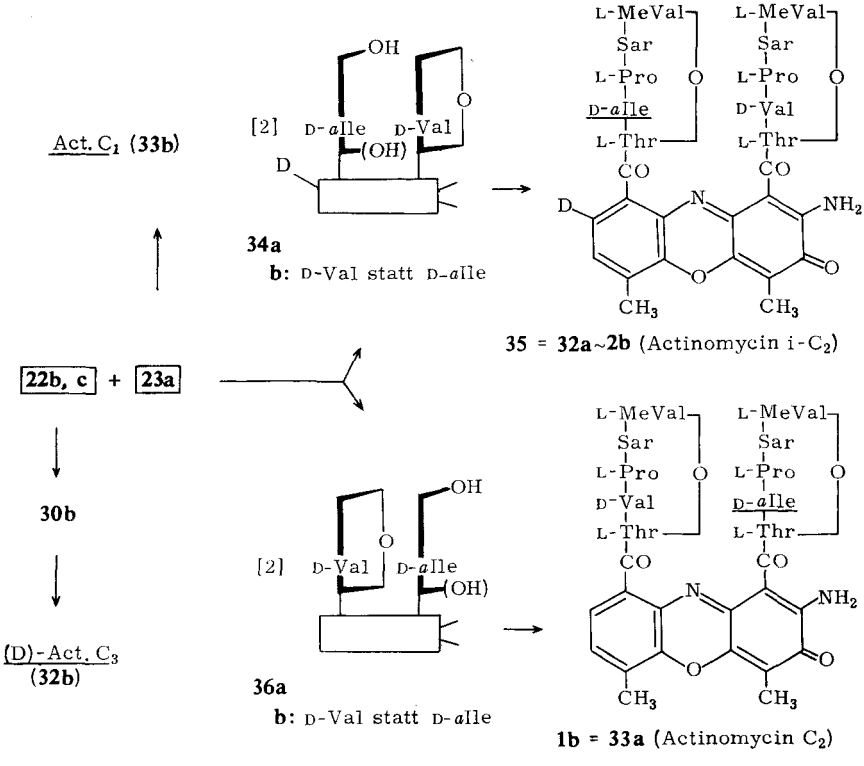
	R' bzw. R'' in α [a]	R' bzw. R'' in β [a]	Schmp.	$[\alpha]_D^{20}$ (*c* in Methanol)	ε_{max} (λ_{max}) in Methanol	R_F-Werte [b]	D an C-8
24a	$-OCH_3$		198–203° (Zers.)	−54 ±2° (0.13)	25000 (444) 24900 (427) 34300 (241)	1.57[c]	+
25a		$-OCH_3$	218–223° (Zers.)	−26 ±1° (0.19)	25200 (445) 25500 (435) 37800 (240)	1.35	–
26a	(OH) OCH_3	(OH) OH	161–166°	−140 ±3° (0.26)	27000 (445) 25900 (427) 43300 (238)	3.3[d]	±
26b	(OH) OH	(OH) OCH_3					
27a	O-Ac OCH_3		192–198°	−186 ±4° (0.22)	23100 (449) 22400 (432) 36600 (236)	1.3[e]	+
27b		O-Ac OCH_3	192–198°	−190 ±4° (0.23)	26500 (446) 25600 (427) 45000 (238)	0.87	–
28	(OH) OCH_3		228–235° (Zers.)	−195 ±4° (0.24)	24600 (448) 23900 (434) 38100 (235)	0.84[f]	+
29		(OH) OCH_3	183–190° (Zers.)	−132 ±3° (0.23)	24600 (445) 23700 (426) 43300 (237)	0.60	–
34b	(OH) OH		207–212° (Zers.)	−197 ±4° (0.31)	24000 (449) 23300 (434) 35900 (237)	0.88[g]	+
36b		(OH) OH	203–207° (Zers.)	−127 ±3° (0.32)	25100 (445) 24200 (427) 40800 (238)	0.79	–
34a	(OH) OH		199–207° (Zers.)	−203 ±4° (0.32)	24700 (448) 37100 (237)	1.0[g]	+
36a		(OH) OH	202–210° (Zers.)	−159 ±4° (0.31)	26000 (445) 41000 (238)	0.87	–
35			242–245° (Zers.)	−328 ±8° (0.26)	25000 (443) 33800 (241)	1.4[e]	+
1b			243–247° (Zers.)	−329 ±8° (0.22)	25100 (443) 33600 (241)	1.4	–
1b	(natives Act. C_2)		244–246° (Zers.)	−325 ±8° (0.32)	25300 (443) 33400 (240)	1.4[e]	–

[a] Chromophor: 8-Deutero-actinocinyl- bzw. Actinocinyl- (vgl. *16*, *19* und Formelschema S. 2484). :
Peptidrest L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal; : D-*a*Ile statt D-Val; Ac = Acetyl.

[b] 32 cm-Rundchromatogramm.
[c] LS IV (vgl. Versuchsteil), Actinomycin C_1 (**33b**) = 1.0.
[d] LS VI, Actinomycin C_1-säure (**31b**) = 1.0.
[e] LS III, **33b** = 1.0. [f] LS II, **33b** = 1.0. [g] LS VI, **31b**: ca. 0.25.

Anlaß zu dem Versuch, die vermutlich weitercyclisierbaren Actinomycinsäure-monolactone einzusetzen. Ob sich diese — selbst bei verschiedenartigen Peptidketten wie in **34a**, **36a** — aber trennen würden, schien nach den Erfahrungen mit den Monomethylestern **26a**/**26b** zweifelhaft.

Der einfachste Weg zu **34a**/**36a**, Vorstufen für die Actinomycine i-C_2 bzw. C_2, war die Mischkondensation von **23a**[9] und **22c** (Molverhältnis 1 : 2.7). Wider Erwarten trennte sich das Reaktionsgemisch an Cellulose in *vier* Hauptfraktionen (1 : 8 : 3 : 3) auf: Actinomycin C_1 (**33b**; aus dem Vorlauf) und 8-Deutero-actinomycin C_3-säure (**30b**; langsamste Zone I) sowie zwei mittelschnell wandernde, gelbrote, amorphe Produkte (Zonen II und III). Diese enthielten laut Titration eine Carboxygruppe und mußten ihren Analysenzahlen, Eigenschaften (Tab. 2) und der Herkunft nach die Actinomycinsäure-lactone **34a** und **36a** sein. Beide unterschieden sich deutlich im Drehwert, weniger in Schmp. und Absorptionsspektrum, und waren bakteriostatisch unwirksam. Die NMR-Spektren zeigten für das rascher wandernde Isomere (Zone III) eine C-8-Deuterierung und damit die Struktur **34a** an.



In **34a** und **36a** lag bereits eine Peptidkette als Lacton vor, durch erneute Cyclisierung sollten — zugleich ein Strukturbeweis — die Actinomycine i-C_2 bzw. C_2 entstehen.

Entsprechende Behandlung von **34a** und **36a** mit Acetylchlorid/Acetylimidazol[8,31] und Chromatographie der Reaktionsgemische an Aluminiumoxid IV und Cellulose gab in der Tat zwei rote, kristallisierende Produkte (Ausb. 67 bzw. 55%), deren Eigenschaften (Tab. 2) sowohl untereinander als auch mit denen von nativem Actinomycin C_2 (**1b**) übereinstimmten. Verdünnungsteste gegen *Bac. subtilis* gaben ebenfalls drei

gleiche Werte ($1:6.4 \times 10^6$). Das IR-Spektrum der Verbindung aus **36a** stimmte mit dem von **1b** überein, das andere zeigte – wohl hauptsächlich vom Deuterium verursacht – geringe Abweichungen. Auch die NMR-Spektren[11] glichen dem von **1b**; außerdem bestätigten sie für das **34a**-Cyclisierungsprodukt eine 85 ± 5proz. C-8-Deuterierung (D-*a*lle in α) und damit Struktur **35** (Actinomycin i-C_2). **36a** hatte wie erwartet Actinomycin C_2 (**1b**) gegeben. – Die hohen Cyclisierungsausbeuten (Actinomycinsäuren: 25–30%) sind verständlich, da die schon vorgefertigten Lactonringe kaum mehr Nebenreaktionen eingehen und vermutlich eine günstige Präformierung der zweiten Peptidkette fördern.

Damit hatten wir erstmals zwei nicht trennbare, stellungsisomere *aniso*-Actinomycine einzeln und sicher zugeordnet in der Hand. Ihre Unterscheidung und die Zuordnung des nativen Actinomycins sind, wenn überhaupt, nur spektrometrisch möglich und werden demnächst[11] anhand eines nicht durch Deuterium gestörten **1b**/**2b**-Paares erörtert.

Die allgemeine Anwendbarkeit dieses Syntheseverfahrens für *aniso*-Actinomycine, das zugleich beide *iso*-Actinomycine (vgl. Formelschema) liefert, hängt davon ab, ob – wie bei allen natürlich auftretenden Aminosäuresequenzen anzunehmen[34] – die Cyclisierung gelingt. Denn daß für die entscheidende Isomerentrennung nicht bestimmte Peptidkettenunterschiede – wie in **34a**, **36a** die Stellung einer CH_2-Gruppe – erforderlich sind, ist leicht zu beweisen, indem man beide Ketten gleich macht.

So gaben **23a**[9] und **22b** nach Mischkondensation und Trennung der Reaktionsprodukte an Cellulose wiederum vier Fraktionen: **33b** (Vorlauf), **30c** (langsamste Zone I) und aus Zone II und III zwei sich wie **34a**/**36a** trennende Verbindungen, die nach Daten (Tab. 2) und Eigenschaften nur die isomeren Actinomycin C_1-säure-lactone **34b** bzw. **36b** sein konnten. Das rascher wandernde Produkt war auch hier an C-8 deuteriert und damit **34b**. Beide sind bakteriostatisch unwirksam und gehen, wie üblich cyclisiert, zu ca. 60% in krist. Actinomycin C_1 bzw. dessen 8-Deutero-Derivat über.

Die Trennung stellungsisomerer Actinomycinsäure-lactone wird demnach bereits durch die unterschiedliche α,β-Anordnung der Peptidketten bewirkt. Damit sind auch einheitliche *aniso*-Actinomycine mit beliebig kleinen Differenzen (z. B. ^{14}C oder Deuterium) in den Peptidketten oder in den 4- und 6-Substituenten des Chromophors synthetisch zugänglich.

Herrn Professor Dr. *H. Brockmann* danke ich für anregende Diskussionen und die sehr großzügige Unterstützung dieser Arbeit besonders.

Frau *M. Köppler* bin ich für sehr geschickte und unermüdliche Mitarbeit zu großem Dank verpflichtet.

[34] Auch Pentapeptidketten mit nicht von nativen Actinomycinen her bekannter Aminosäuresequenz sind lactonisierbar[8].

Beschreibung der Versuche [35]

Lösungsmittelsysteme (LS) für die Chromatographie [35a]

LS I: Butanol/Dibutyläther/10proz. wäßriges Natrium-*m*-kresotinat [35b] (1 : 1 : 2). — LS II: (9 : 10 : 19). — LS III: (2 : 3 : 5). — LS IV: (3 : 7 : 10).

LS V: *tert.*-Pentylalkohol/Dibutyläther/10proz. wäßriges Natrium-*m*-kresotinat (3 : 8 : 11).

LS VI: Butanol/Butylacetat/Wasser/10proz. wäßriges Natrium-*m*-kresotinat (1 : 1 : 1 : 1).

LS VII: Butanol/Butylacetat/Dibutyläther/Wasser/10proz. wäßriges Natrium-*m*-kresotinat (1 : 6 : 1 : 4 : 4). — LS VIII: (4 : 3 : 1 : 4 : 4).

2-Amino-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure (**8c**): 3.0 g **8a** [12] in 150 ccm Methanol wurden mit ca. 3 g *Raney-Nickel* („Degussa", Nr. B 113) bis zur Aufnahme von 3 Moläquivv. *Wasserstoff* hydriert. Der aus Methanol/Wasser kristallisierte Eindampfrückstand gab 75% **8c**, farblose, aus Äthylacetat/Benzol/Petroläther oder Methanol/Wasser umkristallisierte Nadeln mit Schmp. 150–151°. Die Analysenprobe wurde 8 Stdn. bei 70° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{15}H_{15}NO_3$ (257.3) Ber. C 70.02 H 5.88 N 5.45 Gef. C 70.28 H 5.80 N 5.45

2-Dimethylamino-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure (**7a**): 4.0 g **8c** in 100 ccm Essigsäure wurden nach Zugabe von 20 ccm 40proz. *Formaldehyd* und 1 g *Palladium/Kohle* aushydriert. Der zweimal aus Wasser/Äthanol umkristallisierte Eindampfrückstand gab 55% **7a**; farblose, wasserlösliche Kristalle mit Schmp. 265–270°. Zur Analyse wurde 12 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{10}H_{13}NO_3$ (195.2) Ber. C 61.60 H 6.72 N 7.18 Gef. C 61.46 H 6.89 N 7.10

2-Dimethylamino-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure (**7c**): 9.7 g in wenig Methanol gelöstes **8c** wurden mit 38 ccm *Methyljodid* und 62 ccm 2*n* *NaOH* — davon 5 ccm nach 2 Stdn. hinzugefügt — insgesamt 4 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach Verdampfen des Methanols i. Vak. und Versetzen mit 20 ccm 2*n* NaOH extrahierte man das Reaktionsgemisch mit Äther, säuerte die wäßrige Phase mit 2*n* HCl schwach an und schüttelte mit Chloroform aus. Der Rückstand des mit angesäuertem (HCl) Wasser gewaschenen und i. Vak. eingedampften Chloroformextraktes gab, zweimal aus Äthylacetat/Benzol/Petroläther umkristallisiert, farblose, bei 140–141° schmelzende Plättchen. Ausb. 70%. Die Analysenprobe war 10 Stdn. bei 70° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{17}H_{19}NO_3$ (285.3) Ber. C 71.56 H 6.71 N 4.91 Gef. C 71.49 H 6.75 N 4.88

N-[2-Amino-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-glycin-methylester (**8d**): 1.43 g **8b** [12] wurden in 150 ccm Methanol mit ca. 1.5 g feuchtem *Raney-Nickel* („Degussa", Nr. B 113) bis zur Aufnahme von 3 Moläquivv. *Wasserstoff* hydriert. Der Eindampfrückstand gab nach Umkristallisieren aus Äthanol/Wasser 70% **8d**, farblose Nadeln mit Schmp. 111°. Nach 10 Stdn. Trocknen bei 70° i. Hochvak. wurde analysiert.

$C_{18}H_{20}N_2O_4$ (328.4) Ber. C 65.83 H 6.14 N 8.53 Gef. C 66.21 H 6.12 N 8.50

8-Hydroxy-4-oxo-1.7-dimethyl-3-methoxycarbonylmethyl-1.2.3.4-tetrahydro-chinazolin (**9**): 1.16 g **8d** in 120 ccm Essigsäure wurden nach Zugabe von 2.9 ccm 40proz. *Formaldehyd* und ca. 0.8 g *Palladium/Kohle* aushydriert. Der Eindampfrückstand des Filtrates gab, aus Äthanol/

---

[35] Schmpp. auf dem Kofler-Block bestimmt und korrigiert. — [35a] Cellulosepulver (Nr. 123) und Chromatographiepapier (2043b mgl) von Fa. Schleicher & Schüll, Dassel. Neutrales Kieselgel: Fa. Gebr. Herrmann, Köln-Ehrenfeld; Kieselgel M, Körnung DIN 60–80. [35b] Alle Kresotinatlösungen mit *m*-Kresotinsäure gesättigt.

Wasser oder Chloroform/Cyclohexan umkristallisiert, 85% **9** als fast farblose, bei 121° schmelzende Nadeln. Zur Analyse wurde 8 Stdn. bei 60° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{13}H_{16}N_2O_4$ (264.3) Ber. C 59.06 H 6.10 N 10.60 1 CH_3O 11.7
Gef. C 58.74 H 6.26 N 10.29 CH_3O 11.5

2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-6-deutero-benzoesäure (**12a**): 6.4 g *2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure* (**11**)[12] wurden in 20 g *Deuteriumoxid* (99%) und 3.9 g *Kaliumhydroxid* (p. a. „Merck", 90% KOH) unter Stickstoff 30 Stdn. auf 100° erhitzt. Die erkaltete, mit 80 ccm *n HCl* angesäuerte Mischung extrahierte man erschöpfend mit Chloroform/Äthylacetat (2:1), wusch den Extrakt mit angesäuertem (HCl) Wasser und kristallisierte das nach dem Eindampfen zurückbleibende **12a** zweimal aus Aceton/Benzol um. Blaßgelbe Säulen mit Schmp. 186°; Deuterierungsgrad: 0.85[36]. Ausb. 91%. Zur Analyse wurde 10 Stdn. bei 80° i. Hochvak. getrocknet.

$C_8H_6DNO_5$ (198.2) Ber. C 48.50 H 4.07 N 7.07 Gef. C 48.47 H 3.60[37] N 7.23

6-Nitro-2-methyl-4-deutero-phenol (**12b**)[38]: 100 mg **12a** in 10 ccm *Chinolin* kochte man 2 Min. mit 500 mg *Kupferpulver*, filtrierte und wusch die mit 100 ccm Äthylacetat verdünnte Reaktionslösung zweimal mit 2*n* HCl und Wasser und dann mit 0.5*n* $NaHCO_3$. Anschließende Extraktion mit *n* NaOH und Ausschütteln des angesäuerten (2*n* HCl) Extraktes mit Chloroform ergab nach vorsichtigem Eindampfen i. Vak. rohes, bei 80°/1 Torr sublimierbares **12b**. Gelbe, bei 69.5° schmelzende Nadeln; Deuterierungsgrad: 0.85[39]. Ausb. 50 mg.

$C_7H_6DNO_3$ (154.1) Ber. C 54.56 H 5.23 N 9.10 Gef. C 54.70 H 4.75[37] N 9.36

2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-6-deutero-benzoesäure-methylester (**12c**): 2.5 g **12a** wurden 2 Stdn. und nach Eindampfen i. Vak. nochmals 4 Stdn. mit je 150 ccm 4proz. *methanolischer Salzsäure* unter Rückfluß gekocht und der in Chloroform aufgenommene Eindampfrückstand zweimal mit *n* $NaHCO_3$ und Wasser gewaschen. Nach Verdampfen des Chloroforms erhielt man aus Äthylacetat/Cyclohexan blaßgelbe Kristalle mit Schmp. 116°; Deuterierungsgrad: 0.85[36]/0.86[39]. Ausb. 82%. Trocknen der Analysenprobe 4 Stdn. bei 20° i. Hochvak.

$C_9H_8DNO_5$ (212.2) Ber. C 50.94 H 4.75 N 6.60 1 CH_3O 14.62
Gef. C 51.19 H 4.37[37] N 6.58 CH_3O 14.60

2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoesäure (**13a**): 4.5 g **12a** und 3.1 g *Kaliumhydroxid* (p. a. „Merck") in 50 ccm Methanol wurden 19 Stdn. mit 6.3 g *Benzylchlorid* unter Rückfluß gekocht, anschließend auf ca. 25 ccm eingeengt und nach Zugabe von 150 ccm Wasser mit 3 × 100 ccm Äther extrahiert. Den Eindampfrückstand des mit Wasser gewaschenen Extraktes schüttelte man 3 Stdn. mit 45 ccm 20proz. methanol. *Kaliumhydroxid*, versetzte danach mit 150 ccm Wasser und extrahierte zweimal mit Äther. Die wäßrige Phase wurde nach Abdampfen des gelösten Äthers (i. Vak.) auf 80° erwärmt, mit 35 ccm 6*n* HCl angesäuert und das ausgefallene **13a** bei 20° abgesaugt. Aus Äthanol/Wasser blaßgelbe Plättchen mit Schmp. 175°; Deuterierungsgrad: ca. 0.85[40]. Ausb. 67%. Zur Analyse wurde 10 Stdn. bei 90° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{15}H_{12}DNO_5$ (288.3) Ber. C 62.51 H 4.89 N 4.86 Gef. C 62.75 H 4.64[37] N 4.99

[36] Massenspektrometrische Bestimmung[17].

[37] Da bei der Verbrennungsanalyse 1.0 D ca. 1.1 H entsprechen, liegt der bei deuterierten Produkten gefundene Wasserstoffwert zu tief und müßte besser mit dem für undeuterierte Verbindungen berechneten verglichen werden (**11**: H ber. 3.58).

[38] Undeuteriertes **12b**: *A. W. Hofmann* und *W. v. Miller*, Ber. dtsch. chem. Ges. **14**, 567 (1881).

[39] NMR-spektrometrisch bestimmt.

[40] Die D-Bestimmung bei 3-Benzyloxy-Verbindungen wie **13a** ist schwieriger, da im NMR-Spektrum die Signale aller aromatischen Protonen weitgehend zusammenfallen und das Molekül im Massenspektrometer zu leicht zerfällt.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-L-threonin (**13b**): 3.84 g **13a** wurden mit 20 ccm *Thionylchlorid* 10 Min. unter Rückfluß gekocht, der Eindampfrückstand i. Vak. zweimal mit wenig Benzol abgedampft und das durchkristallisierende *Säurechlorid* in 40 ccm Benzol gelöst. Nach Zugabe von 60 ccm Äther und 1.7 g *L-Threonin* in 27 ccm 0.5 *n NaOH* tropfte man unter Rühren (Vibromischer) bei 0° weitere 14 ccm *n* NaOH innerhalb 30 Min. ein und rührte noch 3 Stdn. bei 0°. Die i. Vak. vom Äther befreite, mit 40 ccm Chloroform und 20 ccm Wasser verdünnte Mischung wurde zentrifugiert, die wäßrige, mit 2 *n HCl* angesäuerte Phase mit Äthylacetat extrahiert und der mit Wasser gewaschene Extrakt i. Vak. eingedampft. Umkristallisieren des Rückstandes aus Aceton/Benzol/Cyclohexan gab blaßgelbe, bei 172 bis 175° schmelzende Plättchen. $[\alpha]_D^{20}$: $-58 \pm 2°$ ($c = 1.5$ in Methanol). Deuterierungsgrad: ca. 0.85[39]. Ausb. 90%. Zur Analyse wurde fein zerrieben und 8 Stdn. bei 120° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{19}H_{19}DN_2O_7$ (389.4) Ber. C 58.60 H 5.44 N 7.20 Gef. C 58.97 H 5.29[37] N 7.13

N-[2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-L-threonyl-D-valin-methylester (**13c**): Eine Lösung von 0.51 g **12a**, 0.69 g *L-Threonyl-D-valin-methylester-hydrochlorid*[19] und 0.36 ccm *Triäthylamin* in 25 ccm Methylenchlorid versetzte man bei 0° mit 0.57 g *Dicyclohexylcarbodiimid* und rührte 2 Stdn. bei 0° sowie 12 Stdn. bei 20°. Der Eindampfrückstand der vom Dicyclohexylharnstoff abfiltrierten und mit 0.1 *n HCl* sowie Wasser gewaschenen Reaktionslösung wurde in wenig Aceton gelöst, bei 0° restlicher Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und der nach Verdampfen des Acetons hinterbliebene Rückstand aus Chloroform an einer 3 × 15-cm-Säule aus neutralem Kieselgel chromatographiert. Nachwaschen mit Chloroform entfernte Nebenprodukte, mit Chloroform/Aceton (4 : 1) gelangte **13c** ins Filtrat, dessen Eindampfrückstand man zweimal aus Methanol/Chloroform/Cyclohexan umkristallisierte. Hellgelbe Nadeln mit Schmp. 197–199° und $[\alpha]_D^{20}$: $+1.5 \pm 0.3°$ ($c = 1.4$ in Methanol). Deuterierungsgrad: 0.83[39]. Ausb. 75%. Die Analysenprobe trockneten wir 10 Stdn. bei 70° i. Hochvak.

$C_{18}H_{24}DN_3O_8$ (412.4) Ber. C 52.43 H 6.36 N 10.19 1 CH_3O 7.5
Gef. C 52.87 H 6.56 N 10.34 CH_3O 7.2

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-methylester (**21a**): 1.5 g **13b** und 0.53 ccm *Triäthylamin* in 15 ccm Nitromethan wurden 8 Min. bei 20° mit 1.0 g zerriebenem *N-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3)* gerührt, dann mit 1.7 g *D-Valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-methylester-hydrochlorid* (**20a**)[9] – in 15 ccm Nitromethan mit 0.55 ccm *Triäthylamin* neutralisiert – versetzt und weitere 12 Stdn. bei 20° gerührt. Den in Chloroform gelösten, mit *n HCl* und Wasser gewaschenen Eindampfrückstand adsorbierte man aus 20 ccm Chloroform/Benzol (1 : 4) an einer mit Benzol eingeschlämmten 2.8 × 8 cm-Säule[41] aus Aluminiumoxid II–III („Merck"). Nachwaschen mit Benzol trennte einen kleinen Vorlauf ab, mit Chloroform oder Äthylacetat gelangte die Hauptmenge ins Filtrat, aus dem man nach Waschen mit angesäuertem (HCl) Wasser, Filtrieren und Eindampfen blaßgelbes, amorphes **21a** mit $[\alpha]_D^{20}$: $-53 \pm 2°$ ($c = 1.0$ in Methanol) erhielt. Deuterierungsgrad: ca. 0.85[39]. Ausb. 65%. Für die Analyse wurde 10 Stdn. bei 70° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{39}H_{53}DN_6O_{11}$ (783.9) Ber. C 59.75 H 7.07 N 10.73 1 CH_3O 3.96
Gef. C 59.42 H 7.05 N 10.57 CH_3O 4.14

---

[41] Damit sich Pentapeptid-methylester-Verbindungen wie **21a** wieder rasch und in guter Ausb. eluieren lassen, sind pro mMol eingesetztes **13b** ca. 12–15 ccm (eingeschlämmt) Aluminiumoxid II–III zweckmäßig, für die entsprechenden Benzylester (**21c**) 20–25 ccm/mMol.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-benzylester (**21c**): Aus 2.15 g **13b**, 0.76 ccm *Triäthylamin*, 1.45 g *N-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3)* und 3.0 g mit 0.79 ccm *Triäthylamin* neutralisiertem *D-allo-Isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-benzylester-hydrochlorid* (**20b**)[8] in 60 ccm Nitromethan erhielt man, wie für **21a** beschrieben, (3 × 20 cm Aluminiumoxid II–III-Säule[41]) blaßgelbes, amorphes **21c** mit $[\alpha]_D^{20}$: $-54 \pm 2°$ ($c = 0.8$ in Methanol). Deuterium-Gehalt an C-6: ca. 85%[30]. Ausb. 75%. Die Analysenprobe wurde wie bei **21a** getrocknet.

$C_{46}H_{59}DN_6O_{11}$ (874.0) Ber. C 63.21 H 7.04 N 9.62 Gef. C 63.36 H 6.95 N 9.66

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin (**21b**): 2.2 g **21a** in 6.2 ccm Methanol und 3.1 ccm *n NaOH* wurden 80 Min. auf 40° erwärmt, dann mit 80 ccm Wasser verdünnt und mit 80 ccm Chloroform/Äthylacetat (1 : 1) ausgeschüttelt (Zentrifuge). Die mit wenig Wasser gewaschene organische Phase enthielt unverseifte **21a**-Anteile; die vereinigten wäßrigen Lösungen gaben nach Ansäuern (2*n HCl*), Extrahieren mit Äthylacetat/Chloroform sowie Waschen des Extraktes mit angesäuertem Wasser, Filtrieren und Eindampfen 78% **21b**. Farbloses Pulver mit $[\alpha]_D^{20}$: $-40 \pm 2°$ ($c = 1.0$ in Methanol). Deuterierungsgrad: ca. 0.85[39]. Die Analysenprobe wurde 8 Stdn. bei 80° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{38}H_{51}DN_6O_{11}$ (769.9) Ber. C 59.28 H 6.94 N 10.92 Gef. C 58.96 H 6.88 N 10.75

8-Deutero-actinocin-dimethylester (**15a**): Eine Lösung von 100 mg **12c** in 20 ccm Methanol wurde mit *Palladium/Kohle* aushydriert und das Filtrat nach Zugabe von 20 ccm 0.07 *m* Phosphatpuffer pH 7.2 mit 0.5 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* in wenig Puffer unter Rühren oxydiert. 3 Stdn. später extrahierte man die mit Wasser verdünnte Reaktionsmischung mit Chloroform, wusch den Extrakt mit angesäuertem (HCl) Wasser und kristallisierte das beim Eindampfen zurückbleibende **15a** zweimal aus wenig Chloroform durch Zugabe von heißem Methanol um. Gelbrote, sich oberhalb 195° zersetzende Nadeln. Ausb. 80%. Zur Analyse trockneten wir 16 Stdn. bei 100° i. Hochvak.

$C_{18}H_{15}DN_2O_6$ (357.3) Ber. C 60.50 H 4.80 N 7.84 2 CH_3O 17.4
Gef. C 60.68 H 4.54[37] N 7.96 CH_3O 17.2

[Actinocin-(α)-yl-(β)-methylester]-L-threonin-methylester (**19a**) *und [8-Deutero-actinocin-(β)-yl-(α)-methylester]-L-threonin-methylester* (**16a**): Das durch Hydrierung *(Palladium/Kohle)* von 320 mg **12c** und 600 mg *N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonin-methylester* (**13d**)[21] in 50 ccm Methanol entstandene und i. Vak. eingedampfte **14a/17a**-Gemisch wurde in 300 ccm Dimethylformamid/Methanol/0.07 *m* Phosphatpuffer pH 7.2 (9 : 1 : 10) mit 3.2 g in wenig Puffer auf einmal hinzugefügtem *Kaliumhexacyanoferrat(III)* bei 80° oxydiert. Die bei pH 7.2 (mit *n NaOH* eingestellt) weitere 6 Stdn. (20°) gerührte und dann mit viel angesäuertem (*HCl*) Wasser verdünnte Reaktionsmischung extrahierte man mit Chloroform und löste den Eindampfrückstand des mit Wasser gewaschenen Extraktes nach Abdampfen mit Butanol in 300 ccm Oberphase von LS I. Ausgefallenes **15a** wurde abgesaugt und das Filtrat an einer 4.5 × 120 cm-Cellulosesäule (LS I) chromatographiert. Der Vorlauf enthielt weiteres **15a**; am Säulenkopf – wie unten aufgearbeitet – hinterblieb hauptsächlich desaminiertes **15c** (ca. 60 mg). Die in Richtung zunehmender R_F-Werte bezifferten Hauptzonen I–III eluierte man nach Zerschneiden der Säule mit Methanol und Wasser, extrahierte die mit 0.2*n* $NaHCO_3$ verdünnten Eluate mit Chloroform und dampfte die mit *n* $NaHCO_3$, *n* HCl und Wasser gewaschenen, filtrierten Extrakte i. Vak. ein. Die gelbroten Rückstände wurden aus Chloroform/Cyclohexan (Zonen I und III) bzw. – nach Filtrieren der Chloroformlösung über eine 2.5 × 4 cm-Aluminiumoxid IV-säule – aus Chloroform/Äthylacetat (Zone II) zweimal umkristallisiert und erwiesen sich, NMR-spektrometrisch zugeordnet, als **18a**, **16a** sowie **19a**.

18a (Zone I): 170 mg, identisch mit authentischem *Actinocinyl-bis-L-threonin-methylester*[21].

19a (Zone II): 100 mg, Schmp. 255–258° (Zers.), zur Analyse 20 Stdn. bei 100° i. Hochvak getrocknet.

$C_{22}H_{23}N_3O_8$ (457.4) Ber. C 57.77 H 5.08 N 9.19 2 CH_3O 13.6
Gef. C 57.67 H 5.20 N 9.13 CH_3O 13.4

16a (Zone III): 85 mg, Schmp. 262–264° (Zers.), zur Analyse 20 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{22}H_{22}DN_3O_8$ (458.4) Ber. C 57.64 H 5.28 N 9.17 2 CH_3O 13.5
Gef. C 58.07 H 5.20 N 9.07 CH_3O 13.1

Actinocin-(α)-methylester (**19d**): 1.0 g fein zerriebenes, in 5 ccm heißem Methanol suspendiertes *Actinocin* (**18d**)[7,12] versetzte man bei 20° mit 1.6 g *Diazomethan* in 20 ccm Äther und dampfte nach 48 Stdn. i. Vak. ein. Beim Digerieren des Rohproduktes mit Chloroform löste sich der *Actinocin-dimethylester* (**18e**) (Ausb. 50%, identisch mit authentischem **18e**[12]), während der unlösliche Rückstand – dreimal aus Dimethylformamid umkristallisiert – **19d** ergab, rote Nadeln mit Schmp. 295–300° (Zers.), Ausb. 35%. Die Analysenprobe wurde 8 Stdn. bei 110° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{17}H_{14}N_2O_6$ (342.3) Ber. C 59.65 H 4.12 N 8.20 1 CH_3O 9.1
Gef. C 60.05 H 4.07 N 8.39 CH_3O 8.9

[Actinocin-(β)-yl-(α)-methylester]-L-threonin-methylester (**16a**, H statt D) *aus Actinocin-(α)-methylester* (**19d**): 88 mg **19d** kochte man 6 Min. mit 5 ccm *Thionylchlorid* und nach Zugabe von 10 ccm absol. Benzol weitere 2 Min. unter Rückfluß, dampfte rasch i. Vak. ein (Badtemp. 30–40°) und entfernte restliches Thionylchlorid durch Abdampfen mit wenig Benzol[42]. Das 15 Min. i. Vak. (KOH) getrocknete und in wenig absol. Chloroform aufgenommene *Säurechlorid* wurde zusammen mit 150 mg in 5 ccm Chloroform gelöstem *L-Threonin-methylester* 15 Stdn. bei 20° gehalten und die dann mit Chloroform verdünnte Reaktionsmischung mit *n* HCl und Wasser gewaschen. Durchlaufchromatographie des Verdampfungsrückstandes aus Chloroform/Aceton (2 : 1) an einer 2 × 20 cm-Säule aus saurem Kieselgel[43] ergab eine Hauptzone, deren Eluat nach Waschen mit Wasser, Filtrieren und Eindampfen zu 82% das aus Äthylacetat/Petroläther umkristallisierbare, gelbrote Produkt lieferte. Schmp. 265–267° (Zers.). Die Analysenprobe trockneten wir 6 Stdn. bei 70° i. Hochvak.

$C_{22}H_{23}N_3O_8$ (457.4) Ber. C 57.77 H 5.08 N 9.19 2 CH_3O 13.6
Gef. C 58.10 H 5.12 N 9.28 CH_3O 13.5

2-Desamino-2-hydroxy-8-deutero-actinocin-dimethylester (**15c**): 100 mg **15a** wurden in 30 ccm 50proz. *Essigsäure*, wie bei **19c** beschrieben, desaminiert [2.5 × 8 cm-Säule aus saurem Kieselgel[43], nachgewaschen mit Chloroform/Äthylacetat (4 : 1)]. Aus Chloroform/Cyclohexan kristallisierte rotes, sich > 200° zersetzendes **15c**. Ausb. 85%. Zur Analyse wurde 16 Stdn. bei 110° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{18}H_{14}DNO_7$ (358.3) Ber. C 60.34 H 4.50 N 3.91 2 CH_3O 17.3
Gef. C 60.29 H 4.23[37] N 4.00 CH_3O 16.9

[2-Desamino-2-hydroxy-actinocin-(α)-yl-(β)-methylester]-L-threonin-methylester (**19c**): 100 mg **19a** in 40 ccm 50proz. *Essigsäure* kochte man 4 Stdn. unter Rückfluß. Die mit Wasser verdünnte Reaktionslösung wurde mit Chloroform/Butanol (4 : 1) extrahiert und der in

[42] Vgl. auch die Chlorierung von Actinocin (**18d**)[7].

[43] Neutrales Kieselgel in 0.1 *n* HCl aufgeschlämmt, abgesaugt und bei 110° bis zur Fließfähigkeit getrocknet.

Chloroform aufgenommene Eindampfrückstand des Extraktes an einer 2.5 × 10 cm-Säule aus saurem Kieselgel[43] chromatographiert. Nachwaschen mit Chloroform und dann Chloroform/Aceton (4 : 1) brachte die Hauptzone ins Filtrat, das – mit angesäuertem (HCl) Wasser gewaschen, filtriert und eingedampft – 80 mg **19c** ergab. Aus Chloroform/Äthylacetat zweimal umkristallisiert; rote Nadeln mit Schmp. 236–238° (Zers.), Ausb. 70%. Zur Analyse wurde 16 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{22}H_{22}N_2O_9$ (458.4) Ber. C 57.64 H 4.84 N 6.11 2 CH_3O 13.5
Gef. C 57.51 H 4.93 N 6.12 CH_3O 14.1

[2-Desamino-2-hydroxy-8-deutero-actinocin-(β)-yl-(α)-methylester]-L-threonin-methylester (**16c**): 125 mg **16a** in 50 ccm 50proz. *Essigsäure* wurden wie **19a** desaminiert und das Rohprodukt aus Chloroform an saurem Kieselgel chromatographiert. Nach Umkristallisieren aus Chloroform/wenig Methanol/Äthylacetat erhielt man 80% **16c**, rote Nadeln mit Schmp. 239–242° (Zers.). Die Analysenprobe wurde 16 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{22}H_{21}DN_2O_9$ (459.4) Ber. C 57.51 H 5.05 N 6.10 2 CH_3O 13.5
Gef. C 57.23 H 4.95 N 6.00 CH_3O 13.2

[2-Desamino-2-hydroxy-actinocinyl]-bis-L-threonin-methylester (**18c**): 150 mg **18a** wurden in 60 ccm 50proz. *Essigsäure* wie **19a** desaminiert. Den mit *n* $NaHCO_3$ sowie angesäuertem (HCl) Wasser gewaschenen und i. Vak. eingedampften Chloroform/Butanol (1 : 1)-Extrakt adsorbierte man aus Chloroform an neutralem Kieselgel („Merck", 0.05–0.20; 2.5 × 12 cm-Säule); Nachwaschen mit Chloroform und Chloroform/Aceton (1 : 1) entfernte restliches **18a** (60 mg). Mit Methanol/Wasser (9 : 1) gelangte **18c** ins Filtrat, dessen Eindampfrückstand in Chloroform/Butanol (5 : 1) gelöst und nach Waschen mit angesäuertem Wasser und Filtrieren aus Chloroform/wenig Methanol/Benzol umkristallisiert wurde. Rote, bei 207–212° (Zers.) schmelzende Nadeln. Ausb. 45%. Für die Analyse trockneten wir 15 Stdn. bei 110° i. Hochvak.

$C_{26}H_{29}N_3O_{11}$ (559.5) Ber. C 55.81 H 5.22 N 7.51 2 CH_3O 11.1
Gef. C 55.89 H 5.40 N 7.55 CH_3O 10.5

8-Deutero-actinocinyl-(α)-[L-threonyl-D-valin-methylester]-(β)-[L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester] (**16b**), *Actinocinyl-(α)-[L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester]-(β)-[L-threonyl-D-valin-methylester]* (**19b**) *sowie 8-Deutero-actinocinyl-bis-[L-threonyl-D-valin-methylester]* (**15b**): Aus 340 mg **13c** und 350 mg *N-[2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester*[19] (**13e**) erhielt man durch Hydrierung, oxydative Kondensation des entstandenen **14b**/**17b**-Gemisches und Trennung der vier Kondensationsprodukte an Cellulose (LS V) – genau wie früher beschrieben[19] – neben 148 mg *Actinocinyl-bis-[L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester]* (**18b**)[19] in etwa gleicher Ausbeute **16b**, **19b** und **15b**.

16b: 140 mg, Schmp. 110–114°, 10 Stdn. bei 75° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{37}H_{49}DN_6O_{12}$ (771.8) Ber. C 57.58 H 6.66 N 10.89 2 CH_3O 8.04
Gef. C 57.79 H 6.75 N 10.68 CH_3O 7.92

19b: 163 mg; identisch mit bekanntem **19b**[19].

15b: 162 mg, Schmp. 111–115°, 10 Stdn. bei 75° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{36}H_{47}DN_6O_{12}$ (757.8) Ber. C 57.06 H 6.52 N 11.09 2 CH_3O 8.19
Gef. C 56.78 H 6.39 N 10.92 CH_3O 8.05

[Actinocin-(α)-yl-(β)-methylester]-[cyclo-(L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl-O_{Thr})] (**25a**) *und [8-Deutero-actinocin-(β)-yl-(α)-methylester]-[cyclo-(L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl-O_{Thr})]* (**24a**): Das durch Hydrierung von 500 mg **12c** und 360 mg *N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-cyclo-[L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-*

sarkosyl-N-methyl-L-valyl-O_{Thr}] (**23d**)[9] mit *Palladium/Kohle* in 100 ccm Methanol entstandene **14a**/**23a**-Gemisch wurde auf 20 ccm eingeengt, mit 180 ccm Dimethylformamid sowie 200 ccm 0.07 *m* Phosphatpuffer pH 7.2 versetzt und unter Rühren bei 80° durch einmalige Zugabe von 3.25 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* in wenig Puffer oxydiert. Bei pH 7.2 (mit 0.5 *n NaOH* eingestellt) rührte man das rasch abgekühlte Gemisch weitere 15 Stdn. bei 20°, extrahierte nach Verdünnen mit viel Wasser mit Chloroform und nahm den Verdampfungsrückstand des mit angesäuertem *(HCl)* Wasser gewaschenen Extraktes in wenig heißem Chloroform auf. Bei langsamer Zugabe einer ca. 10fachen Menge heißen Methanols kristallisierte die Hauptmenge des *8-Deutero-actinocin-dimethylesters* (**15a**) aus (200 mg); der Eindampfrückstand der Mutterlauge wurde aus ca. 100 ccm Oberphase von LS IV – eventuell ausfallendes **15a** abfiltriert – an einer 4.2 × 80 cm-Cellulosesäule chromatographiert. Am Säulenkopf hinterblieben 15 mg desaminierte Produkte (hauptsächlich **15c**), restliches **15a** war im Vorlauf; die 3 Hauptzonen (in Richtung zunehmender R_F-Werte beziffert) eluierte man nach Zerschneiden der Säule mit Methanol und Wasser, extrahierte die mit 0.2 *n* $NaHCO_3$ verdünnten Eluate mit Chloroform und dampfte die mit *n* $NaHCO_3$, 0.1 *n* HCl sowie Wasser gewaschenen, filtrierten Extrakte i. Vak. ein.

Die aus Äthylacetat/Chloroform/Cyclohexan kristallisierenden, roten Rückstände ergaben 50 mg **33b** (Zone I), 110 mg **25a** (Zone II) und 130 mg **24a** (Zone III) mit insgesamt 80% des eingesetzten cyclischen Peptids. Zur Analyse wurde wie oben umkristallisiert.

33b: Schmp. 246–247° (Zers.), in allen Eigenschaften identisch mit *Actinomycin* C_1[9].

25a: Schmp. 218–223° (Zers.), 16 Stdn. bei 90° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{40}H_{51}N_7O_{11}$ (805.9) Ber. C 59.60 H 6.38 N 12.17 1 CH_3O 3.84
Gef. C 59.74 H 6.72 N 11.99 CH_3O 3.75

24a: Schmp. 198–203° (Zers.), wie **25a** getrocknet.

$C_{40}H_{50}DN_7O_{11}$ (806.9) Ber. C 59.53 H 6.49 N 12.15 1 CH_3O 3.84
Gef. C 59.28 H 6.50 N 12.12 CH_3O 4.27

Actinomycin C_1-säure-(β)-methylester (**26b**), *8-Deutero-actinomycin C_1-säure-(α)-methylester* (**26a**) *sowie 8-Deutero-actinomycin C_1-säure-dimethylester* (**26c**): Das durch Hydrieren von 1.03 g **21a** und 1.13 g *N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-benzylester* (**21e**)[8] mit *Palladium/Kohle* in 120 ccm Methanol entstandene **22a**/**22d**-Gemisch wurde in 150 ccm Methanol/0.07 *m* Phosphatpuffer pH 7.2 (1 : 1) unter Rühren mit 2.8 g portionsweise in wenig Puffer hinzugegebenem *Kaliumhexacyanoferrat(III)* bei 20° und pH 7.2 (mit *n* NaOH stets nachreguliert) oxydiert. Nach 15stdg. weiterem Rühren extrahierte man die mit Wasser verdünnte, schwach angesäuerte (HCl) Reaktionsmischung mit Chloroform, wusch den Extrakt mit angesäuertem Wasser und chromatographierte den Eindampfrückstand an einer 4 × 90 cm-Cellulosesäule (LS VI).

Der **26c** enthaltende, mit *n* $NaHCO_3$ ausgeschüttelte und i. Vak. eingedampfte Vorlauf wurde aus Chloroform an einer 3 × 6 cm-Aluminiumoxid-II-säule adsorbiert, mit Chloroform gewaschen und die Hauptzone mit Methanol eluiert. Verdampfen des Methanols, Waschen der Lösung des Rückstandes in Chloroform mit Wasser und Fällen aus Chloroform/Cyclohexan/Petroläther gab 400 mg **26c** als gelbrotes Pulver. – Aus der sehr langsam wandernden Hauptzone, wie unten aufgearbeitet, erhielt man 360 mg *Actinomycin C_1-säure* (**31b**). – Die schneller laufende, sich nicht mehr auftrennende Hauptzone wurde nach Zerschneiden der Säule mit Methanol und Wasser eluiert und der aus dem schwach angesäuerten Eluat erhaltene Chloroformextrakt nach Eindampfen i. Vak. aus Chloroform an einer 2.8 × 9 cm-Säule aus saurem Kieselgel[43] adsorbiert. Chloroform und Chloroform/Aceton (4 : 1)

entfernten die Kresotinsäure, Methanol brachte gelbrotes **26a/26b** ins Eluat, dessen Eindampfrückstand in Chloroform gelöst, mit angesäuertem Wasser gewaschen, filtriert und zweimal aus Chloroform/Petroläther umgefällt wurde. Ausb. 650 mg; Schmp. 161–166°. Molares Ausbeuteverhältnis für **26c** : **31b** : **26a/26b** = 28 : 26 : 46.

26a/26b (1 : 1): 10 Stdn. bei 90° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{63}H_{91}DN_{12}O_{18}$ (1306.5) bzw. $C_{63}H_{92}N_{12}O_{18}$ (1305.5)
Ber. C 57.94 H 7.14 N 12.86 1 CH_3O 2.38
Gef. C 57.69 H 7.35 N 12.31 CH_3O 2.47

26c: Schmp. 145–153°, übrige Eigenschaften: vgl. l. c.[9]. Trocknung wie vorstehend.

$C_{64}H_{93}DN_{12}O_{18}$ (1320.5) Ber. C 58.20 H 7.25 N 12.73 2 CH_3O 4.70
Gef. C 57.95 H 7.15 N 12.66 CH_3O 4.85

Actinocinyl-(α)-[cyclo-(L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl-O_{Thr})]-(β)-[O-acetyl-L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-methylester] (**27b**) *und 8-Deutero-actinocinyl-(α)-[O-acetyl-L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-methylester]-(β)-[cyclo-(L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl-O_{Thr})]* (**27a**): 477 mg **26a/26b** wurden mit 100 ccm *Acetylchlorid/N-Acetyl-imidazol*-Reagenzlösung[8], wie unten für **34a** und **36a** beschrieben, cyclisiert, die von der 2.5 × 7 cm-Aluminiumoxid-IV-säule eluierte Äthylacetatfraktion (347 mg) an einer 3.2 × 60 cm-Cellulosesäule (LS I) getrennt und die beiden Hauptzonen wie unten aufgearbeitet. Die langsamer wandernde ergab nach Fällen aus Chloroform/Petroläther 89 mg **27b**, die schneller laufende 85 mg **27a**, beides gelbrote, amorphe, bei 192–198° schmelzende Pulver. Gesamtausb. (**27a** + **27b**): 36%.

27b: 14 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{65}H_{92}N_{12}O_{18}$ (1329.5) Ber. C 58.72 H 6.97 N 12.65 1 CH_3O 2.33 1 CH_3CO 3.24
Gef. C 58.82 H 7.14 N 12.53 CH_3O 2.26 CH_3CO 4.3 *)

27a: Wie vorstehend getrocknet.

$C_{65}H_{91}DN_{12}O_{18}$ (1330.5) Ber. C 58.67 H 7.05 N 12.64 1 CH_3O 2.33 1 CH_3CO 3.24
Gef. C 58.77 H 7.17 N 12.52 CH_3O 2.41 CH_3CO 4.1 *)

8-Deutero-actinocinyl-bis-[O-acetyl-L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-methylester] (**27c**): 207 mg **26c** wurden mit 65 ccm *Acetylchlorid/N-Acetyl-imidazol*-Reagenzlösung[8], wie für **34a** und **36a** beschrieben, behandelt und aufgearbeitet (2.5 × 3 cm-Aluminiumoxid-IV-Säule, 4 × 25 cm-Cellulosesäule, LS I). Man erhielt nach Umfällen aus Chloroform/Petroläther 52% **27c**, gelbrotes, bei 140–146° schmelzendes Pulver mit $[\alpha]_{578}^{20}$: −136 ± 3° (*c* = 0.22 in Methanol). R_{c_1}-Wert[44]: 1.08, ε_{max} (mμ) in Methanol: 27190 (446), 26100 (427), 46000 (238). – Zur Analyse wurde 15 Stdn. bei 85° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{68}H_{97}DN_{12}O_{20}$ (1404.6) Ber. C 58.14 H 7.10 N 11.97 2 CH_3O 4.42 2 CH_3CO 6.13
Gef. C 58.27 H 7.24 N 11.88 CH_3O 4.15 CH_3CO 6.7 *)

8-Deutero-actinomycin C_1-säure-(β)-lacton-(α)-methylester (**28**) *und Actinomycin C_1-säure-(α)-lacton-(β)-methylester* (**29**)[9]: Aus 210 mg **21a** und 200 mg **23d** erhielt man, wie bereits beschrieben[9], durch Hydrierung, oxydative Mischkondensation und Trennung der Reaktionsprodukte an Cellulose (LS II) je 65 mg **28** (schnell wandernd) und **29** (aus der langsamer laufenden Zone) als gelbrote, amorphe Pulver.

*) Blindwert aus der Acetylbest. von **26c**: 0.4–0.6%.

44) LS III; bezogen auf Actinomycin C_1.

28: Schmp. 228–235° (Zers.), 12 Stdn. bei 100° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{63}H_{89}DN_{12}O_{17}$ (1288.5) Ber. C 58.72 H 7.12 N 13.05 1 CH_3O 2.41
Gef. C 58.85 H 6.80 N 12.77 CH_3O 2.30

Gemisch von 8-Deutero-actinomycin C_3-säure (**30b**), *Actinomycin C_2-säure* (**31a**), *8-Deutero-actinomycin i-C_2-säure* (**30a**) *und Actinomycin C_1-säure* (**31b**)[8]: Das durch Hydrierung von 1.45 g **21c** und 1.4 g **21e**[8] mit *Palladium/Kohle* in 100 ccm Methanol entstandene **22c/22d**-Gemisch wurde in 200 ccm Methanol/0.07 *m* Phosphatpuffer pH 7.2 (1 : 1) unter Rühren mit 3.6 g portionsweise in wenig Puffer zugegebenem *Kaliumhexacyanoferrat(III)* bei pH 7.2 (mit *n* NaOH stets nachreguliert) und 20° oxydiert. Man rührte weitere 15 Stdn., verdünnte dann mit viel angesäuertem (HCl) Wasser und extrahierte mit Chloroform/Butanol (4 : 1). Der Eindampfrückstand des mit angesäuertem Wasser gewaschenen und filtrierten Extraktes wurde in möglichst wenig Methanol gelöst und das **30b/31a/30a/31b**-Gemisch durch Zugabe einer 10fachen Menge Äthylacetat und langsames Einengen bei 40° als gelbrotes Pulver gefällt (1.5 g). Versetzen mit Petroläther gab weitere 0.25 g. Gesamtausb. 83%. Zur Analyse wurde wie oben umgefällt. Schmp. 171–176°; $[\alpha]_D^{20}$: −122 ± 3° (*c* = 0.28 in Methanol); ε_{max} (mμ) (Methanol): 26600 (445), 25500 (427), 42500 (238).

8-Deutero-actinomycin i-C_2 (**32a**)/*Actinomycin C_2* (**33a**) *sowie 8-Deutero-actinomycin C_3* (**32b**) *und Actinomycin C_1*[8] (**33b**): 1.74 g **30a/31a/30b/31b**-Gemisch wurden in 2 Ansätzen mit insgesamt 750 ccm *Acetylchlorid/N-Acetyl-imidazol*-Reagenzlösung[8], wie unten für **34a** und **36a** beschrieben, cyclisiert und das gemeinsam an Aluminiumoxid IV (2.8 × 14 cm-Säule) vorgereinigte Reaktionsgemisch an einer 4.3 × 90 cm-Cellulosesäule (LS III) getrennt. Aufarbeitung der 3 Hauptzonen, ebenfalls wie unten, ergab **33b** (Zone I, in Richtung zunehmender R_F-Werte beziffert), **32a/33a** (Zone II) und **32b** (Zone III), alle aus Chloroform/wenig Methanol/Cyclohexan umkristallisiert.

32a/33a (1 : 1): 123 mg, rote Nadeln, Schmp. 237–242° (Zers.), 24 Stdn. bei 115° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{63}H_{87}DN_{12}O_{16}$ (1270.5) bzw. $C_{63}H_{88}N_{12}O_{16}$ (1269.5) Ber. C 59.58 H 7.03 N 13.23
Gef. C 58.97 H 7.16 N 13.08

32b: 58 mg, rote Nadeln, Schmp. 238–241° (Zers.), Trocknung wie vorstehend.

$C_{64}H_{89}DN_{12}O_{16}$ (1284.5) Ber. C 59.84 H 7.14 N 13.08 Gef. C 59.48 H 7.22 N 12.97

Im übrigen mit nativem *Actinomycin C_3*[8] identisch.

33b: 67 mg rote Nadeln, Schmp. 245–247° (Zers.), in allen Eigenschaften mit nativem *Actinomycin C_1*[8] identisch.

8-Deutero-actinomycin i-C_2-säure-(β)-lacton (**34a**), *Actinomycin C_2-säure-(α)-lacton* (**36a**) *sowie 8-Deutero-actinomycin C_3-säure* (**30b**) *und Actinomycin C_1* (**33b**): Das aus 282 mg *N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-cyclo-[L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl-O_{Thr}]* (**23d**)[9] und 880 mg **21c** (2.7facher Überschuß) durch Hydrieren mit *Palladium/Kohle* in 60 ccm Methanol entstandene **23a/22c**-Gemisch wurde in 120 ccm Methanol/0.07 *m* Phosphatpuffer pH 7.2 (1 : 1) mit 1.6 g portionsweise in wenig Puffer zugegebenem *Kaliumhexacyanoferrat(III)* bei 20° und pH 7.2 (mit 0.2 *n* NaOH stets nachreguliert) oxydiert. Nach 15stdg. Rühren extrahierte man die mit viel Wasser und wenig 2*n* HCl verdünnte Reaktionsmischung mit Chloroform/Butanol (3 : 1), wusch den Extrakt mit angesäuertem (HCl) Wasser und chromatographierte den Eindampfrückstand an einer 4.2 × 90 cm-Cellulosesäule (LS VIII).

*) Blindwert aus der Acetylbest. **2** von **26c**: 0.4–0.6.

Dem **33b** enthaltenden Vorlauf wurde durch Schütteln mit *n* $NaHCO_3$ die Kresotinsäure entzogen und der Verdampfungsrückstand (i. Vak.) aus Chloroform an einer 2 × 6 cm-Aluminiumoxid-IV-säule adsorbiert. Nachwaschen mit Chloroform entfernte Nebenprodukte, mit Äthylacetat gelangte die Hauptmenge ins Filtrat, dessen Eindampfrückstand nach Waschen mit Wasser, Filtrieren und Umkristallisieren aus Äthylacetat/Cyclohexan 48 mg **33b** ergab.

Die 3 Hauptzonen (in Richtung zunehmender R_F-Werte beziffert) wurden nach Zerschneiden der Säule mit Methanol und Wasser eluiert, die mit angesäuertem (HCl) Wasser verdünnten Eluate mit Chloroform extrahiert und die Verdampfungsrückstände (i. Vak.) der Extrakte ebenfalls aus Chloroform an 2.5 × 10 cm-Säulen aus saurem Kieselgel[43] adsorbiert. Nachwaschen mit viel Chloroform [bei **30b** Chloroform/Aceton (4 : 1)] entfernte die Kresotinsäure; die roten, i. Vak. eingeengten Methanol-Eluate wurden nach Zugabe von Chloroform mit angesäuertem Wasser gewaschen, filtriert und zur Trockne gedampft. Der Rückstand aus Zone I ließ sich aus wenig Methanol durch Zugabe von viel Äthylacetat und langsames Einengen bei 40° umfällen: 265 mg gelbrotes, amorphes **30b**, aus der Mutterlauge mit Petroläther weitere 102 mg. Die Rückstände aus den Zonen II und III lieferten nach Umfällen aus Chloroform/Cyclohexan je 145 mg **36a** bzw. **34a** als gelbrote amorphe Pulver.

34a (Zone III): Schmp. 199–207° (Zers.). Zur Analyse 15 Stdn. bei 90° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{63}H_{89}DN_{12}O_{17}$ (1288.5) Ber. C 58.72 H 7.12 N 13.05
Gef. C 58.74 H 7.12 N 12.96 Mol.-Gew. 1239 *)

36a (Zone II): Schmp. 202–210° (Zers.). Trocknung wie vorstehend.

$C_{63}H_{90}N_{12}O_{17}$ (1287.5) Ber. C 58.77 H 7.05 N 13.06
Gef. C 58.66 H 7.18 N 12.85 Mol.-Gew. 1255 *)

30b: Schmp. 180–195°, in den Eigenschaften mit *Actinomycin C_3-säure*[8] identisch. Zur Analyse wie vorstehend getrocknet.

$C_{64}H_{93}DN_{12}O_{18}$ (1320.5) Ber. C 58.20 H 7.25 N 12.73 Gef. C 58.34 H 7.41 N 12.58

8-Deutero-actinomycin C_1-säure-(β)-lacton (**34b**) *und Actinomycin C_1-säure-(α)-lacton* (**36b**) *sowie 8-Deutero-actinomycin C_1-säure* (**30c**) *und Actinomycin C_1* (**33b**): Aus 480 mg **21b** und 120 mg **23d**[9] erhielt man durch Hydrierung und Oxydation mit 0.8 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)*, wie oben für **34a**/**36a** beschrieben (4.5 × 70 cm-Cellulosesäule, LS VIII), neben 19 mg krist. **33b** (Vorlauf) und 220 mg **30c** (aus Zone I) 65 mg **36b** (Zone II) und 55 mg **34b** (Zone III).

34b: Schmp. 207–212° (Zers.). Zur Analyse 10 Stdn. bei 80° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{62}H_{87}DN_{12}O_{17}$ (1274.5) Ber. C 58.42 H 7.04 N 13.19 Gef. C 58.09 H 7.10 N 13.22

36b: Schmp. 203–207° (Zers.), Analysentrocknung wie vorstehend.

$C_{62}H_{88}N_{12}O_{17}$ (1273.4) Ber. C 58.47 H 6.97 N 13.20 Gef. C 58.79 H 7.00 N 12.95

30c: Schmp. 180–194° (Zers.), Analysentrocknung wie vorstehend.

$C_{62}H_{89}DN_{12}O_{18}$ (1292.5) Ber. C 57.61 H 7.04 N 13.00 Gef. C 57.46 H 6.96 N 12.78

Im übrigen ist **30c** mit *Actinomycin C_1-säure* (**31b**)[8] identisch.

8-Deutero-actinomycin i-C_2 (**35** ~ **2b**) *und Actinomycin C_2* (**1b**)

a) *Reagenzlösung*[8,31]: Zu 24.5 g *Imidazol* („Fluka", reinst) in 300 ccm absol. Tetrahydrofuran fügte man unter Rühren bei 20° 12.8 ccm *Acetylchlorid*, rührte 1 Stde. bei 55° und saugte

*) Potentiometrische Titration mit 0.02 *n* NaOH.

rasch vom Niederschlag ab. Das warme Filtrat wurde unter Rühren mit weiteren 19.2 ccm *Acetylchlorid* versetzt, noch 1 Stde. bei 55° gerührt und danach vom hellgelben Niederschlag dekantiert.

b) *Cyclisierung:* Zu 115 mg **34a** und 115 mg **36a** – jeweils in 5 ccm warmem, absol. Tetrahydrofuran gelöst – gab man je 30 ccm der noch warmen (55°) *Reagenzlösung*, hielt 2 Stdn. bei 55° und dampfte dann i. Vak. ein. Die in Chloroform aufgenommenen, mit angesäuertem (HCl) Wasser und *n* $NaHCO_3$ gewaschenen Rohprodukte wurden nach Verdampfen des Chloroforms aus Benzol an zwei 2.3 × 3 cm-Aluminiumoxid-IV-säulen adsorbiert und mit Benzol gewaschen; Äthylacetat eluierte die Actinomycine. Zur weiteren Reinigung chromatographierte man sie an zwei 2.8 × 25 ccm-Cellulosesäulen (LS III), eluierte die jeweilige Hauptzone nach Zerschneiden der Säulen mit Methanol und Wasser und extrahierte die mit 0.2*n* $NaHCO_3$ verdünnten Eluate mit Chloroform. Die Verdampfungsrückstände der mit *n* $NaHCO_3$, 0.1 *n* HCl und Wasser gewaschenen und filtrierten Extrakte gaben nach zweimaligem Umkristallisieren aus Chloroform/wenig Methanol/Cyclohexan die beiden reinen *aniso-Actinomycine* **35** und **1b**.

35: Ausb. 67%, Schmp. 242–245° (Zers.). Trocknung der Analysenprobe 16 Stdn. bei 115° i. Hochvak.

$C_{63}H_{87}DN_{12}O_{16}$ (1270.5) Ber. C 59.56 H 7.06 N 13.23 Gef. C 59.32 H 7.06 N 13.33

1b: Ausb. 55%, Schmp. 243–247° (Zers.), Trocknung wie vorstehend.

$C_{63}H_{88}N_{12}O_{16}$ (1269.5) Ber. C 59.61 H 6.99 N 13.25 Gef. C 59.45 H 6.88 N 13.29

8-Deutero-actinomycin C_1 und Actinomycin C_1 (**33b**) *aus* **34b** *und* **36b**: Je 30 mg **34b** und **36b** wurden, wie oben für **34a**, **36a** beschrieben, mit 10 ccm *Reagenzlösung* cyclisiert und gaben nach Aufarbeitung der Reaktionsgemische (2 × 12 cm-Cellulosesäulen, LS III) 16 mg *Actinomycin C_1* (aus **36b**) und 19 mg *8-Deutero-actinomycin C_1* (aus **34b**) als rote, bei 242–246° (Zers.) schmelzende Nadeln.

[99/70]