

*Hans Brockmann, Helmut Lackner, Rolf Mecke, Sigmund von Grunelius,
Hans-Siegward Petras und Hans Detlef Berndt*

Actinomycine, XXVII¹⁾; Synthesen von Actinomycinen und actinomycin-
ähnlichen Chromopeptiden, II¹⁾

Actinocinyl-bis-peptide

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 8. Juni 1966)

■ Fünf Actinocinyl-bis-peptide (**8**, **9**, **11**, **12**, **24**) wurden synthetisiert, deren vier bzw. sechs Aminosäuren die gleiche Struktur, Konfiguration und Sequenz haben wie in den C-Actinomycinen. Drei der neuen Verbindungen sind identisch mit Abbauprodukten aus Actinomycin C₁, C₂ und C₃.

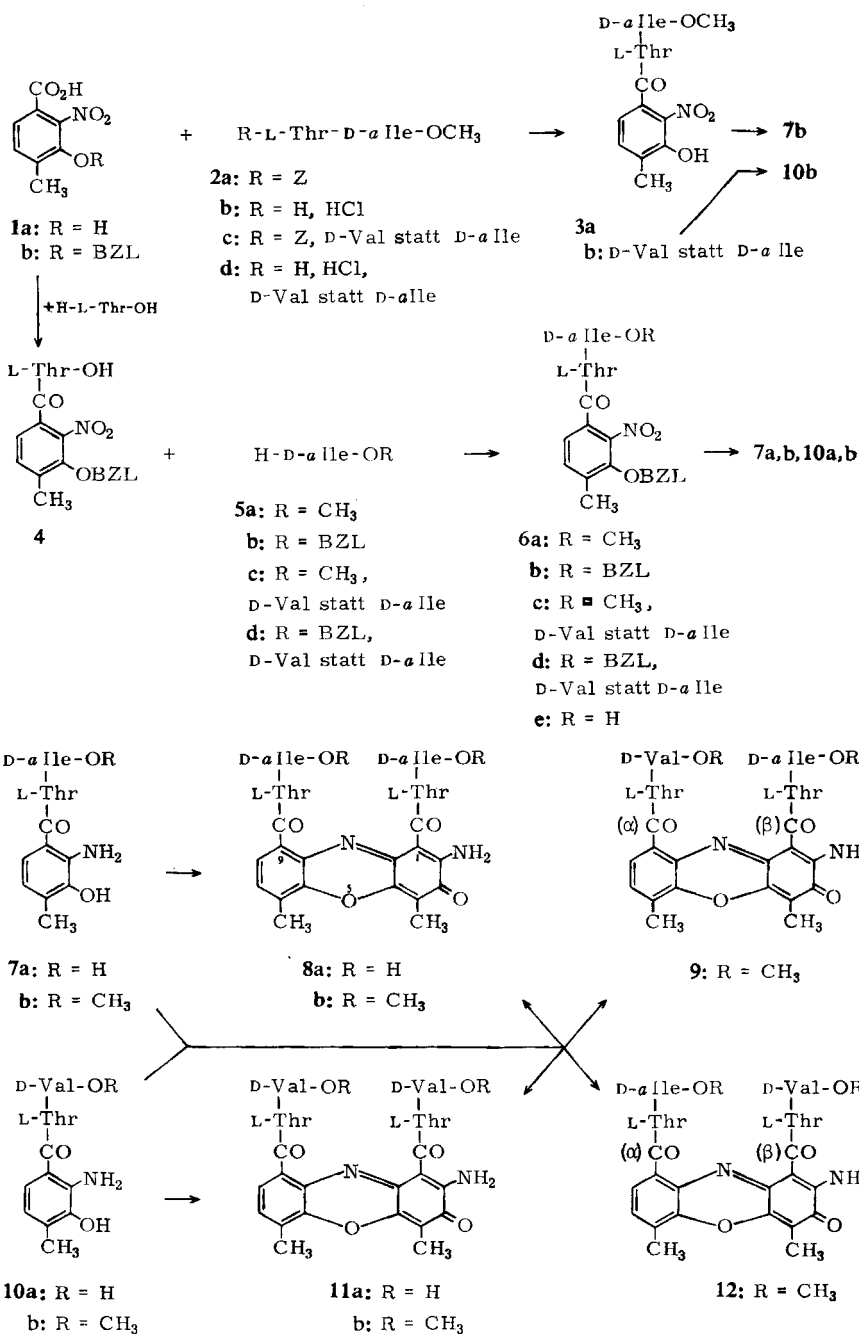
■ Die hier beschriebenen Actinocinyl-bis-peptide, deren vier und sechs Aminosäuren die gleiche Struktur, Konfiguration und Sequenz haben wie in den Actinomycinen C₁ bzw. C₂ oder C₃, wurden aus zweierlei Gründen synthetisiert: 1. um durch ihren Vergleich mit Actinomycin-Abbauprodukten deren Konstitution zu beweisen und 2. um zu sehen, ob sie geeignete Zwischenprodukte zur Totalsynthese von Actinomycinen sind²⁾.

Actinocinyl-bis-[L-threonyl-D-*allo*-isoleucin] (**8a**)³⁾ und dessen Methylester **8b**, den wir brauchten, um ein Abbauprodukt des Actinomycins C₃ zu identifizieren, unterscheiden sich von Actinocinyl-bis-L-threonin¹⁾ dadurch, daß ihre L-Threonin-Reste mit D-*allo*-Isoleucin bzw. dessen Methylester verbunden sind. Um sie der Actinocinyl-bis-L-threonin-Synthese analog aufzubauen, mußte demnach N-[2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonyl-D-*allo*-isoleucin (**7a**) bzw. dessen Methylester **7b** oxydativ mit sich selbst kondensiert werden; d. h. als Vorprodukte der luftempfindlichen und daher ohne Isolierung weiter zu verarbeitenden Aminophenole **7a** und **7b** waren die Nitroverbindungen **3a**, **6a** und **6b** erforderlich. Sie wurden dargestellt: 1. Durch Kupplung der 2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure (**1a**) mit L-Threonyl-D-*allo*-isoleucin-methylester und 2. durch Verknüpfung von N-[2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonin bzw. dessen Benzyläther **4** mit D-*allo*-Isoleucin-methylester (**5a**) oder dem Benzylester **5b**.

¹⁾ XXVI. und I. Mitteil.: *H. Brockmann, H. Lackner, R. Mecke, G. Troemel und H.-S. Petras*, Chem. Ber. **99**, 717 (1966).

²⁾ Vorl. Mitteil. über Totalsynthesen von Actinomycinen: *H. Brockmann und H. Lackner*, Naturwissenschaften **47**, 230 (1960); **48**, 555 (1961); **51**, 384, 435 (1964); Tetrahedron Letters [London] **1964**, 3517, 3523.

³⁾ Im Gegensatz zu früheren Mitteilungen beziffern wir jetzt die Atome des Phenoxazins nach dem Ring Index 1960 (Nr. 3290).



Der erste Weg hat den Vorteil, daß das aus Benzyloxycarbonyl-L-threonin, D-allo-Isoleucin-methylester und Dicyclohexylcarbodiimid zu 75% erhältliche **2a** und das aus **1a**, **2b** und Dicyclohexylcarbodiimid zu 75% gewonnene **3a** gut kristallisieren. Die chromatographische Reinigung von **3a** wird durch die Adsorptionsaffinität der Hydroxygruppe erleichtert. Statt **1a** dessen Benzyläther **1b** zu verwenden, ist nur nötig, wenn man **3a** über eine Säurechlorid-Kupplung darstellen will.

Der zweite Weg empfahl sich, weil **4** als Zwischenprodukt aller bisherigen Actinomycin-synthesen²⁾ gut zugänglich gemacht ist¹⁾. Aus **4** und **5a** erhielten wir mit Dicyclohexylcarbodiimid zu 50% amorphes **6a** und auf gleiche Weise aus **4** und **5b** zu 55% den kristallisierten Benzylester **6b**.

Katalytische Hydrierung von **6b** mit Pd/Kohle in Methanol führte zu **7a**, das in der Reaktionslösung bei pH 7.2 mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxydiert wurde. Das zu 90% angefallene Actinocinyl-bis-[L-threonyl-D-allo-isoleucin] (**8a**) kristallisierte in gelbroten Nadeln mit Schmp. 222° und $[\alpha]_D^{20}$: $-96 \pm 3^\circ$. Auf gleichem Wege kamen wir von **6a** aus in 75-proz. Ausbeute zum amorphen, gelbroten Methylester **8b** mit $[\alpha]_D^{20}$: $-73 \pm 3^\circ$ ⁴⁾.

Anhand der R_F -Werte, des Elektronen- und IR-Spektrums sowie der spezif. Drehung wurde ein aus Actinomycin C₃ durch kombinierte Säure- und Alkali-Hydrolyse gewonnenes und dann verestertes Abbauprodukt als **8b** identifiziert und so bewiesen, daß in beiden Peptid-lacton-Ringen des Actinomycins C₃ das am Actinocin (**13a**) sitzende L-Threonin mit D-allo-Isoleucin verknüpft ist⁵⁾.

Analog zur Darstellung von **3a** und **6a** erhielten wir: 1. Aus **1a** und kristallisiertem Benzyloxycarbonyl-L-threonyl-D-valin-methylester (**2c**) kristallisiertes **3b** und 2. aus **4** und D-Valin-methylester (**5c**) bzw. D-Valin-benzylester (**5d**) amorphes **6c** bzw. kristallisiertes **6d**.

6d lieferte, katalytisch hydriert und dann bei pH 7.2 mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxydiert, zu 90% kristallisiertes, gelbrotes Actinocinyl-bis-[L-threonyl-D-valin] (**11a**) mit Schmp. 235–238° und $[\alpha]_D^{20}$: $-76 \pm 2^\circ$. Aus **6c** entstand auf gleichem Wege zu 80% der amorphe Methylester **11b** mit $[\alpha]_D^{20}$: $-57 \pm 2^\circ$.

Anhand der spezif. Drehung, der R_F -Werte sowie des Elektronen- und IR-Spektrums wurde ein durch kombinierte Säure- und Alkali-Hydrolyse aus Actinomycin C₁ gewonnenes und dann verestertes Abbauprodukt mit **11b** identifiziert⁶⁾, ein Beweis, daß in beiden Peptidlactonringen von Actinomycin C₁ das am Actinocin (**13a**) stehende L-Threonin mit D-Valin verbunden ist.

Um zu entscheiden, ob ein durch kombinierte Säure- und Alkali-Hydrolyse aus Actinomycin C₂ entstandenes und dann verestertes Abbauprodukt⁶⁾ nach **9** oder **12** zu formulieren ist, mußten diese beiden Actinocinyl-bis-peptide und ihre Methylester dargestellt werden, was durch eine die Konstitution beweisende Synthese nur schwer zu erreichen ist. Einfacher schien es, durch oxydative Misch-Kondensation von **7b**

⁴⁾ Die spezif. Drehung wurde bei allen hier beschriebenen Actinocinylpeptiden in Methanol gemessen, statt wie früher in Chloroform. In Chloroform hängt sie stark von der Menge des zur Stabilisierung zugesetzten Alkohols ab.

⁵⁾ H. Brockmann und P. Boldt, Naturwissenschaften **46**, 262 (1959).

⁶⁾ H. Brockmann, P. Boldt und H.-S. Petras, Naturwissenschaften **47**, 62 (1960); durch ein Versehen wurde hier für **11a** $[\alpha]_D^{20}$: $-93 \pm 9^\circ$ angegeben statt $+90 \pm 3^\circ$ ($c = 0.2$, in Chlf. p. a., E. Merck).

und **10b** zum Ziel zu kommen, was voraussetzte, daß sich die beiden Stellungsisomeren **9** und **12** 1. voneinander und von den gleichzeitig entstehenden Actinocinyl-bis-peptidestern **8b** und **11b** trennen und 2. eindeutig den Formeln **9** und **12** zuordnen lassen. Beides ist gelungen.

Katalytische Hydrierung eines Gemisches aus kristallisiertem **3a** und **3b** und anschließende Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) lieferte ein Gemisch von Actinocinyl-bis-peptid-methylestern, das sich an Cellulosesäulen im System tert.-Amylalkohol/Dibutyläther/10-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat (1 : 2 : 3) in drei Fraktionen auftrennen ließ. Die am langsamsten wandernde wurde durch ihre R_F -Werte als **11b** identifiziert, die schnellste als **8b**. Daß demnach die amorphe, gelbrote Fraktion aus der mittleren Chromatogramm-Zone das Gemisch aus **9** und **12** sein mußte, bestätigten die Analysenzahlen und der Gehalt an 2 Mol Threonin und je 1 Mol Isoleucin und Valin⁷⁾.

In Analogie zu den *aniso*-Actinomycinen mit zwei verschiedenen Peptidringen⁸⁾ kennzeichnen wir bei *aniso*-Actinocinyl-peptiden den zum benzoiden Ring des Actinocins (**13a**) gehörenden Peptidteil mit α und den anderen mit β . **9** heißt dann Actinocinyl- α -[L-threonyl-D-valin-methylester]- β -[L-threonyl-D-*allo*-isoleucin-methylester] und **12** ist Actinocinyl- α -[L-threonyl-D-*allo*-isoleucin-methylester]- β -[L-threonyl-D-valin-methylester]. Der Actinomycin-Nomenklatur⁹⁾ entsprechend wäre **9** abgekürzt zu schreiben: Actinocinyl-L-Thr- $\overset{\text{D-Val-OCH}_3}{\underset{\text{D-*alle*-OCH}_3}{|}}$ und **12** Actinocinyl-L-Thr- $\overset{\text{D-*alle*-OCH}_3}{\underset{\text{D-Val-OCH}_3}{|}}$ ¹⁰⁾.

Die chromatographische Trennung von **9** und **12** gelang zuerst an 2-m-Cellulose-Säulen im System Butanol/Dibutyläther/Dipropyläther/15-proz. Natrium-*m*-kresotinat (2 : 1 : 7 : 10) nach 150stdg. Laufzeit¹¹⁾. Die Inhaltstoffe der beiden Hauptzonen gaben auf **9** bzw. **12** passende Analysenzahlen, stimmten, wie zu erwarten, im Elektronenspektrum überein und zeigten nur geringe Unterschiede im IR-Spektrum. Mit dem gleichen Lösungsmittelsystem lassen sich **9** und **12** auch im 35-cm-Ring-Papierchromatogramm trennen.

Eine einfachere chromatographische Trennung von **8b**, **9**, **11b** und **12** gelang später in tert.-Amylalkohol/Dibutyläther/10-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat (3 : 8 : 11), ein System, mit dem wir die Actinocinyl-bis-dipeptidester-Ausbeuten bei der oxydativen Kondensation äquimolarer Mengen **7b** und **10b** überprüft haben, ohne das **8b/9/11b/12**-Gemisch vor der Chromatographie umzufällen. Die vier Komponenten ließen sich an einer 150-cm-Cellulose-Säule bei einer Laufzeit von etwa 150 Stdn. in einem Arbeitsgang trennen. Die Ausbeuten, bezogen auf das **7b/10b**-Gemisch, betrugen: 26% **11b**, 19% **8b** und je 22% **9** und **12**. Für **9** fanden wir $[\alpha]_D^{20}$: $-73 \pm 2^\circ$ und für **12** $[\alpha]_D^{20}$: $-60 \pm 2^\circ$ (beide in Methanol). Die Reihenfolge der Zonen war die gleiche wie im System Butanol/Dibutyläther/Dipropyläther/15-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat.

⁷⁾ Aminosäureanalysen nach H. Brockmann und J. H. Manegold, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **343**, 86 (1965).

⁸⁾ H. Brockmann und H. Muxfeldt, Chem. Ber. **91**, 1242 (1958).

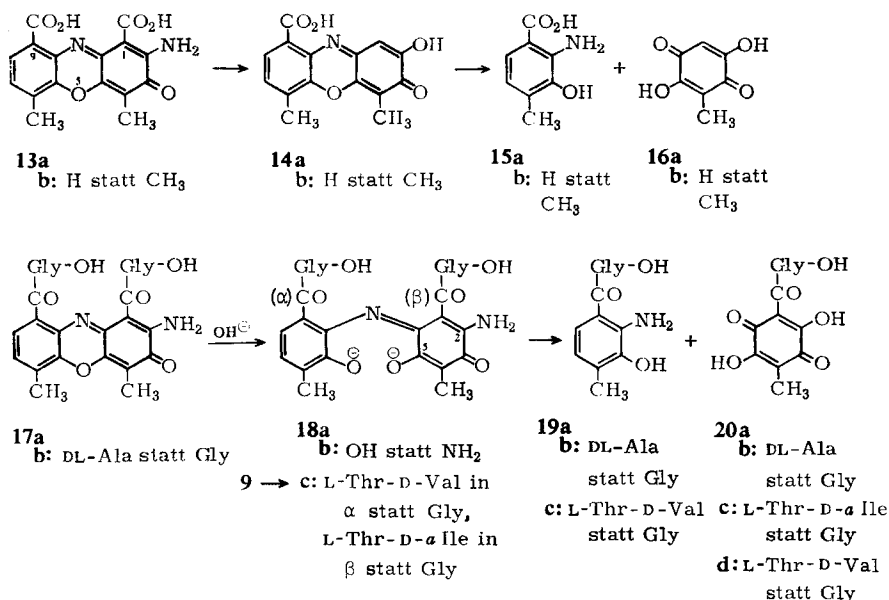
⁹⁾ H. Brockmann, Angew. Chem. **72**, 939 (1960).

¹⁰⁾ Oben die zum α -Peptidrest, unten die zum β -Peptidrest gehörende Aminosäure.

¹¹⁾ H. Brockmann und H.-S. Petras, Naturwissenschaften **48**, 218 (1961).

Die Zuordnung der beiden Actinocinyl-peptide zu den Formeln **9** und **12** gelang anhand von Abbauprodukten der Alkalihydroxid-Spaltung¹¹⁾. Grundlage dafür waren folgende Befunde.

2-Amino-phenoxazon-(3)-dicarbonsäure-(1.9) (**13b**)³⁾ wird durch *n* Alkalihydroxid bei Raumtemperatur in kurzer Zeit zu 2-Hydroxy-phenoxazon-(3)-carbonsäure-(9) (**14b**) abgebaut und diese bei 70° zu 3-Hydroxy-anthranilsäure (**15b**) und 2.5-Dihydroxy-benzochinon (**16b**)¹²⁾. Das gleiche gilt für Actinocin (**13a**), den Chromophor der Actinomycine. Mit 2-proz. wäbr. Natriumhydroxid gab **13a** bei Raumtemperatur nach 7 Tagen zu 90% Actinocinin (**14a**)⁸⁾ und nach 50 Tagen zu 35% kristallisiertes 2.5-Dihydroxy-toluchinon (**16a**).



Verknüpfung der Actinocin-carboxygruppen mit Aminosäuren erleichtert die Spaltung des Phenoxazon-Heteroringes. Mit 33-proz. methanol. *n* NaOH erhielten wir aus Actinocinyl-bis-glycin (**17a**) bei Raumtemperatur nach 4 Tagen zu 40% eine hellgelbe, kristallisierte Verbindung C₁₀H₉NO₇ vom Schmp. 222–223°, aus der beim Erhitzen mit konz. Salzsäure Glycin freigesetzt wurde. Ihre in 0.1 *n* NaOH und 0.1 *n* HCl gemessene Absorptionskurve war der von 2.5-Dihydroxy-benzochinon (**16b**) ähnlich. Die Kurve der potentiometrischen Titration in 70-proz. Methanol zeigte durch zwei Wendepunkte nach Verbrauch von 2 bzw. 1 Äquivalent 0.1 *n* NaOH das Vorliegen von drei sauren Gruppen. Eine ähnliche Kurve mit zwei Wendepunkten nach Verbrauch von je 1 Äquivalent 0.1 *n* NaOH gab 2.5-Dihydroxy-benzochinon (**16b**). Diesen Befunden nach mußte das Abbauprodukt *N*-[3.6-Dihydroxy-2.5-dioxo-4-methyl-2.5-dihydro-benzoyl]-glycin (**20a**) sein.

¹²⁾ A. Butenandt, J. Keck und G. Neubert, Liebigs Ann. Chem. **602**, 61 (1957).

Aus dem Alkali-Hydrolysat von **17a** ließ sich nach Abtrennung von **20a** papierchromatographisch eine farblose, im UV-Licht gelbgrün fluoreszierende Verbindung mit den R_F -Werten von authentischem **19a**¹³⁾ isolieren, die bei Säurehydrolyse Glycin lieferte.

Ebenso wie **17a** verhielt sich Actinocinyl-bis-DL-alanin (**17b**). Im Alkali-Hydrolysat fanden wir eine hellgelbe, kristallisierte Verbindung $C_{11}H_{11}NO_7$ vom Schmp. 210–213°, die bei Totalhydrolyse mit konz. Salzsäure Alanin lieferte, im Elektronen-Spektrum **20a** glich und damit als *N*-[3,6-Dihydroxy-2,5-dioxo-4-methyl-2,5-dihydro-benzoyl]-DL-alanin (**20b**) charakterisiert war.

Der Alkali-Abbau von **13a** zu **15a** und **16a** beginnt nach *Butenandt, Biekert und Neubert*¹⁴⁾ mit einer hydrolytischen Öffnung des Heteroringes zwischen Sauerstoff und dem chinoiden Ring, die in saurer Lösung reversibel ist. Das gleiche gilt für die Actinomycine¹⁵⁾ und demnach auch für **17a**. Das so aus **17a** entstandene **18a** wird dann hydrolytisch zu **18b** desaminiert und dieses als Tautomeres eines *N*-substituierten Amino-hydroxy-benzochinons (mit Chinon-sauerstoff an C-2 und C-5) zu **19a** und **20a** hydrolysiert.

In Analogie dazu war bei der Alkalisplaltung von **9** und **12** das Dipeptidderivat **20c** bzw. **20d** zu erwarten, vorausgesetzt, der Heteroring reagiert schneller als die Peptidbindung. Um zu sehen, ob dies zutrifft, haben wir zunächst ein **9/12**-Gemisch abgebaut, das überwiegend das Isomere mit dem kleineren R_F -Wert enthielt. Nach 72 stdg. Einwirkung von 1.5 *n* NaOH in 50-proz. Methanol bei 40° waren zwei gelbe Abbauprodukte entstanden, die sich an der Cellulosesäule im System Isoamylalkohol/Citronensäure-Phosphatpuffer pH 5.0 (1:1) glatt trennten. Das mit dem kleineren R_F -Wert und der Menge nach überwiegende mit der Summenformel $C_{18}H_{24}N_2O_9$, gelbe Kristalle vom Schmp. 187–188°, zeigte in verd. Säure und verd. Alkalihydroxid ein ähnliches Elektronenspektrum wie **20a**, gab bei Hydrolyse mit konz. Salzsäure Threonin und *allo*-Isoleucin und war damit als *N*-[3,6-Dihydroxy-2,5-dioxo-4-methyl-2,5-dihydro-benzoyl]-L-threonyl-D-*allo*-isoleucin (**20c**) charakterisiert. Das andere, in viel geringerer Menge angefallene, glich **20c** im Elektronenspektrum, lieferte jedoch bei Totalhydrolyse Threonin und Valin und erwies sich damit als *N*-[3,6-Dihydroxy-2,5-dioxo-4-methyl-2,5-dihydro-benzoyl]-L-threonyl-D-valin (**20d**). Die Ausbeuten waren erheblich niedriger als die an **20a** und **20b** beim Abbau von **17a** und **17b**. Das Ausbeuteverhältnis von **20c** und **20d** entsprach ungefähr der Zusammensetzung des eingesetzten **9/12**-Gemisches.

Anschließend wurde das bei der Chromatographie langsamer wandernde der beiden Isomeren **9** und **12** (von oben gezählt 2. Zone des **8b/9/11b/12**-Gemisches) in gleicher Weise mit 1.5 *n* NaOH in 50-proz. Methanol abgebaut wie das **9/12**-Gemisch. Dabei trat nur ein gelbes Dipeptidderivat auf, das im Schmp., Misch-Schmp., R_F -Wert und IR-Spektrum mit **20c** übereinstimmte. Die im Chromatogramm langsamer wandernde Komponente des **9/12**-Gemisches ist demnach **9** und die andere **12**.

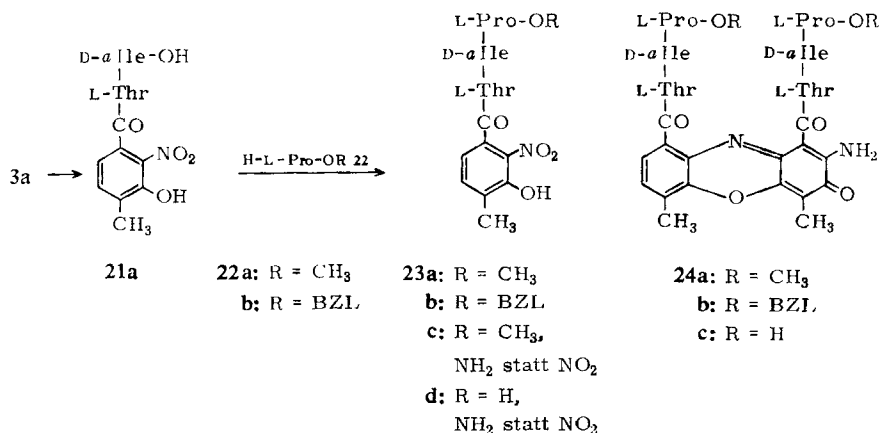
Das oben erwähnte, veresterte Actinomycin C_2 -Abbauprodukt war mit **9** identisch⁶⁾ und zeigte damit, daß der D-*allo*-Isoleucinrest des Actinomycins C_2 in dessen β -Peptidlactongruppe steht.

¹³⁾ Zugänglich durch katalytische Hydrierung des bei der Darstellung von **17a** als Zwischenprodukt verwendeten *N*-[2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-glycin-benzylesters.

¹⁴⁾ A. *Butenandt*, E. *Biekert* und G. *Neubert*, Liebigs Ann. Chem. **603**, 200 (1957).

¹⁵⁾ S. G. *Angyal*, E. *Bullock*, W. G. *Hanger*, W. C. *Howell* und A. W. *Johnson*, J. chem. Soc. [London] **1957**, 1592.

Das Actinocinyl-bis-tripeptid **24a** mit gleicher Aminosäure-Sequenz wie im Actinomycin C₃ sollte als Vergleichssubstanz das Auffinden von Actinocinyl-bis-tripeptiden in Partialhydrolysaten von Actinomycin C₃ und solchen Actinomycinen erleichtern, die statt Prolin andere Aminosäuren enthalten. Das für die oxydative Kondensation benötigte **23a** bzw. **23b** aus **4** und D-*allo*-Isoleucyl-L-prolin-methylester oder -benzylester aufzubauen, bewährte sich nicht. Bei Verwendung von Dicyclohexylcarbodiimid oder Woodwards Reagenz entstanden schwer zu entfernende Nebenprodukte, die, falls nicht abgetrennt, sondern mit **23a** oder **23b** zusammen reduziert, bei der anschließenden oxydativen Kondensation mit **23c** bzw. **23d** reagierten. Infolgedessen lag die Ausbeute an Actinocinyl-bis-tripeptid, bezogen auf **23a** bzw. **23b**, nur bei 30–40%.



Besser war es, **3a** in *n* NaOH/Isopropylalkohol (1:2) zu **21a** zu verseifen und dieses mit Dicyclohexylcarbodiimid und L-Prolin-methylester (**22a**) oder dem Benzylester **22b** zu **23a** bzw. **23b** zu kondensieren. Katalytische Hydrierung von **23b** bzw. **23a** und anschließende Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) lieferte, bezogen auf **23b** bzw. **23a**, zu etwa 75% amorphes, gelbrotes Actinocinyl-bis-[L-threonyl-D-*allo*-isoleucyl-L-prolin] (**24c**) mit $[\alpha]_D^{20}$: $-141 \pm 3^\circ$ bzw. dessen Methylester **24a**.

Hydriert man **23b** mit Raney-Nickel nur bis zur Aufnahme von 3 Mol Wasserstoff, so wird die Benzylloxycarbonylgruppe nicht angegriffen und bei der oxydativen Kondensation entsteht in guter Ausbeute der Benzylester **24b**. Es gelang nicht ohne weiteres, **24b** durch Hydrierung in **24c** überzuführen. Die nach Dehydrierung der Leukoverbindung erhaltenen Produkte zeigten nicht das Absorptionsspektrum des Actinocinylrestes.

Ein chromatographischer Vergleich mit **24a** und **24c** ergab, daß Actinomycin C₃-Hydrolysate neben Actinocinyl-bis-dipeptid **8a** kein Actinocinyl-bis-tripeptid **24c** enthielten.

Wie eingangs erwähnt, sollte durch die vorstehenden Synthesen auch geklärt werden, ob die fünf Actinocinyl-bis-peptide geeignete Zwischenprodukte für Actinomycin-Synthesen sind. Geplant war, sie entweder stufenweise mit den erforderlichen Aminosäuren oder in einem Arbeitsgang mit den entsprechenden Dipeptiden bzw. Tripeptiden zu „Actinomycin-des-säuren“¹⁶⁾ bzw. Actinomycinsäuren¹⁷⁾ zu verknüpfen, um

¹⁶⁾ H. Brockmann und W. Sunderkötter, *Naturwissenschaften* **47**, 229 (1960).

¹⁷⁾ H. Brockmann und J. H. Manegold, *Naturwissenschaften* **51**, 383 (1964).

die anfangs unergiebig oxydative Kondensation auf eine möglichst frühe Synthesestufe zu verlegen. Erfolg haben wir damit nicht gehabt. Schon bei der Umsetzung von **8a** mit L-Prolinester und Dicyclohexylcarbodiimid reagierte bevorzugt nur einer der beiden *allo*-Isoleucinreste, und bei Versuchen, durch Kupplung von **24c** mit Sarkosinester zur „Actinomycin C₃-des-säure“¹⁶⁾ zu kommen, war die Ausbeute enttäuschend gering. Rationelle Actinomycin-Synthesen sind demnach nur möglich, wenn die oxydative Kondensation auf die vorletzte oder letzte Synthesestufe verlegt wird, eine Bedingung, die nicht mehr erschwerend wirkt, seit sich die Ausbeuten bei der oxydativen Kondensation auf 80–90% erhöhen ließen.

Danach sowie nach den Ergebnissen dieser Arbeit lag es nahe, die „Actinomycin C₃-des-säure“ und Actinomycin C₃-säure über **23a** als Zwischenprodukt aufzubauen, d. h. dieses nach Freisetzen der Carboxygruppe mit Sarkosin und anschließend mit *N*-Methyl-L-valin zu kuppeln und dann nach Reduktion oxydativ zu kondensieren. Wir haben diesen Weg nicht gewählt, sondern fanden es vorteilhafter, von **4** aus durch Kupplung mit dem entsprechenden Tripeptid bzw. Tetrapeptid zu den „Des-säuren“ und Actinomycinsäuren zu kommen. Darüber wird in der nächsten Mitteilung im Zusammenhang mit der Totalsynthese von Actinomycinen ausführlicher berichtet.

Bei der Durchführung der Versuche erfreuten wir uns der geschickten und unermüdlichen Mitarbeit von Frau Margitta Köppler.

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

Beschreibung der Versuche

Benzoyloxycarbonyl-L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester (2a): Zu 3.8 g *Benzoyloxycarbonyl-L-threonin* in 20 ccm Methylenchlorid gab man eine Lösung von 2.75 g *D-allo-Isoleucin-methylester-hydrochlorid* und 2.1 ccm *Triäthylamin* in 300 ccm Methylenchlorid, versetzte bei 0° mit 3.3 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in wenig Methylenchlorid und rührte 2 Stdn. bei 0° sowie 12 Stdn. bei 20°. Die vom Dicyclohexylharnstoff abfiltrierte, mit 0.1 *n* HCl, *n* NaHCO₃ und Wasser gewaschene Reaktionslösung verdampfte man i. Vak., nahm in wenig Aceton auf, filtrierte bei 0° restlichen Dicyclohexylharnstoff ab und kristallisierte das nach Verdampfen des Acetons hinterbliebene **2a** zweimal aus Äthylacetat/Cyclohexan um. Farblose Kristalle vom Schmp. 96°¹⁸⁾. Ausb. 75%. $[\alpha]_D^{20}$: $-1.8 \pm 0.2^\circ$ ($c = 1.3$, in Methanol).

C₁₉H₂₈N₂O₆ (380.4) Ber. C 59.99 H 7.42 N 7.36 Gef.* C 60.24 H 7.39 N 7.52

* Getrocknet 8 Stdn. bei 65° i. Hochvak.

L-Threonyl-D-allo-isoleucin-methylester-hydrochlorid (2b): Eine Lösung von 3.8 g **2a** in 90 ccm Methanol wurde nach Zugabe von 10.0 ccm *n* HCl und Palladium-A-Kohle in strömendem Wasserstoff aushydriert. Nach Verdampfen der vom Katalysator abfiltrierten Lösung hinterblieb **2b** als farbloses, bei 70–80° zerfließendes Pulver. Ausb. 98%. $[\alpha]_D^{20}$: $+19.1 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1.5$, in Methanol).

C₁₁H₂₃N₂O₄Cl (282.8) Ber. C 46.71 H 8.20 Cl 12.54 N 9.91
Gef.* C 46.99 H 8.32 Cl 12.34 N 9.89

* Getrocknet 8 Stdn. bei 55° i. Hochvak.

¹⁸⁾ Alle Schmp. sind auf dem Kofler-Block bestimmt und korrigiert.

Benzyloxycarbonyl-L-threonyl-D-valin-methylester (2c): Zu 2.53 g *Benzyloxycarbonyl-L-threonin* in 15 ccm Methylenchlorid gab man eine Lösung von 1.68 g *D-Valin-methylesterhydrochlorid* und 1.39 ccm *Triäthylamin* in 25 ccm Methylenchlorid und versetzte bei 0° mit 2.16 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in wenig Methylenchlorid. Aufarbeitung wie bei **2a** gab **2c**; aus Äthylacetat/Cyclohexan farblose Kristalle vom Schmp. 123°. Ausb. 78%. $[\alpha]_D^{20}$: +4.7 ± 0.3° ($c = 1.1$, in Methanol).

$C_{18}H_{26}N_2O_6$ (366.4) Ber. C 59.00 H 7.15 N 7.65 Gef.*) C 59.39 H 7.17 N 7.83

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

L-Threonyl-D-valin-methylester-hydrochlorid (2d): Eine Lösung von 2.3 g **2c** in 60 ccm Methanol wurde nach Zugabe von 6.1 ccm n HCl und Palladium-A-Kohle in strömendem Wasserstoff aushydriert. Beim Verdampfen der vom Katalysator abfiltrierten Lösung hinterblieb **2d** als weißes, bei 60–80° zerfließendes Pulver. Ausb. 1.74 g. $[\alpha]_D^{20}$: +30 ± 1° ($c = 1.4$, in Methanol).

$C_{10}H_{21}N_2O_4Cl$ (268.7) Ber. C 44.70 H 7.88 Cl 13.19 N 10.43

Gef.*) C 44.50 H 7.96 Cl 13.02 N 10.27

*) Getrocknet 8 Stdn. bei 55° i. Hochvak.

N-[2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester (3a): Eine Mischung von 0.6 g *2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure (1a)* und 0.85 g **2b** in 25 ccm Methylenchlorid versetzte man bei 0° mit 0.42 ccm *Triäthylamin*, gab 0.65 g in wenig Methylenchlorid gelöstes *Dicyclohexylcarbodiimid* hinzu und rührte 2 Stdn. bei 0° sowie 12 Stdn. bei 20°. Die vom Dicyclohexylharnstoff abfiltrierte, mit 0.1 n HCl und Wasser gewaschene Reaktionslösung verdampfte man i. Vak., nahm den Rückstand in wenig Aceton auf, filtrierte bei 0° restlichen Dicyclohexylharnstoff ab und chromatographierte den Verdampfungsrückstand der Acetonlösung aus Chloroform an einer 3 × 15 cm-Säule aus neutralem Kieselgel¹⁹⁾. Nachwaschen mit Chloroform entfernte Nebenprodukte. Das mit Chloroform/Aceton (4:1) eluierte **3a** wurde zweimal aus Chloroform/Methanol/Cyclohexan umkristallisiert. Hellgelbe Nadeln vom Schmp. 112°. $[\alpha]_D^{20}$: -5.2 ± 0.3° ($c = 0.7$, in Methanol). Ausb. 73%.

$C_{19}H_{27}N_3O_8$ (425.4) Ber. C 53.70 H 6.40 N 9.88 1 OCH₃ 7.30

Gef.*) C 53.85 H 6.50 N 10.04 OCH₃ 7.10

*) Getrocknet 8 Stdn. bei 85° i. Hochvak.

N-[2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonyl-D-valin-methylester (3b): Zu einer Mischung von 0.6 g *2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure (1a)* und 0.82 g **2d** in 30 ccm Methylenchlorid gab man 0.42 ccm *Triäthylamin*, versetzte bei 0° mit 0.65 g in wenig Methylenchlorid gelöstem *Dicyclohexylcarbodiimid* und rührte 2 Stdn. bei 0° sowie 12 Stdn. bei 20°. Weitere Behandlung des Ansatzes wie bei **3a**. Aus Methanol/Chloroform/Cyclohexan hellgelbe Nadeln vom Schmp. 202°. Ausb. 70%. $[\alpha]_D^{20}$: +2.2 ± 0.2° ($c = 1.2$, in Methanol).

$C_{18}H_{25}N_3O_8$ (411.4) Ber. C 52.55 H 6.13 N 10.22 1 OCH₃ 7.54

Gef.*) C 52.59 H 6.09 N 10.21 OCH₃ 7.39

*) Getrocknet 8 Stdn. bei 85° i. Hochvak.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester (6a)

a) Zu einer Lösung von 2.72 g *D-allo-Isoleucin-methylester-hydrochlorid* und 2.10 ccm *Triäthylamin* in 80–100 ccm Methylenchlorid gab man 5.83 g *N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonin (4)*¹⁾, versetzte bei 0° mit 3.24 g in wenig Methylenchlorid gelöstem *Dicyclohexylcarbodiimid* und rührte 2 Stdn. bei 0° sowie 12 Stdn. bei 20°. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffes verdampfte man die mit 0.1 n HCl und n NaHCO₃ gewaschene Reaktionslösung i. Vak., nahm den Rückstand in wenig Aceton auf, filtrierte bei 0° restlichen Dicyclohexylharnstoff ab und chromatographierte den Verdampfungsrückstand der Aceton-

¹⁹⁾ H. Brockmann und W. Müller, Chem. Ber. **91**, 1920 (1958).

lösung aus Benzol an einer 3.8×30 cm-Säule aus saurem Kieselgel¹⁹. Nachwaschen mit Benzol entfernte Nebenprodukte; die Hauptmenge an **6a** gelangte mit Chloroform ins Filtrat. Den Verdampfungsrückstand der Chloroformlösung nahm man in wenig Chloroform auf, wusch mit Wasser, filtrierte durch ein Hartfilter und erhielt **6a** nach Verdampfen des Lösungsmittels als gelbliches Pulver. Ausb. 48%. $[\alpha]_D^{20}$: $-1.5 \pm 0.2^\circ$ ($c = 1.3$, in Methanol).

$C_{26}H_{33}N_3O_8$ (515.6) Ber. C 60.57 H 6.45 N 8.15 1 OCH₃ 6.02

Gef. *) C 60.44 H 6.48 N 8.23 OCH₃ 6.29

*) Getrocknet 8 Stdn. bei 60° i. Hochvak.

b) Aus **2b** und dem Säurechlorid von **1b**: 3 g **1b** erhitzte man mit 10 ccm Thionylchlorid 5 Min. zum Sieden, verdampfte i. Vak., entfernte restliches Thionylchlorid durch Abdampfen mit absol. Chloroform, nahm das hinterbliebene, über KOH getrocknete Chlorid von **1b** in wenig Chloroform auf und versetzte mit einer Lösung von 2.2 g **2b** und 1.1 g Triäthylamin in 20 ccm Chloroform. Die nach 15 Stdn. mit 0.1 n HCl, n NaHCO₃ und Wasser gewaschene Reaktionslösung hinterließ, i. Vak. verdampft, amorphes, gelbliches **6a**. Ausb. 80%.

Verseifung von **6a** zu **6e**: Eine Lösung von 4 g **6a** in 80 ccm 50-proz. methanol. 0.4 n NaOH hielt man 45 Min. bei Raumtemperatur, verdampfte bei 35° i. Vak., löste den Rückstand in 150 ccm Wasser und schüttelte zweimal mit Äther durch. Das beim Ansäuern der wäßr. Phase ausfallende **6e** wurde in Äther aufgenommen und hinterblieb beim Verdampfen der über Na₂SO₄ getrockneten Ätherphase als gelbliches Pulver, das aus Äthylacetat/Petroläther umgefällt wurde. Ausb. 80%.

$C_{25}H_{31}N_3O_8$ (501.5) Ber. N 8.38 Gef. N 8.10

Reduktion, Oxydation und Aufarbeitung, wie unten für die Darstellung von **8a** aus **6b** beschrieben, gab zu 92% reines **8a**.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-valin-methylester (**6c**): **6c** wurde in gleicher Weise gewonnen wie **6a**. Der Ansatz bestand aus 2.02 g *D*-Valin-methylester-hydrochlorid, 1.67 ccm Triäthylamin, 4.66 g **4**, 2.59 g Dicyclohexylcarbodiimid und 80 ccm Methylenchlorid. — Man erhielt **6c** aus dem Chloroform-Eluat des Chromatogrammes als amorphes gelbliches Pulver. Ausb. 51%. $[\alpha]_D^{20}$: $+5.5 \pm 0.3^\circ$ ($c = 1.3$, in Methanol).

$C_{25}H_{31}N_3O_8$ (501.5) Ber. C 59.87 H 6.23 N 8.38 1 OCH₃ 6.19

Gef. *) C 60.09 H 6.27 N 8.47 OCH₃ 6.24

*) Getrocknet 8 Stdn. bei 60° i. Hochvak.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-allo-isoleucin-benzylester (**6b**): Zu einer Lösung von 2.57 g *D*-allo-Isoleucin-benzylester-hydrochlorid und 1.39 ccm Triäthylamin in 60 ccm Methylenchlorid gab man 3.88 g **4**, versetzte bei 0° mit 2.16 g in wenig Methylenchlorid gelöstem Dicyclohexylcarbodiimid und rührte 2 Stdn. bei 0° sowie 12 Stdn. bei 20°. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffes wurde das Filtrat mit 0.1 n HCl, n NaHCO₃ und Wasser gewaschen, der Eindampfrückstand in wenig Aceton aufgenommen und erneut ausgefallener Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Das nach Verdampfen des Acetons hinterbliebene **6b** wurde zweimal aus Äthylacetat/Cyclohexan umkristallisiert. Farblose Kristalle vom Schmp. 121°. Ausb. 3.1 g (55%). $[\alpha]_D^{20}$: $-2.1 \pm 0.2^\circ$ ($c = 1.2$, in Methanol).

$C_{32}H_{37}N_3O_8$ (591.7) Ber. C 64.96 H 6.31 N 7.10 Gef. *) C 65.07 H 6.50 N 7.18

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

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-valin-benzylester (**6d**): Eine Lösung von 1.7 g *D*-Valin-benzylester-hydrochlorid und 0.97 ccm Triäthylamin in 45 ccm Methylenchlorid versetzte man nach Zugabe von 2.72 g **4** bei 0° mit 1.52 g in wenig Methylenchlorid gelöstem Dicyclohexylcarbodiimid und rührte 2 Stdn. bei 0° sowie 12 Stdn. bei 20°. Weitere Behandlung des Ansatzes wie bei **6b**. Aus dem Rohprodukt erhielt man **6d** nach zweimaligem

Umkristallisieren aus Äthylacetat/Cyclohexan als farbloses Kristallpulver vom Schmp. 100°. Ausb. 1.8 g. $[\alpha]_D^{20}$: $+3.2 \pm 0.3^\circ$ ($c = 0.9$, in Methanol).

$C_{31}H_{35}N_3O_8$ (577.7) Ber. C 64.46 H 6.11 N 7.28 Gef.* C 64.79 H 5.95 N 7.31

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

Actinocinyl-bis-[L-threonyl-D-allo-isoleucin] (**8a**): Eine Lösung von 0.77 g **6b** in 40 ccm Methanol wurde mit Palladium-A-Kohle aushydriert, filtriert und nach Einengen auf 20 ccm mit 40 ccm 0.07 *m* Phosphatpuffer (pH 7.2) versetzt. Unter Rühren versetzte man portionsweise mit einer Lösung von 1.3 g *Kaliumhexacyanoferrat*(III) in wenig Puffer, hielt dabei mit *n* NaOH stets bei pH 7.2 und rührte weitere 12 Stdn. Nach Verdünnen mit viel Wasser wurde mit Chloroform/Butanol (3:1) extrahiert, der Extrakt mit angesäuertem Wasser gewaschen und das Lösungsmittel i. Vak. verdampft. Durch Lösen des Rückstandes in wenig Methanol und Fällen mit Benzol und Cyclohexan erhielt man **8a** als orangefarbenes Pulver, das aus wäßr. Methanol in feinen gelbroten Nadeln vom Schmp. 222° kristallisierte. Ausb. 91%. $[\alpha]_D^{20}$: $-96 \pm 3^\circ$ ($c = 0.17$, in Methanol).

$C_{36}H_{48}N_6O_{12}$ (756.8) Ber. C 57.13 H 6.39 N 11.10 Gef.* C 56.83 H 6.54 N 10.99

Äquiv.-Gew.: Ber. 378 Gef. 386 (Titration mit 0.05 *n* NaOH in 50-proz. Methanol)

*) Getrocknet 15 Stdn. bei 120° i. Hochvak.

Actinocinyl-bis-[L-threonyl-D-valin] (**11a**): Eine Lösung von 578 mg **6d** in 40 ccm Methanol behandelte man, wie für **8a** beschrieben. Oxydiert wurde mit 1.0 g *Kaliumhexacyanoferrat*(III). Man erhielt **11a** als feine, rote Nadeln vom Schmp. 235–238°. Ausb. 90%. $[\alpha]_D^{20}$: $-76 \pm 2^\circ$ ($c = 0.15$, in Methanol).

$C_{34}H_{44}N_6O_{12}$ (728.8) Ber. C 56.04 H 6.04 N 11.47 Gef.* C 55.60 H 6.28 N 11.41

Äquiv.-Gew.: Ber. 364 Gef. 371 (Titration mit 0.05 *n* NaOH in 50-proz. Methanol)

*) Getrocknet 15 Stdn. bei 120° i. Hochvak.

Actinocinyl-bis-[L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester] (**8b**): Eine Lösung von 942 mg **6a** in 50 ccm Methanol wurde mit Palladium-A-Kohle aushydriert, filtriert, auf 30 ccm eingeeengt und mit 0.07 *m* Phosphatpuffer (pH 7.2) bis zur beginnenden Trübung verdünnt. Unter Rühren versetzte man anteilweise mit einer gesättigten Lösung von 1.85 g *Kaliumhexacyanoferrat*(III) in 0.07 *m* Puffer, hielt mit *n* NaOH stets bei pH 7.2 und rührte 12 Stdn. bei 20°. Nach Zugabe von 300 ccm Wasser wurde mit Chloroform extrahiert und der Verdampfungsrückstand der mit angesäuertem Wasser gewaschenen Chloroformphase an einer 3 × 50 cm-Cellulosesäule im System Butanol/Dibutyläther/10-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat²⁰⁾ (2:3:5) chromatographiert. Die aus der Säule herausgeschnittene Hauptzone eluierte man abwechselnd mit Methanol und Wasser, verdünnte das Eluat mit Wasser und *n* NaHCO₃, extrahierte mit Chloroform und erhielt das beim Verdampfen des Chloroforms hinterbliebene **8b** durch Umfällen aus Chloroform/Cyclohexan als gelbrotes, bei 105–109° schmelzendes Pulver. Ausb. 75%. $[\alpha]_D^{20}$: $-73 \pm 3^\circ$ ($c = 0.22$, in Methanol).

$C_{38}H_{52}N_6O_{12}$ (784.8) Ber. C 58.15 H 6.68 N 10.71 2 OCH₃ 7.91

Gef.* C 57.66 H 6.80 N 10.43 OCH₃ 7.59

*) Getrocknet 6 Stdn. bei 80° i. Hochvak.

Actinocinyl-bis-[L-threonyl-D-valin-methylester] (**11b**): Darstellung analog der von **8b** aus 1.04 g **6c**. Oxydiert wurde mit 2.1 g *Kaliumhexacyanoferrat*(III). Aus Chloroform/Cyclohexan gelbrotes, bei 109–112° schmelzendes Pulver. Ausb. 81%. $[\alpha]_D^{20}$: $-57 \pm 2^\circ$ ($c = 0.23$, in Methanol).

$C_{36}H_{48}N_6O_{12}$ (756.8) Ber. C 57.14 H 6.39 N 11.10 2 OCH₃ 8.19

Gef.* C 56.60 H 6.38 N 10.87 OCH₃ 7.91

*) Getrocknet 6 Stdn. bei 80° i. Hochvak.

²⁰⁾ Alle in dieser Arbeit verwendeten Natrium-*m*-kresotinat-Lösungen waren mit *m*-Kresotinsäure gesättigt.

Actinocinyl- α -[L-threonyl-D-valin-methylester]- β -[L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester] (9) und *Actinocinyl- α -[L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester]- β -[L-threonyl-D-valin-methylester]* (12) sowie **8b** und **11b**: Eine Lösung von 350 mg **3a** und 340 mg **3b** in 60 ccm Methanol wurde in Gegenwart von Palladium-A-Kohle aushydriert (**7b**, **10b**), filtriert, auf 40 ccm eingengt und bis kurz vor Trübung mit 0.07 *m* Phosphatpuffer pH 7.2 verdünnt. Unter Rühren versetzte man teilweise mit 1.8 g *Kaliumhexacyanoferrat*(III) in 10 ccm Puffer, hielt mit *n* NaOH stets bei pH 7.2 und rührte noch 12 Std., wobei das Kondensationsprodukt ausfiel. Man nahm es nach Verdünnen mit Wasser in Chloroform auf und chromatographierte den Verdampfungsrückstand der mit angesäuertem Wasser gewaschenen Chloroformphase an einer 4.5×150 cm-Cellulosesäule im System tert.-Amylalkohol/Dibutyläther/10-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat (3:8:11)²⁰. Die vier gut getrennten, aus der Säule herausgeschnittenen Zonen (in der Reihenfolge ansteigender R_F -Werte beziffert) wurden abwechselnd mit Methanol und Wasser eluiert und die Eluate nach Verdünnen mit 0.1 *n* NaHCO₃ mit Chloroform/Butanol (3:1) extrahiert. Die Verdampfungsrückstände der mit *n* NaHCO₃ gewaschenen Auszüge chromatographierte man aus Benzol an vier 3×15 cm-Säulen aus saurem Kieselgel, wusch mit Benzol und Chloroform nach und eluierte den Hauptanteil des Adsorbierten mit Aceton. Die Eindampfrückstände der vier Acetoneluate nahm man in wenig Chloroform auf, wusch mit angesäuertem Wasser, filtrierte, verdampfte i. Vak. und erhielt durch Umfällen der Rückstände aus Chloroform/Cyclohexan die Actinocinylpeptide als orangefarbene Pulver.

11b: Zone 1, Ausb. 193 mg (26%). $[\alpha]_D^{20}$: $-58 \pm 2^\circ$ ($c = 0.16$, in Methanol); Schmp. 111–115°.

$C_{36}H_{48}N_6O_{12}$ (756.8) Ber. C 57.14 H 6.39 N 11.10 2 OCH₃ 8.19
Gef.* C 57.45 H 6.51 N 10.71 OCH₃ 8.11

9: Zone 2, Ausb. 172 mg (22%). $[\alpha]_D^{20}$: $-73 \pm 2^\circ$ ($c = 0.15$, in Methanol); Schmp. 110 bis 114°.

$C_{37}H_{50}N_6O_{12}$ (770.8) Ber. C 57.66 H 6.53 N 10.91 2 OCH₃ 8.05
Gef.* C 57.55 H 6.60 N 10.85 OCH₃ 8.03

12: Zone 3, Ausb. 173 mg (22%). $[\alpha]_D^{20}$: $-60 \pm 2^\circ$ ($c = 0.16$, in Methanol); Schmp. 110–115°.

$C_{37}H_{50}N_6O_{12}$ (770.8) Ber. C 57.66 H 6.53 N 10.91 2 OCH₃ 8.05
Gef.* C 58.01 H 6.73 N 10.68 OCH₃ 7.99

8b: Zone 4, Ausb. 148 mg (19%). $[\alpha]_D^{20}$: $-75 \pm 2^\circ$ ($c = 0.15$, in Methanol); Schmp. 105–110°.

$C_{38}H_{52}N_6O_{12}$ (784.8) Ber. C 58.15 H 6.67 N 10.71 2 OCH₃ 7.91
Gef.* C 58.44 H 6.79 N 10.76 OCH₃ 7.82

* Getrocknet 10 Std. bei 90° i. Hochvak.

Präparate mit $\epsilon_{445} < 26000$ (Methanol) adsorbierte man aus Chloroform an einer 2.5×8 cm-Aluminiumoxid II-Säule, wusch mit Chloroform, Äthylacetat und Aceton nach und verarbeitete das Methanoleluat der gelben Hauptzone, wie oben für das Acetoneluat der Kieselgelsäule beschrieben.

Abbau von Actinocin (13a) zu Actinocinin (14a) und 2.5-Dihydroxy-toluchinon (16a)

a) 190 mg **13a** in 50 ccm 2-proz. wäßr. Natriumhydroxid hielt man 7 Tage bei Raumtemperatur unter Stickstoff, säuerte die dunkelrote Lösung an (CO₂-Entwicklung) und kristallisierte das ausgefallene **14a** (Ausb. 90%) aus Dimethylformamid um. Rote Kristalle, deren IR-Spektrum mit dem einer authent. Probe von Actinocinin⁸⁾ übereinstimmte.

b) Eine 50 Tage bei Raumtemperatur gehaltene rote Lösung von 190 mg **13a** in 2-proz. wäßr. Natriumhydroxid wurde angesäuert, vom ausgefallenen **14a** (15 mg) abfiltriert und mit

Äthylacetat extrahiert. Den Rückstand des Äthylacetatauszuges chromatographierte man aus Chloroform an neutralem Kieselgel und erhielt aus dem eingengten Eluat der gelben, schnell ins Filtrat wandernden Zone 40 mg kristallisiertes **16a** (35%), das aus Methanol umkristallisiert und durch IR-Spektrum identifiziert wurde.

Actinocinyl-bis-glycin (17a): Zu 5.0 g **1a** in 50 ccm Methylenchlorid/Tetrahydrofuran (1:1) gab man 5.1 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in 25 ccm Methylenchlorid sowie 4.7 g frisch aus dem benzolsulfonsauren Salz freigesetzten *Glycin-benzylester* in 15 ccm Methylenchlorid. Nach 5 Stdn. wurde der auskristallisierte Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, mit Methylenchlorid gewaschen, das Filtrat i. Vak. eingengt und der hinterbliebene *N-[2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-glycin-benzylester* aus Methanol unter Zusatz von Kohlepulver umkristallisiert. Blaßgelbe Nadeln vom Schmp. 135°.

Eine Lösung von 3.8 g des *Benzylesters* in 50 ccm Methanol wurde mit Raney-Nickel bis zur Sättigung hydriert, vom Katalysator abfiltriert und verdampft. Zur Lösung des Rückstandes in 150 ccm Phosphatpuffer (pH 7.4) tropfte man unter Rühren eine Lösung von 7.5 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* in 75 ccm Wasser und filtrierte nach 3 Stdn. das kristallin ausgefallene **17a** ab. Aus Eisessig feine, rote Nadeln, die sich ab 280° zersetzen.

$C_{20}H_{18}N_4O_8$ (442.4) Ber. C 54.30 H 4.10 N 12.67 Gef. C 54.68 H 4.37 N 12.43

Abbau von Actinocinyl-bis-glycin (17a) zu N-[3,6-Dihydroxy-2,5-dioxo-4-methyl-2,5-dihydro-benzoyl]-glycin (20a): Eine Lösung von 720 mg **17a** in 75 ccm 33-proz. methanol. *n* NaOH und 25 ccm Methanol hielt man unter Stickstoff vier Tage bei Raumtemperatur. Aus der anfangs braunen, später roten Lösung kristallisierte rotes Natriumsalz von **20a**, dessen Abscheidung durch 25 ccm Methanol und Aufbewahren bei 0° vervollständigt wurde (150 mg). Umkristallisieren des Natriumsalzes aus 2*n* HCl lieferte **20a**, gelbe Nadeln vom Schmp. 222–223°.

$C_{10}H_9NO_7$ (255.2) Ber. C 47.06 H 3.65 N 5.49 Gef. C 47.66 H 3.62 N 5.18

Aus der vom Natriumsalz abfiltrierten roten Lösung ließen sich nach Ansäuern noch 30 mg **20a** extrahieren (Gesamtausbe. 40%). Die wäbr. Phase brachte man mit 2*n* NaOH auf pH 5.0, verdampfte unter Stickstoff zur Trockene, extrahierte den Rückstand mit heißem Aceton und fraktionierte den Rückstand des Acetonauszuges ringchromatographisch im System Butanol/Propanol/Wasser (1:2:1). Dabei bildete sich neben mehreren braunen Zonen eine farblose, im UV-Licht gelbgrün fluoreszierende mit dem gleichen *R_F*-Wert wie *N-[2-Amino-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-glycin (19a)*. Der Inhaltstoff dieser Zone gab mit konz. Salzsäure (110°/8 Stdn.) ein Hydrolysat, in dem sich papierchromatographisch *Glycin* nachweisen ließ.

Abbau von Actinocinyl-bis-DL-alanin (17b)²¹⁾ zu N-[3,6-Dihydroxy-2,5-dioxo-4-methyl-2,5-dihydro-benzoyl]-DL-alanin (20b): Eine Lösung von 300 mg **17b** in 40 ccm 50-proz. methanolischem 0.4*n* NaOH hielt man unter Luftabschluß vier Tage bei Raumtemperatur, säuerte an, extrahierte mit Äthylacetat und verdampfte die gewaschene, über Natriumsulfat entwässerte Äthylacetatphase zur Trockene. Als der Rückstand in 4 ccm Methanol aufgenommen und mit 4 ccm verd. Salzsäure versetzt wurde, schied sich **20b** in gelben Kristallen (90 mg) ab. Schmp. 210–213° (aus Eisessig).

$C_{11}H_{11}NO_7$ (269.2) Ber. C 49.07 H 4.12 N 5.20 Gef. C 48.99 H 4.33 N 4.68

Alkalisplaltung eines Gemisches aus 9 und 12: Die mit Stickstoff gesättigte Lösung von 500 mg eines Gemisches von **9** und **12** im Verhältnis 8:1 in 100 ccm 50-proz. methanol.

²¹⁾ Zugänglich durch Verseifung von Actinocinyl-bis-[DL-alanin-methylester]; H. Lackner, Dissertat. Univ. Göttingen 1961.

1.5*n* NaOH hielt man drei Tage bei 40° unter Stickstoff, destillierte nach Ansäuern mit Salzsäure das Methanol i. Vak. ab und extrahierte die wäBr. Lösung dreimal mit je 50 ccm Äthylacetat. Die vereinigten Auszüge wurden mit verd. Salzsäure gewaschen, bis sie im UV-Licht nicht mehr fluoreszierten, mit Wasser durchgeschüttelt und i. Vak. verdampft. Den Rückstand chromatographierte man im System Isoamylalkohol/Citronensäure-Phosphatpuffer pH 5.0 (1 : 1) an Cellulosepulver, wobei sich neben braunen Zonen zwei gut getrennte, gelbrote Zonen bildeten (beziffert in der Reihenfolge der R_F -Werte). Zur weiteren Reinigung wurden die Inhaltstoffe der beiden Zonen aus Benzol unter Nachwaschen mit 30-proz. Essigsäure an einer 2 × 20 cm-Säule von Aluminiumoxid (Woelm, Aktivität I), chromatographiert. Der Inhaltstoff von Zone I (20c) kristallisierte aus Benzol/Petroläther in gelben Nadeln vom Schmp. 187–188°. Im Totalhydrolysat (konz. Salzsäure, 12 Stdn., 110°) waren papierchromatographisch *Threonin* und *allo-Isoleucin* nachzuweisen.

$C_{18}H_{24}N_2O_9$ (412.3) Ber. C 52.43 H 5.87 N 6.79 Gef. C 52.65 H 6.04 N 6.70

Die Substanzmenge aus Zone 2 reichte nur aus zur Messung der Absorptionskurve und zur Totalhydrolyse, bei der *Threonin* und *Valin* gefunden wurden.

Alkalisplaltung von 9: Eine Lösung von 250 mg Inhaltstoff aus Zone 2 [gewonnen bei chromatographischer Trennung eines 8b/9/11b/12-Gemisches im System Butanol/Dibutyläther/Dipropyläther/10-proz. wäBr. Natrium-*m*-kresotinat (2 : 1 : 7 : 10) an einer 5 × 200 cm-Cellulosesäule, Laufzeit 170 Stdn.] in 50 ccm 1.5*n* wäBr.-methanol. (1 : 1) Natriumhydroxid hielt man 3 Tage unter Stickstoff bei 40° und arbeitete wie bei der Alkalisplaltung des 9/12-Gemisches auf. An der Cellulosesäule trat neben braunen Zonen nur eine gelbrote auf, deren Inhaltstoff im Schmp., Misch-Schmp., Elektronenspektrum und R_F -Wert mit 20c übereinstimmte.

N-[2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-*allo*-isoleucin (21a): Eine Lösung von 1.03 g 3a in 9.7 ccm Isopropylalkohol hielt man nach Zugabe von 4.85 ccm *n* NaOH 90 Min. bei 20° und verdünnte mit der zehnfachen Menge Wasser. Nach zweimaligem Ausschütteln mit Chloroform wurde die wäBr. Phase mit 6.1 ccm *n* HCl angesäuert, erschöpfend mit Äthylacetat extrahiert und der Extrakt zweimal mit angesäuertem Wasser gewaschen. Nach Filtrieren und Abdampfen des Äthylacetats i. Vak. hinterblieb 21a als blaßgelbes Pulver. Ausb. 95%. $[\alpha]_D^{20}$: $-20 \pm 1^\circ$ ($c = 1.16$, in Methanol).

$C_{18}H_{25}N_3O_8$ (411.4) Ber. C 52.55 H 6.13 N 10.02 Gef.* C 52.31 H 6.21 N 10.15

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

N-[2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-*allo*-isoleucyl-*L*-prolin-methylester (23a): Zu einer Mischung von 0.653 g 21a und 0.27 g *L*-Prolin-methylester-hydrochlorid in 20 ccm Methylenchlorid gab man 0.23 ccm Triäthylamin sowie bei 0° eine Lösung von 0.35 g Dicyclohexylcarbodiimid in wenig Methylenchlorid und rührte 2 Stdn. bei 0° sowie 10 Stdn. bei 20°. Die vom Dicyclohexylharnstoff abfiltrierte, mit *n* HCl und *n* NaHCO₃ gewaschene Lösung wurde verdampft, der Rückstand in wenig Aceton aufgenommen und Dicyclohexylharnstoff abfiltriert. Den Verdampfungsrückstand der Acetonlösung chromatographierte man aus Chloroform an einer 3 × 20 cm-Säule aus neutralem Kieselgel und wusch Nebenprodukte mit Chloroform sowie Chloroform/Aceton (9 : 1) aus. Die Hauptmenge an 23a wurde mit Chloroform/Aceton (7 : 3) und der Rest mit Aceton eluiert. Aus dem mit Wasser gewaschenen, filtrierten Eluat erhielt man 23a in 65-proz. Ausbeute als gelbliches Pulver. $[\alpha]_D^{20}$: $-29 \pm 1.5^\circ$ ($c = 1.15$, in Methanol).

$C_{24}H_{34}N_4O_9$ (522.6) Ber. C 55.15 H 6.56 N 10.73 $1 OCH_3$ 5.93
Gef.* C 55.01 H 6.65 N 10.70 OCH_3 5.75

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

N-[2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-allo-*isoleucyl*-*L*-prolin-benzylester (**23b**): Eine Mischung von 0.98 g **21a**, 0.58 g *L*-Prolin-benzylester-hydrochlorid und 0.33 ccm Triäthylamin in 30 ccm Methylenchlorid versetzte man bei 0° mit 0.52 g in wenig Methylenchlorid gelöstem Dicyclohexylcarbodiimid und rührte weitere 2 Stdn. bei 0° sowie 10 Stdn. bei 20°. Weitere Behandlung des Ansatzes wie bei **23a**. Zum Eluieren der Hauptfraktion von der Kieselgelsäule wurde Chloroform/Aceton (9:1) statt Chloroform/Aceton (7:3) benutzt. Man erhielt 1.15 g **23b** als gelbliches Pulver. $[\alpha]_D^{20}$: $-33 \pm 1.5^\circ$ ($c = 1.28$, in Methanol).

$C_{30}H_{38}N_4O_9$ (598.6) Ber. C 60.19 H 6.40 N 9.36 Gef.*) C 59.96 H 6.49 N 9.28

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

Actinocinyl-bis-[*L*-threonyl-*D*-allo-*isoleucyl*-*L*-prolin-methylester] (**24a**): Eine Lösung von 280 mg **23a** in 30 ccm Methanol wurde mit Pd-A-Kohle aushydriert, nach Entfernung des Katalysators auf 20 ccm eingeengt und mit der gleichen Menge 0.07 *m* Phosphatpuffer (pH 7.2) versetzt. Danach gab man portionsweise eine Lösung von 0.55 g Kaliumhexacyanoferrat(III) in wenig Puffer hinzu, hielt den pH-Wert durch Zugabe von *n* NaOH stets auf 7.2 und rührte 10 Stdn. bei 20°. Nach Verdünnen mit der dreifachen Menge Wasser wurde erschöpfend mit Chloroform extrahiert, der Extrakt mit angesäuertem Wasser und *n* NaHCO₃ gewaschen und das nach Verdampfen des Lösungsmittels hinterbliebene Rohprodukt an einer 3 × 40 cm-Cellulosesäule chromatographiert (Butanol/Dibutyläther/10-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat²⁰) 1:2:3). Nach Zerschneiden der Säule eluierte man die Hauptzone abwechselnd mit Methanol und Wasser, verdünnte das Eluat mit 0.2 *n* NaHCO₃, extrahierte mit Chloroform und wusch den Extrakt mit *n* NaHCO₃ und Wasser. Die Lösung des i. Vak. erhaltenen Verdampfungsrückstandes in wenig Chloroform wurde nochmals mit angesäuertem Wasser gewaschen, filtriert, eingedampft und der Rückstand aus wenig Chloroform mit Petroläther gefällt. Man erhielt **24a** als gelbrotes, bei 139–143° schmelzendes Pulver. Ausb. 65%. $[\alpha]_D^{20}$: $-123 \pm 3^\circ$ ($c = 0.18$, in Methanol).

$C_{48}H_{66}N_8O_{14}$ (979.1) Ber. C 58.88 H 6.80 N 11.45 2 OCH₃ 6.34

Gef.*) C 58.84 H 6.95 N 11.25 OCH₃ 6.10

*) Getrocknet 10 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

Actinocinyl-bis-[*L*-threonyl-*D*-allo-*isoleucyl*-*L*-prolin-benzylester] (**24b**): Eine Lösung von 540 mg **23b** in 40 ccm Methanol wurde mit Raney-Nickel bis zur Aufnahme von 3 Mol Wasserstoff hydriert, nach Entfernung des Katalysators auf 30 ccm eingeengt und mit dem gleichen Vol. 0.07 *m* Phosphatpuffer (pH 7.2) versetzt. Nach Oxydation mit 900 mg Kaliumhexacyanoferrat(III) und weiterer Aufarbeitung wie bei **24a** erhielt man **24b** aus Chloroform/Petroläther als orangefarbenes, bei 115–120° schmelzendes Pulver. Ausb. 77%. $[\alpha]_D^{20}$: $-104 \pm 3^\circ$ ($c = 0.21$, in Methanol).

$C_{60}H_{74}N_8O_{14}$ (1131.2) Ber. C 63.69 H 6.60 N 9.91 Gef.*) C 63.30 H 6.88 N 9.59

*) Getrocknet 10 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

Actinocinyl-bis-[*L*-threonyl-*D*-allo-*isoleucyl*-*L*-prolin] (**24c**): Eine Lösung von 450 mg **23b** in 40 ccm Methanol wurde, wie bei **24a** beschrieben, aushydriert, mit 800 mg Kaliumhexacyanoferrat(III) oxydiert und das Rohprodukt an einer 3 × 50 cm-Cellulosesäule getrennt (Butanol/Butylacetat/Wasser/10-proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat²⁰) 7:3:7:3:20). Man eluierte die Hauptzone abwechselnd mit Methanol und Wasser, verdünnte das Eluat mit viel Wasser, säuerte mit *n* HCl an und extrahierte mit Chloroform. Den roten Eindampfrückstand der Chloroformphase gab man, in wenig Chloroform gelöst, auf eine mit Chloroform eingeschlammte 2.5 × 20 cm-Säule aus saurem Kieselgel¹⁹, wusch mit viel Chloroform und Chloroform/Aceton (9:1) die Kresotinsäure ins Filtrat und eluierte die rote Zone mit Aceton.

Die Lösung des Eindampfrückstandes des Eluats in wenig Chloroform wurde mit angesäuertem Wasser gewaschen, filtriert, eingedampft und der Rückstand aus wenig Chloroform mit Petroläther gefällt. Man erhielt **24c** als gelbrotes Pulver, das bei 171—174° schmolz. Ausb. 75%. $[\alpha]_D^{20}$: $-141 \pm 3^\circ$ ($c = 0.18$, in Methanol).

$C_{46}H_{62}N_8O_{14}$ (951.0) Ber. C 58.09 H 6.57 N 11.79 Gef.*) C 57.71 H 6.67 N 11.78

*) Getrocknet 10 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

Äquiv.-Gew.: Ber. 476 Gef. 489 (Titration mit 0.05 *n* NaOH in 50-proz. Methanol)

Ber. Mol Thr 2.0 D-alle 2.0 Pro 2.0 Gef. Mol Thr 1.9 D-alle 1.9 Pro 2.0⁷⁾.

[248/66]
