

Hans Brockmann und Frank Seela

Actinomycine, XXXVI¹⁾; Synthesen von Actinomycinen und actinomycinähnlichen Chromopeptiden, IX¹⁾

4.6-Didesmethyl-actinomycin C₁ und dessen 4.6-Dimethoxy-, 4.6-Diäthyl- und 4.6-Di-tert.-butyl-Derivat

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 13. Mai 1971)

Über die Actinomycin C₁-säure-Derivate **5a–d** werden die Actinomycin C₁-Derivate **6a–d** synthetisiert. Austestung zeigt: Äthyl anstelle der 4.6-Chromophor-Methylgruppen von Actinomycin C₁ (**6e**) verringert die antibiotische Wirksamkeit um etwa die Hälfte, Wasserstoff oder Methoxyl wie in **6a** bzw. **6b** erniedrigen sie um zwei Zehnerpotenzen, tert.-Butyl hebt sie auf. Aus 2-Amino-3-hydroxy-4-tert.-butyl-benzoesäure-methylester (**28d**) entsteht mit Kaliumhexacyanoferrat(III) — im Gegensatz zu den entsprechenden Estern **28a–c** und **28e** mit kleineren Substituenten an C-4 — neben dem 2-Amino-phenoxazon-(3)-Derivat **29d** das Benzochinon-anil **24c**. Unter gleichen Bedingungen geben *N*-[2-Amino-3-hydroxy-4-tert.-butyl-benzoyl]-L-threonin-methylester (**14d**) und **4d** nur die Benzochinon-anile **24d** bzw. **24e**. Trifluoressigsäure cyclisiert **24c, d** und **e** zu **26c** \equiv **29d** bzw. **26d** und **26e** \equiv **5d**. Beim Umsetzen von **30** mit Kaliumhexacyanoferrat(III) bleibt oxydative Kondensation aus; als Hauptprodukt entsteht 3.6-Di-tert.-butyl-benzochinon-(1.2) (**33**). Für ein rotes, bisher nach **34** bzw. **35** formuliertes Oxydationsprodukt der 2-Amino-3-hydroxy-benzoesäure wird die Konstitution **40a** bewiesen.

Actinomycins, XXXVI¹⁾; Syntheses of Actinomycins and Actinomycin-like Chromopeptides, IX¹⁾

4.6-Didemethylactinomycin C₁ and its 4.6-Dimethoxy, 4.6-Diethyl and 4.6-Di-tert-butyl Derivatives

The actinomycin C₁ derivatives **6a–d** have been synthesized using the actinomycin C₁ acid derivatives **5a–d** as intermediates. Biological tests show the following results of substituting the chromophore 4.6-methyl groups in actinomycin C₁ (**6e**): Replacement by ethyl groups decreases the antibiotic activity by a factor of two, substitution by hydrogen or methoxy residues (as shown in **6a** and **6b**) decreases the activity by two orders of magnitude, and *tert*-butyl groups cause the activity to disappear. In contrast to the corresponding esters **28a–c** and **28e** with smaller substituents at the C-4 position, oxidative condensation of methyl-2-amino-4-*tert*-butyl-3-hydroxybenzoate (**28d**) with potassium ferricyanide leads to the formation of 2-amino-phenoxazin-3-one derivative **29d** and also to the *N*-phenyl-*p*-benzoquinone imine derivative **24c**. Under the same conditions *N*-(2-amino-4-*tert*-butyl-3-hydroxybenzoyl)-L-threonin methyl ester (**14d**) and **4d** form only the *N*-phenyl-*p*-benzoquinone imine derivatives **24d** and **24e**, respectively. Ring closure of **24c, d** and **e** was accomplished employing trifluoroacetic acid to yield **26c** \equiv **29d** and **26d, 26e** \equiv **5d**, respectively. Treatment of **30**

¹⁾ XXXV. bzw. VIII. Mitteil.: H. Lackner, Chem. Ber. 103, 2476 (1970).

with potassium ferricyanide does not result in oxidative condensation but leads to 3,6-ditert-butyl-1,2-benzoquinone (**33**) as the main product. A red oxidation product of 2-amino-3-hydroxybenzoic acid, previously formulated as **34** or **35**, was demonstrated to have the structure shown in formula **40a**.

■
Untersuchungen an siebzehn Actinomycinen und einigen vierzig z. T. vollsynthetischen Actinomycinderivaten, die sich entweder in den Chromophorsubstituenten oder in der Struktur bzw. Konfiguration der Peptidlactonringe von nativen Actinomycinen unterscheiden, haben gezeigt, von welchen strukturellen und konfigurativen Voraussetzungen die antibiotische, toxische und cancerostatische Wirksamkeit der Actinomycine und ihrer Derivate abhängt²⁻⁸⁾.

Diese Befunde unseres Arbeitskreises sind einer molekularbiologischen Deutung zugänglich geworden: 1. Seit man weiß, daß Actinomycine, z. B. Actinomycin C₁ (**6e**), antibiotisch, toxisch und cancerostatisch wirken, weil sie durch Komplexbildung mit der DNS-Doppelhelix der Gene⁹⁾ den Transkriptionsschritt in der Proteinbiosynthese unterbinden¹⁰⁾; 2. Seit Müller¹¹⁾ sowie Müller und Crothers¹²⁾ gezeigt haben, daß sich Entstehung, Struktur und Wirkungsweise der Actinomycin-DNS-Komplexe folgendermaßen beschreiben lassen: 1. Einschub des 2-Amino-phenoxazon-(3)-Ringsystems (Chromophor) der Actinomycine von der kleinen Furche der DNS-Doppelhelix her zwischen zwei Basenpaare, von denen eines Guanin-Cytosin sein muß; derart, daß der chinoider Ring des Chromophors dem Cytosinrest benachbart und elektronische Wechselwirkung zwischen dem Guanin-Cytosin-Paar und dem 2-Amino-phenoxazon-(3)-Ringsystem des Chromophors möglich ist. 2. Verknüpfung des Chromophors mit beiden Strängen der Doppelhelix über zwei sich zwischen Chromophor-Carboxamidgruppe und Desoxyribose-Ringsauerstoff ausbildende Wasserstoffbrücken. 3. Bildung einer Wasserstoffbrücke zwischen Chromophor-Aminogruppe und Phosphat-Sauerstoff der DNS. 4. Anlagerung der Peptidlactonringe an die beiden Helixstränge unter Konformationsänderung, die — durch kleine Ringgliederzahl, ringstabilisierende Wasserstoffbrücke und sperrige Alkylreste der Ringe erschwert — langsam ist, langsame Bildung und Dissoziation des Komplexes zur Folge hat und damit dessen lange Lebensdauer verständlich macht.

Bildung derartiger Komplexe entlang der DNS-Doppelhelix sowie eine Lebensdauer des Komplexes, die deutlich größer ist als die Zeit, welche die m-RNS-Polymerase braucht, um ein Nucleosid in die m-RNS einzubauen, verhindern die Progression des Enzyms entlang der als Matrize fungierenden DNS-Kette und blockieren damit RNS- und Proteinsynthese; im Gegensatz zu Komplexen aus DNS und 2-Amino-phenoxazon-(3)-Derivaten wie Actinomycin (**26h**)¹³⁾, deren Stabilitätskonstante zwar der von Actinomycin-DNS-Komplexen gleicht, deren Lebensdauer aber zu kurz ist, um die Progression des Enzyms aufzuhalten.

²⁾ H. Brockmann, Fortschr. d. Chem. organ. Naturstoffe, Bd. XVIII, S. 1, Springer-Verlag, Wien 1960; Angew. Chem. **72**, 438 (1960).

³⁾ H. Brockmann und H. Lackner, Chem. Ber. **100**, 353 (1967).

⁴⁾ H. Brockmann, P. Hocks und W. Müller, Chem. Ber. **100**, 1051 (1967).

⁵⁾ H. Brockmann und H. Lackner, Chem. Ber. **101**, 1312 (1968).

⁶⁾ H. D. Berndt, Dissertation, Univ. Göttingen 1961.

⁷⁾ H. Brockmann und J.-H. Manegold, Chem. Ber. **95**, 1081 (1962).

⁸⁾ E. A. Stähler, Dissertation, Univ. Göttingen 1966.

⁹⁾ W. Kersten, H. Kersten und H. M. Rauen, Nature [London] **187**, 60 (1960).

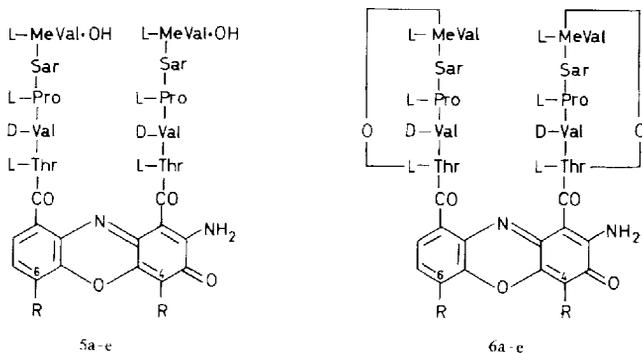
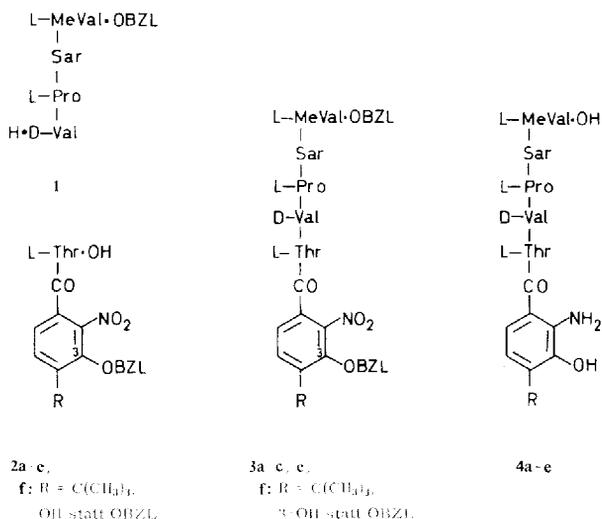
¹⁰⁾ E. Harbers und W. Müller, Biochem. biophysic. Res. Commun. **7**, 107 (1967).

¹¹⁾ W. Müller, Habilitationsschrift, Univ. Göttingen 1967.

¹²⁾ W. Müller und D. M. Crothers, J. molecular Biol. **35**, 251 (1968).

¹³⁾ F. Seela, Dissertation, Univ. Göttingen 1967.

Die Actinomycin C₁ (**6e**)-Derivate **6a**¹⁴, **6b**¹⁵, **6c** und **6d** wurden synthetisiert, um zu sehen, wie sich biologische Wirksamkeit, Stabilitätskonstante des DNS-Komplexes und m-RNS-Polymerase-Hemmung ändern, wenn in **6e** die 4,6-Methylgruppen des in allen nativen Actinomycinen gleichen Chromophors¹⁶ durch Wasserstoff, Methoxyl, Äthyl oder tert.-Butyl ersetzt werden. Zur Synthese wählten wir den Weg über die entsprechenden Actinomycinsäuren, was darauf hinauslief, die von **1** und **2e** aus über **3e**, **4e** und **5e** laufende Actinomycin C₁ (**6e**)-Synthese⁵ auf die L-Threoninderivate **2a—d** zu übertragen.



	a	b	c	d	e
R	H	OC ₂ H ₅	C ₂ H ₅	C(CH ₃) ₃	CH ₃

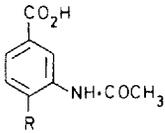
¹⁴ Vorläuf. Mittell.: *H. Brockmann* und *F. Seela*, *Tetrahedron Letters* [London] **1965**, 4803.

¹⁵ Vorläuf. Mittell.: *H. Brockmann* und *F. Seela*, *Tetrahedron Letters* [London] **1968**, 161.

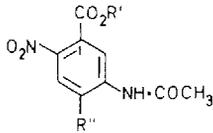
¹⁶ Mit Ausnahme eines durch den Buchstaben K gekennzeichneten Actinomycins, das anstelle der 4,6-Methylgruppen Methoxygruppen enthält. *B. Hsu* und Mitarb., *Scientia sinica* **13**, 789 (1964).

Synthese der L-Threoninderivate **2a–c** und **2f**

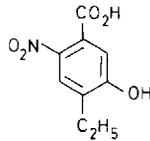
Von den zur Darstellung von **2a**, **b**, **c** und **f** erforderlichen Säuren **12e**, **f**, **a** und **c** waren **12a** und **c** noch nicht bekannt und wurden analog **7c** → **12e**¹⁷⁾ dargestellt. **7a** gab mit 99proz. Salpetersäure zu 88% ein kristallisiertes Nitrierungsprodukt, das bei einem **7d** → **12g**¹⁸⁾ ähnlichen Reaktionsverlauf ein **8a/11a**-Gemisch sein mußte. Seine Auftrennung — im Gegensatz zum Nitrierungsprodukt von **7d** durch Kristallisation nicht zu erreichen — gelang nach Veresterung mit Diazomethan durch Chromatographie an Fluoreszenz-Kieselgel¹⁹⁾. Man erhielt zwei kristallisierte Isomere mit der Bruttoformel von **8b** bzw. **11b**; das langsamer wandernde mit Schmp. 132–133° zu 20% (bezogen auf **7a**), das andere (Schmp. 163–164°) zu 62%. Das niedriger schmelzende enthält laut 60-MHz-NMR-Spektrum [CDCl₃, Singulett bei δ 7.75 (1), 8.30 (1)] zwei nicht koppelnde Aromaten-Protonen und war damit als **8b** charakterisiert. Das andere gab sich durch AB-Kopplung seiner beiden Aromaten-Protonen (Schwerpunkte bei δ 7.40, 7.85; *J* = 9 Hz) als **11b** zu erkennen. 50stdg. Kochen in 20proz. wäßrigem Kaliumhydroxid verwandelte **8b** und **11b** zu 90% in die kristallisierten Säuren **9a** und **12a**.



7a-d

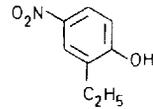


8a-d



9a

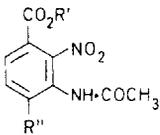
b: CCl₄/D₂O
- mit C₂H₅



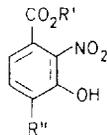
10

	H
a	C ₂ H ₅
b	C(C ₂ H ₅) ₂
c	H
d	C ₂ H ₅

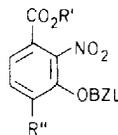
	H'	H''
a	H	C ₂ H ₅
b	CH ₃	C ₂ H ₅
c	H	Cl(CH ₂) ₂
d	CH ₃	C(CH ₂) ₂



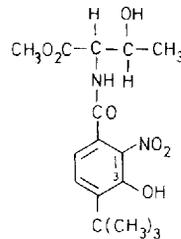
11a-d



12a-g



13a-f



14a

b: CO₂H statt CO₂CH₃
c: OCH₃ statt OH an C-3
d: NH₂ statt NO₂

	a	b	c	d	e	f	g
R''	H	CH ₃	H	CH ₃	H	H	H
R'''	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	C(CH ₂) ₂	C(CH ₂) ₂	H	OCH ₃	CH ₃

Aus **9a** entstand mit Kupferpulver in siedendem Chinolin ein kristallisiertes Decarboxylierungsprodukt, dem NMR-Spektrum nach das noch nicht beschriebene 4-Nitro-2-äthylphenol (**10**); ein weiterer Beweis für die 6-Stellung der Nitrogruppe im Isomeren **8b**.

¹⁷⁾ B. Hegedüs, Helv. chim. Acta **34**, 611 (1951).

¹⁸⁾ B. Weinstein, O. P. Crews, M. A. Leafer, B. R. Baker und L. Goodman, J. org. Chemistry **27**, 1389 (1962).

¹⁹⁾ H. Brockmann und F. Volpers, Chem. Ber. **82**, 95 (1949).

7b, nitriert und aufgearbeitet wie bei **7a**, lieferte zwei kristallisierte Isomere $C_{14}H_{18}N_2O_5$; das im Chromatogramm schneller wandernde, durch AB-Spektrum (Schwerpunkte bei δ 7.65, 7.93; $J = 8$ Hz) als **11d** charakterisierte zu 37% (bezogen auf **7b**), das durch zwei Singulets (δ 7.93, 8.14) und fehlende *meta*-Kopplung als **8d** ausgewiesene zu 49%. Das Produktverhältnis **11d/8d** ist mit 0.7 erheblich kleiner als bei den Äthylderivaten (**11b/8b** = 3.0); offenbar, weil die sperrige tert.-Butylgruppe die Acetaminogruppe in eine Lage zwingt, die den Zugang zu C-2 erschwert²⁰.

Der nucleophile Austausch der Aminogruppe gegen Hydroxyl, bereits bei **11a** träger als bei **11e**, wird erwartungsgemäß durch die tert.-Butylgruppe noch stärker verzögert. Erst 50stdg. Kochen mit 40proz. wäßrigem Kaliumhydroxid verwandelte **8d** und **11d** in 88 bzw. 86proz. Ausbeute in die kristallisierten Säuren **9b** und **12c**.

Zur Gewinnung der L-Threoninderivate **2a–c** wurden die Säuren **12e**, **f** und **a** zu **13e**, **f** und **a** benzyliert und deren Chloride in 2*n* NaOH mit L-Threonin gekuppelt. **2a** kristallisierte, **2b** und **2c** wurden als kristallisierte Dicyclohexylammoniumsalze isoliert und aus diesen an saurem Ionenaustauscher freigesetzt.

Eine analoge Darstellung von **2d** war nicht möglich, weil sich das durch tert.-Butyl abgeschirmte Hydroxyl von **12c** nicht benzylieren ließ. Da bei der Überführung von ungeschütztem **12c** ins Säurechlorid viele Nebenprodukte entstanden, setzten wir **12c** mit L-Threonin-methylester und Dicyclohexylcarbodiimid um und verseiften das zu 75% angefallene, kristallisierte **14a** mit *n*-NaOH (30 Min./20°); ohne Racemisierung, denn das entstandene **14b** gab mit Diazomethan ein **14c**-Präparat mit gleichem $[\alpha]_D^{25}$ -Wert wie aus **14a** und Diazomethan bereitetes **14c**.

Zur Synthese der Chromophore von **6a–e**

Für die zweistufige Oxydation von *o*-Amino-phenolen zu Chinon-monoiminen, z. B. solchen vom Substitutionstyp **15a** der Verbindungen **4a–e**, gilt **15a** \rightarrow **20a**. Für die oxydative Kondensation von **15a** zu 2-Amino-phenoxazon-(3)-Derivaten vom Typ **26a**, eine Synthese mit „nascierendem Chinon“²¹), kommen daher zwei Mechanismen in Betracht: 1. Addition von **15a** an **19a** oder **20a** zu **22a**, dessen Dehydrierung zum Benzochinon-anil **24a**, intramolekulare Phenol/Chinon-Addition (\rightarrow **25a**) und Dehydrierung (\rightarrow **26a**). 2. Verknüpfung über Radikal-Kationen, beginnend mit **15a** + **18a** \rightarrow **21a** und weitergeführt durch Oxydation von **21a** über **22a** zu **23a**, Ringschluß zu **25a** und Oxydation zu **26a**. Welcher Mechanismus bevorzugt wird, bleibt offen.

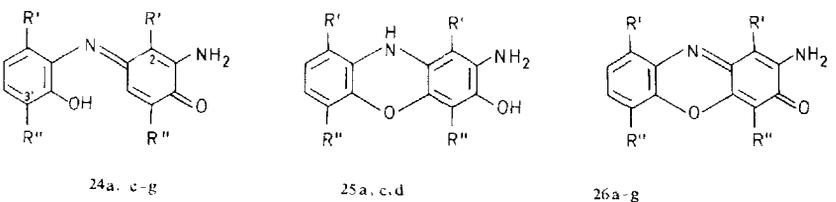
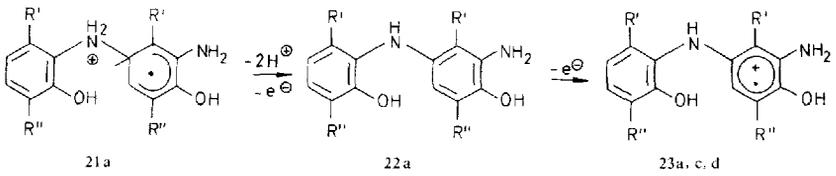
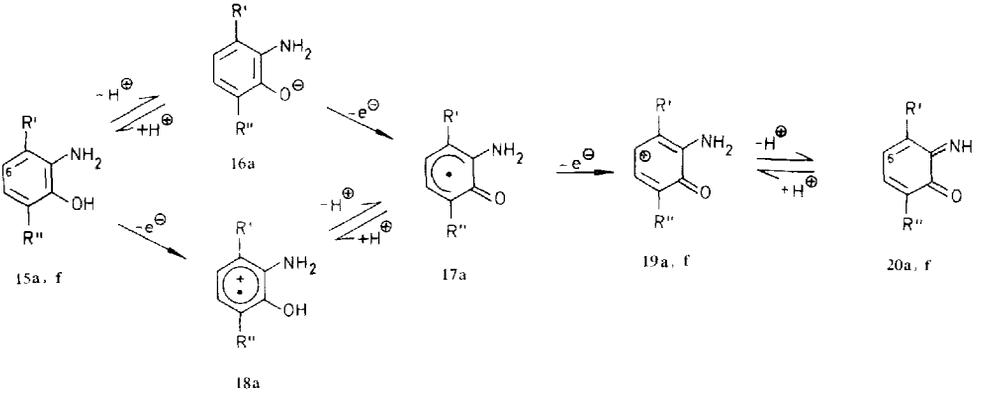
Von den beiden möglichen Kondensationsrichtungen wird bei der Oxydation von *o*-Amino-phenol (**15f**) die **26f** liefernde gegenüber der zum Phenoxazonimin **27b** führenden stark bevorzugt. Bei **15f**-Derivaten vom Typ **15a** hängt das Produktverhältnis **26a/27a** von der Natur der Substituenten R' und R'' ab^{21,22}).

Diese Befunde sind bei Ringverknüpfungen durch 1.4-Amin- bzw. 1.4-Phenol/Chinon-Addition dadurch zu erklären²¹), daß 1. Die Aminogruppe in **15a** und **f** nucleophil ist als das Hydroxyl, 2. in **19f** und **20f** die Tendenz der C=C–C=N-Gruppierung zur Addition der **15a**- bzw. **15f**-Aminogruppe erheblich größer ist als bei C=C–C=O, 3. die Additionsbereitschaft von C=C–C=N und C=C–C=O durch elektronenziehendes R' bzw. R'' erhöht, durch elektronengebendes R' bzw. R'' dagegen verringert wird. Analoges ist bei Ringverknüpfung über Radikal-Kationen zu erwarten.

²⁰ Vgl. K.-H. Bantel und H. Musso, Chem. Ber. **102**, 695 (1969).

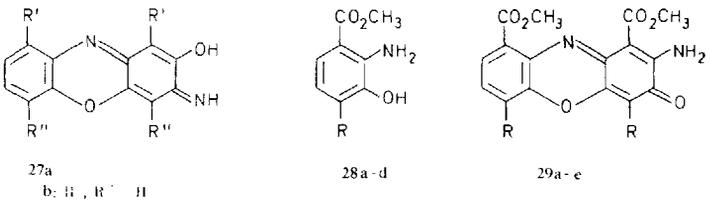
²¹ H.-W. Wanzlik, Angew. Chem. **76**, 313 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. **3**, 401 (1964).

²² H. Brockmann und E. Schulze, Chem. Ber. **102**, 3205 (1969).



R'	R''
a CO ₂ H, Alkoxy-carbonyl, CO-NH-R	Alkyl, Alkoxy
b CO-E, Thr-OCH ₃	CH ₃
c O ₂ CH ₃	C(CH ₃) ₃
d CO-E, Thr-OCH ₃	C(CH ₃) ₃
e CO-E, Thr-D-Val	C(CH ₃) ₃
f I, Pro-Sar-L, MeVal-OH	H
g C(CH ₃) ₃	C(CH ₃) ₃

h: R = CO-NH-(CH₂)₂-N(C₂H₅)₂,
 R'' = CH₃
 i: R' = CO₂H, R'' = H



b: H, R' = H

	a	b	c	d	e
R	H	CH ₃	C ₂ H ₅	C(CH ₃) ₃	CH ₃

Von den Chromophor-methylestern **29a–d** der zu synthetisierenden Actinomycin C₁ (**6e**)-Derivate waren **29c** und **d** noch nicht bekannt. Um sie analog wie **29e** darzustellen, wurden **12b** und **d** durch Hydrierung zu **28c** und **d** reduziert und diese, ohne sie zu isolieren, bei pH 7.2 mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxydiert. Dabei entstand aus **28c** zu 91% (bezogen auf **12b**) rotbraunes, kristallisiertes **29c**. **28d** dagegen gab ein Oxydationsprodukt, das neben einer gelbroten Fraktion mit den Reaktionen des gesuchten **29d** als Hauptanteil eine auf der Kieselgelplatte etwas langsamer wandernde rote Verbindung enthielt, deren Elektronenspektrum dem von Benzochinon-anilen ähnelte²³). Kurzes Erhitzen des Gemisches in sauerstoffdurchströmter Essigsäure/Trifluoressigsäure (25 : 1) lieferte, bezogen auf **12d**, in 50proz. Ausbeute kristallisiertes, gelbbraunes **26c** \equiv **29d**, charakterisiert durch Analyse, Elektronen- und NMR-Spektrum sowie die für 2-Amino-phenoxazone-(3) typischen Farbreaktionen (rote Halochromie mit konz. Salzsäure, Blauviolett-färbung in Dimethylformamid/0.1*n* NaOH, Säurehydrolyse zum 2-Desamino-2-hydroxy-phenoxazon-(3)-Derivat, das mit Zinn(II)-chlorid Grünfärbung gibt). Danach konnte die rote Verbindung nur das Benzochinon-anil **24c** sein.

Die Chromophor-methylester **29a–e** (Tab. 1) unterscheiden sich in der Farbe ihrer mit wenig 0.1*n* Alkalihydroxid versetzten Dimethylformamidlösung³). Im Papierchromatogramm (Butanol/Dibutyläther/10proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat, 1:2:3) steigen die R_F -Werte mit zunehmender Lipophilie der 4.6-Substituenten nach: **29b** < **29a** < **29e** < **29c** < **29d**.

Tab. 1. Absorptionsmaxima, molare Extinktion und Farbreaktion der Chromophor-methylester **29a–e**

Verbindung	R	λ_{\max} (ϵ) in Methanol		Farbe in DMF/NaOH
29a	H	432 (25 800)	237 (32 400)	blau
b	OCH ₃	438 (29 500)	246 (40 000)	grün
c	C ₂ H ₅	435 (29 200)	240 (37 400)	blaugrün
d	C(CH ₃) ₃	422 (26 500)	240 (34 700)	rotviolett
e	CH ₃	433 (30 600)	237 (36 000)	blaugrün

Um zu sehen, ob der Ringschluß eines Benzochinon-anils vom Typ **24a** durch größere Reste an C-2 und C-6' -- im Extremfall durch die von **24e** -- erschwert wird, oxydierten wir das aus **14a** durch Hydrierung gewonnene **14d** bei pH 7.2 mit Kaliumhexacyanoferrat(III). Ohne daß ein Kondensationsprodukt mit dem 2-Amino-phenoxazon-(3)-Spektrum von **26d** nachzuweisen war, entstand in 87proz. Ausbeute eine chromatographisch einheitliche, kristallisierte, rote Verbindung C₃₂H₄₄N₄O₁₀ mit ähnlichem Elektronenspektrum wie Benzochinon-anile²³). Ihr 100-MHz-NMR-Spektrum (CDCl₃) zeigt an: 2 C(CH₃)₃ [δ 1.10 (9), 1.42 (9)], 2 OCH₃ [δ 3.56 (3), 3.76 (3)]; 2 benachbarte arom. H (AB-Spektrum, Schwerpunkte bei δ 7.15, 7.37; $J = 8$ Hz), 1 Olefin-H [δ 6.69 (1)]; 1 phenolisches OH [Singulett δ 6.00 (1), auf D₂O-Zugabe verschwindend].

²³) L. Horner und K. Sturm, Chem. Ber. **88**, 329 (1955).

Kurzes Erhitzen in sauerstoffdurchströmter Essigsäure/Trifluoressigsäure (50 : 1) überführte die rote Verbindung zu 60% in amorphes **26d**, charakterisiert durch Analyse, Elektronen- und NMR-Spektrum sowie die für 2-Amino-phenoxazon-(3) typischen Farbreaktionen.

Von **26b** [UV (Methanol): λ_{\max} 444 m μ (ϵ = 28000), 239 (38000)] unterscheidet sich **26d** durch kürzerwellige Absorption [UV (Methanol): 422 m μ (ϵ 22000), 239 (35000)], größere Löslichkeit in lipophilen Solvenzien und größeren R_F -Wert [Butanol/Dibutyläther/10proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat (1 : 2 : 3)].

Bruttoformel, Elektronen- und NMR-Spektrum sowie die Überführung in **26d** beweisen für die rote Verbindung die Benzochinon-anil-Formel **24d**; zugleich eine Bestätigung für die Annahme, daß für das rote **28d**-Kondensationsprodukt Formel **24c** gilt. Da beim Erhitzen in Eisessig/Trifluoressigsäure die Chinonimin-Gruppierung von **24d** hydrolysiert und die Aminogruppe von **26d** durch Hydroxyl ersetzt werden kann, ist verständlich, daß die **26d**-Ausbeute 60% nicht übersteigt.

In **24c** und **d** werden C-6 und das 2'-Hydroxyl durch das benachbarte tert.-Butyl stärker abgeschirmt und die Elektrophilie von C-6 weitgehender verringert, als wenn R' Methyl oder Äthyl wäre. Beides erschwert die intramolekulare Phenol/Chinon-Addition so weit, daß **24c** unter den Synthesebedingungen nur in geringem Ausmaß zu **26c** = **29d** wird und bei **24d** die Cyclisierung ganz ausbleibt; offenbar, weil sie hier zusätzlich durch die großen R'-Gruppen erschwert wird, die einer coplanaren Einstellung der Ringe hinderlicher sind als die Methoxycarbonyl-Gruppen von **24c**. In heißer Essigsäure/Trifluoressigsäure cyclisieren **24c** und **d** schnell zu **26c** = **29d** bzw. **26d**, weil — abgesehen von der höheren Temperatur — Protonierung des chinoiden Ringes die Elektrophilie von C-6 erhöht.

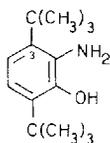
Ob die beiden Benzochinon-anile in festem Zustand in der allein zum Ringschluß befähigten *anti*-Form (auf 2-R' bezogen) **24c** bzw. **d** vorliegen oder als *syn*-Isomeres, das in Lösung mit **24c** bzw. **24d** im Gleichgewicht steht, bleibt offen²⁴⁾.

In Chloroform verwandelt sich **24c** bei Luftzutritt allmählich in **26c**, während **24d** unverändert bleibt. Auf der Kieselgelplatte cyclisieren beide zu **26c** = **29d** bzw. **26d**; **24d** langsamer als **24c**.

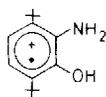
Werden die Ringe bei der 2-Amino-phenoxazon-(3)-Synthese durch 1.4-Amin/Chinon- und 1.4-Phenol/Chinon-Addition verknüpft, so wären **24c** und **d** Vertreter von normalerweise nicht faßbaren Zwischenprodukten. Läuft die Kondensation dagegen über Radikal-Kationen, so würde sich der sterische und elektronische Effekt der tert.-Butyl-Gruppen und die durch große R'-Gruppen erschwerte coplanare Einstellung der Ringe bei den Zwischenprodukten **23c** und **d** bemerkbar machen, deren Cyclisierung zu **25c** und **d** verzögern und damit die Oxydation von **23c** und **d** zu **24c** und **d** begünstigen; d. h. die Benzochinon-anile **24c** und **d** wären dann Produkte einer Ausweichreaktion, die das Zwischenprodukt **23c** bzw. **d** in Form des zugehörigen Chinon-monoimins festlegt.

Mit der Isolierung von **24c** und **d** ist zum ersten Mal bewiesen, daß die Kondensation von **15a** zu **26a**, wie angenommen, mit der Addition der Aminogruppe von **15a** an ein Oxydationsprodukt von **15a** (**18a** oder **19a** bzw. **20a**) beginnt.

²⁴⁾ Vgl. A. Ricker und H. Kessler, Tetrahedron [London] **23**, 3723 (1967).



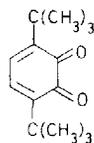
30



31



32



33

Voraussetzung dafür ist, daß diese die Kondensation zu **26a** einleitende Reaktion schneller ist als die Oxydation von **15a** zu **18a** bzw. **19a** und **20a**. Um zu sehen, ob dies auch dann noch zutrifft, wenn die Methoxycarbonylgruppe von **28d** durch tert.-Butyl ersetzt ist, haben wir 2-Amino-3,6-di-tert.-butyl-phenol (**30**)²⁵⁾ bei pH 7.2 mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxydiert. Hauptprodukt war eine dunkelbraune, kristallisierte, mit 66proz. Ausbeute isolierte Verbindung $C_{14}H_{20}O_2$ vom Schmp. 204° [UV (Cyclohexan): λ_{max} 398 m μ (2650); IR-CO: 1670, 1650/cm; NMR(CDCl₃): Singulett bei δ 1.22 (18) und 6.78 (2)], nach diesen Daten das noch nicht beschriebene 3,6-Di-tert.-butyl-benzochinon-(1,2) (**33**). Benzochinon-anil **24g** oder 2-Aminophenoxazon-(3) **26g** waren nicht nachzuweisen.

Die Aminogruppe von **30** wird durch das benachbarte sperrige tert.-Butyl abgeschirmt und unter Ausbildung einer O—H···N-Brücke auf das durch die zweite tert.-Butylgruppe gestützte Hydroxyl gepreßt²⁰⁾; beides ungünstig für Anlagerung an C-4 von **31** bzw. **32**. Und da außerdem das 3-tert.-Butyl in **31** bzw. **32** die nucleophile Addition der 30-Aminogruppe nicht nur sterisch, sondern durch seinen großen +I-Effekt auch elektronisch erschwert, überrascht nicht, daß die Oxydation von **30** zu **32** der Addition von **30** an **31** bzw. **32** den Rang abläuft und **32** zum Hauptprodukt wird. Ob dieses schon in der Reaktionslösung zu **33** hydrolysiert wird oder erst bei der chromatographischen Abtrennung an Kieselgel G, bleibt offen.

Zur oxydativen Kondensation der 2-Amino-3-hydroxy-benzoesäure

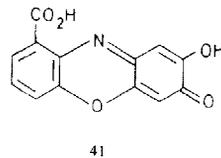
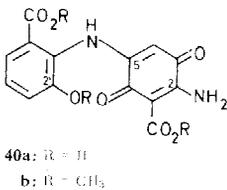
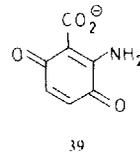
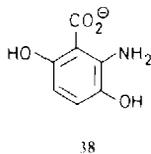
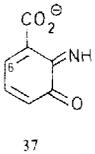
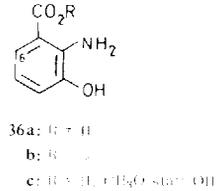
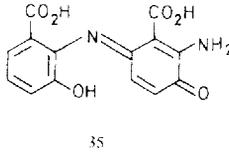
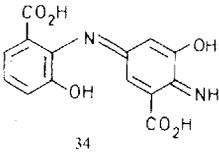
Für die Frage, ob **24c** und **d** die ersten Benzochinon-anile sind, die man bei oxydativer Kondensation von *o*-Amino-phenolen gefunden hat, war von Interesse, daß Oxydation von 2-Amino-3-hydroxy-benzoesäure (**36a**) mit Luft in ammoniakfreien Pufferlösungen (pH 9–11.6) bis zu 50% eine rote, kristallisierte Verbindung liefert, für die außer **34** auch Formel **35** in Betracht gezogen wurde^{26,27)}.

Bei Überprüfung gab die rote Verbindung mit Diazomethan ein rotes Trimethoxy-Derivat $C_{17}H_{16}N_2O_7$. Sie hat demnach die Bruttoformel $C_{14}H_{10}N_2O_7$ und enthält ein O-Atom mehr als **34** und **35**. Wäre sie ein Oxydationsprodukt von **35**, so könnte das aufgenommene O-Atom nur als phenolisches Hydroxyl vorliegen und Diazomethan würde ein Tetramethoxy-Derivat liefern. Von **34** läßt sich dagegen das um ein O-Atom reichere Oxydationsprodukt **40a** — mit drei durch Diazomethan methylierbaren Hydroxylen — formulieren.

²⁵⁾ H. Musso und K.-H. Bantel, Chem. Ber. **102**, 686 (1969).

²⁶⁾ A. Butenandt, J. Keck und G. Neubert, Liebigs Ann. Chem. **602**, 61 (1957).

²⁷⁾ A. Butenandt, E. Biekert und G. Neubert, Liebigs Ann. Chem. **603**, 200 (1957).



Mit **40a** stehen in Einklang: 1. Die Analyse der roten Verbindung²⁸⁾, ihres *O*-Monoacetats (erhalten mit Keten in *n* NaOH) und farblosen Dihydotetraacetats^{26,27)}, 2. die Umwandlung in **41** durch *n* NaOH (19 Stdn., Raumtemp.)²⁷⁾, 3. das Elektronenspektrum des Trimethoxy-Derivates [λ_{max} (Chloroform): 486 m μ ($\epsilon = 2400$), 323 (17900), 270 (12300)], das dem von Amino-benzochinonen-(1.4) wie Cinnachinon²⁹⁾ ähnlich ist, 4. das 100-MHz-NMR-Spektrum (CDCl₃) des Trimethoxy-Derivates **40b**, das anzeigt: drei benachbarte Aromaten-Protonen (ABC-Spektrum zwischen δ 7.0 und 7.7; drei Methoxygruppen (δ 3.84 (3), 3.87 (3), 3.88 (3)); ein Olefin-H (Singulett bei δ 5.25, Lage charakteristisch für Olefin-H von Amino-benzochinonen-(1.4)³⁰⁾), 5. der Alkaliabbau des Trimethoxy-Derivates zu **36c** (5*n* NaOH, 1 Stde., 100°). Damit können **40a** und **b** als gesichert gelten.

Daß **40a** durch Oxydation aus **34** entsteht, ist zwar formal möglich, unter den Versuchsbedingungen aber auszuschließen. Denn, da uns **28a** mit Kaliumhexacyanoferrat(III) bei pH 7.2 zu 85% kristallisiertes **29a** lieferte, sollte auch Luftoxydation von **36a** bei pH 11.6 ganz überwiegend zum 2-Amino-phenoxazon-(3) **26i** führen und Kondensation in Richtung auf **34** keine Rolle spielen. Plausibel erscheint uns dagegen, daß sich **40a** — für Ringverknüpfung durch 1.4-Amin/Chinon-Addition formuliert — auf folgendem Wege bildet. Das aus **36b** entstandene **37** reagiert in der alkalischen Lösung statt mit der Aminogruppe von **36a** bevorzugt mit Hydroxyl-Ion unter Entstehung von **38**, worauf Oxydation zu **39**, Amin/Chinon-Addition von **36b** an **39** und Dehydrierung des Adduktes zu **40a** führt.

Die Actinomycin C₁-Derivate 6a—d

Zur Kupplung von *D*-Valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-benzylester (**1**) mit den *L*-Threoninderivaten **2a—c** zu **3a—c** verwendeten wir *N*-Äthyl-5-phenyl-oxazolium-3'-sulfonat, für die Verknüpfung von **1** mit **2f** = **14b** zu **3f** das bei der Dar-

²⁸⁾ Um sie mit **34** und **35** in Einklang zu bringen, hatte man die berechneten Werte auf C₁₄H₁₀N₂O₆·H₂O bezogen.

²⁹⁾ J. Gripenberg, Acta chem. scand. **12**, 603 (1958).

³⁰⁾ W. Lüttke und G. Kunz, unveröffentlicht.

stellung von **14a** bewährte Dicyclohexylcarbodiimid. **3a–c** wurden wie **3e**⁵⁾ durch Chromatographie an Aluminiumoxid von Nebenprodukten befreit, Reinigung von **3f** (mit phenolischem Hydroxyl und daher größerer Adsorptionsaktivität) gelang an Kieselgel G (Chloroform/Methanol, 95 : 5).

Katalytische Hydrierung von **3a–c** zu **4a–c** und deren Oxydation mit Kaliumhexacyanoferrat(III) bei pH 7.2 führte zu **5a–c**, analoge Umsetzung von **3f** dagegen zu einer rotbraunen Verbindung – dem UV-Spektrum nach **24e** – die kurzes Aufkochen mit Essigsäure/Trifluoressigsäure (20 : 1) in **5d** überführte. Chromatographische Reinigung des Reaktionsproduktes wie bei **5a–c** an Cellulose mit Lösungsmittelsystemen, die wäßrige Lösungen von Natrium-*m*-kresotinat oder ähnlichen Lösungsvermittlern³¹⁾ enthalten, entfiel, weil diese dank der sperrigen tert.-Butyl-Gruppen mit **5d** keine Komplexe bilden. Sie gelang an MN-Polyamid-SC mit Methanol als Laufmittel.

Unter gleichen Bedingungen wie Actinomycin C₁-säure (**5e**)⁵⁾ haben wir **5a–c** mit *N*-Acetyl-imidazol/Acetylchlorid³²⁾ lactonisiert und das Reaktionsprodukt an Aluminiumoxid und Cellulose abgetrennt. In Ausbeuten zwischen 20 und 30% erhielten wir kristallisiertes 4.6-Didesmethyl-actinomycin C₁ (**6a**), 4.6-Dimethoxy-4.6-didesmethyl-actinomycin C₁ (**6b**) und 4.6-Diäthyl-4.6-didesmethyl-actinomycin C₁ (**6c**).

Ebenso wie **5d** bildet erwartungsgemäß auch **6d** keine Komplexe mit Natrium-*m*-kresotinat oder anderen zur Actinomycin-Trennung geeigneten Lösungsvermittlern³¹⁾. Das aus **5d** mit *N*-Acetyl-imidazol/Acetylchlorid erhaltene Lactonisierungsprodukt ließ sich daher nicht wie bei **6a–c** und **6e** durch Verteilungschromatographie an Cellulose auftrennen. Die Fraktionierung gelang schließlich durch präparative Schichtchromatographie an Kieselgel G und gab zu 5% (bezogen auf **5d**) amorphes 4.6-Di-tert.-butyl-4.6-didesmethyl-actinomycin C₁ (**6d**). Sein langwelliges Absorptionsmaximum (Tab. 2) liegt um 16 m μ kürzerwellig und hat eine um rund 20% kleinere Extinktion als bei **6e**. Analoge, etwas geringere Unterschiede findet man bei den Chromophorestern **29d** und **e** (Tab. 1).

Tab. 2. Actinomycin C₁ (**6e**) und seine Derivate **6a–d**

Formel	R	[α] _D ²⁰ (c, Methanol)	λ_{\max} (ϵ)		Farbe DMF/NaOH
			Methanol	Wasser	
6a	H	–290 \pm 3° (0.17)	438 (21 800) 236 (31 800)	438 (24 400)	blauviolett
b	OCH ₃	–308 \pm 10° (0.17)	448 (25 900) 247 (37 600)	444 (24 800)	braunrot
c	C ₂ H ₅	–290 \pm 10° (0.19)	444 (24 000) 242 (34 500)	442 (24 400)	rotviolett
d	C(CH ₃) ₃	–240 \pm 10° (0.19)	427 (19 300) 239 (33 600)	—	rotviolett
e	CH ₃	–328 \pm 10° (0.20)	443 (25 000) 241 (34 000)	440 (24 400)	rotviolett

³¹⁾ H. Brockmann und H. Gröne, Chem. Ber. **87**, 1036 (1954).

³²⁾ H. Brockmann und J.-H. Manegold, Chem. Ber. **100**, 3814 (1967).

Die Wasserlöslichkeit von **6b–d** und Actinomycin C₁ (**6e**) nimmt ab nach **6b** > **6e** > **6c** > **6d**. **6a**, rund 50° höher schmelzend als **6e**, ist in Wasser und Methanol weniger löslich als dieses. Dank hydrophober Wechselwirkung der Peptidlactonringe³³⁾ ist der Temperaturkoeffizient der Wasserlöslichkeit von **6a–d** ebenso wie bei **6e** negativ. Löslichkeit in lipophilen Solvenzien und R_F-Wert [Papierchromatogramm, Butylacetat/Dibutyläther/10proz. wäßr. Natrium-*m*-kresotinat (3 : 1 : 4)] nehmen zu nach **6b** < **6a** < **6e** < **6c** < **6d**. Die in Dimethylformamid auf Zusatz von wenig 0.1 *n* NaOH auftretenden Farben (Tab. 2) unterscheiden sich von denen der Chromophorester (Tab. 1).

Die biologische Wirksamkeit der Actinomycin C₁-Derivate

Dem Kalottenmodell des Actinomycin-DNS-Einschubkomplexes nach^{11,12)} sollten größere Alkylreste anstelle der 4.6-Methylgruppen von Actinomycin C₁ (**6e**) sterisch den Einschub des Chromophors zwischen die Basenpaare der DNS-Doppelhelix sowie elektronische Wechselwirkung zwischen dem 2-Amino-phenoxazon-(3)-Ringsystem und dem Guanin/Cytosin-Paar erschweren oder verhindern. In Einklang damit stehen die Testergebnisse (Tab. 3). Die Stabilitätskonstante des DNS-Komplexes sowie die antibiotische Wirksamkeit von 4.6-Diäthyl-4.6-didesmethyl-actinomycin C₁ (**6c**) sind deutlich kleiner als bei **6e**, während sich beim Di-tert.-butyl-4.6-didesmethyl-actinomycin C₁ (**6d**) keine Komplexbildung mit DNS und dementsprechend auch keine antibiotische Wirksamkeit nachweisen ließ.

Obleich die Methoxyl-Gruppen von 4.6-Dimethoxy-4.6-didesmethyl-actinomycin C₁ (**6b**) ein ähnliches Volumen haben wie die Äthyl-Gruppen von **6c**, ist die antibiotische Wirksamkeit von **6b** viel geringer als die von **6c**; und kleiner ist in Übereinstimmung damit auch die Stabilitätskonstante des **6b**-DNS-Komplexes. Grund dafür könnte sein, daß die Methoxyl-Gruppen hydratisiert sind und der zur Komplexbildung erforderliche Abbau der Hydrathülle durch den damit verbundenen Energieaufwand die Bindungsenergie des Komplexes verringert.

Tab. 3. Biologische Wirksamkeit von Actinomycin C₁ (**6e**) und seinen Derivaten **6a–d**

Formel R in 6a–d	6a H	6b OCH ₃	6c C ₂ H ₅	6d C(CH ₃) ₃	6e CH ₃
Bakteriostatische Wirksamkeit ^{a)}					
<i>Staph. aureus</i>	5	5	30	0	100
<i>Bac. subtilis</i>	1	1	50	0	100
Hemmung des Nucleotideinbaus in m-RNS ^{b)}	15%	25%			50%
Stabilitätskonstante des DNS-Komplexes bei 20° ^{11,12)}	7.1 · 10 ⁴	2.4 · 10 ⁵	7.5 · 10 ⁵	kein Komplex	2.3 · 10 ⁶

a) Verdünnungstest, Wirksamkeit bezogen auf Actinomycin C₁ = 100, dessen antibiotisch wirksame Grenzkonzentration für *Staph. aureus* bei 0.16 µg/ccm und für *Bac. subtilis* bei 0.08 µg/ccm lag.

b) Die Werte verdanken wir Herrn Dr. H. Matzura. Lösungen 2 · 10⁻⁷ molar.

³³⁾ W. Müller und I. Emme, Z. Naturforsch. **20b**, 835 (1965).

Zu berücksichtigen ist ferner, daß im Kalottenmodell des **6b**-DNS-Komplexes die 4.6-Methoxyl-Reste hydrophoben Gruppen der DNS-Doppelhelix benachbart sind, mit diesen aber im Gegensatz zu den 4.6-Methyl- und 4.6-Äthyl-Gruppen von **6e** bzw. **6c** nicht in hydrophobe Wechselwirkung treten können; d. h. im **6b**-Komplex entfällt ein Faktor, der beim **6e**- und **6c**-Komplex zur Stabilität beiträgt.

Bemerkenswert ist der niedrige Wert der Stabilitätskonstanten des DNS-Komplexes und die dementsprechend geringe antibiotische Wirksamkeit von 4.6-Didesmethylactinomycin C₁ (**6a**), Denn hier sollte der Einschub des 2-Amino-phenoxazon-(3)-Ringsystems zwischen die Basenpaare der DNS-Doppelhelix und seine Auflagerung auf das Guanin/Cytosin-Paar sterisch weniger behindert sein als bei **6c**. Erhöhen, wie angenommen, die 4.6-Methyl-Gruppen von **6e** durch hydrophobe Bindung an die DNS die Stabilität des Komplexes, so wäre das Fehlen dieser Bindungen im **6a**-DNS-Komplex für dessen geringe Stabilität und damit für die geringe antibiotische Wirksamkeit von **6a** verantwortlich. Ob außerdem noch andere Faktoren stabilitäts-erniedrigend wirken, bleibt offen.

Bei **6a**, **b** und **e** nimmt parallel zu den Stabilitätskonstanten der DNS-Komplexe auch die prozentuale Hemmung des Nucleotideinbaus in die m-RNS ab.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemie danken wir für Unterstützung unserer Arbeit, Herrn Dr. H. Lackner für die Messung der NMR-Spektren.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte sind im Berl-Block bestimmt und korrigiert.

Elektronenspektren: Zeiss PMQ II; NMR-Spektren (δ -Werte): Varian A 60 bzw. HA 100 (mit Tetramethylsilan als innerem Standard); Massenspektren: Atlas CH-4 bzw. SM 1 B.

Lösungsmittelsysteme für Chromatographie: LS I: Butanol/Butylacetat/3proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat (7 : 3 : 10). — LS II: (85 : 15 : 100). — LS III: Butylacetat/10proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat (1 : 1). — LS IV: Butanol/Dibutyläther/10proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat (1 : 2 : 3). Alle Kresotinatlösungen mit *m*-Kresotinsäure gesättigt. Cellulosepulver (Nr. 123) und Chromatographiepapier (2043 b) von Fa. Schleicher & Schüll, Dassel.

Quantitative Aminosäurebestimmungen nach Brockmann und Manegold³⁴.

Saures Kieselgel, a) lufttrocken, b) aktiviert: Neutrales Kieselgel (Gebr. Herrmann, Köln) wird in 0,1 *n* HCl aufgeschlämmt, abgesaugt und a) an der Luft bis zur Fließfähigkeit oder b) bei 110° getrocknet.

3-Acetamino-4-äthyl-benzoessäure (7a): Eine mit Pd-Mohr aushydrierte Lösung von 19,5 g 3-Nitro-4-äthyl-benzoessäure in 150 ccm Äthanol verdampfte man nach Abfiltrieren des Katalysators zur Trockene, löste die kristallisierte 3-Amino-4-äthyl-benzoessäure (16,4 g, aus verd. Methanol farblose Nadeln vom Schmp. 150–152°) unter Erwärmen in 100 ccm Eisessig und versetzte mit 17 ccm Acetanhydrid. Aus der Lösung kristallisierte **7a** (20 g) in farblosen Nadeln. Schmp. 273–275° (nach Umkristallisieren aus Methanol/Wasser).

C₁₁H₁₃NO₃ (207,2) Ber. C 63,75 H 6,32 N 6,76 Gef. C 63,86 H 6,16 N 6,85

3-Acetamino-4-tert.-butyl-benzoessäure (7b): 90 g 3-Nitro-4-tert.-butyl-benzoessäure³⁵, wie vorstehend in 600 ccm Äthanol hydriert, gaben 77 g kristallisierte 3-Amino-4-tert.-butyl-

³⁴ H. Brockmann und J.-H. Manegold, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **343**, 86 (1965).

³⁵ C. C. Price und D. C. Lincoln, J. Amer. chem. Soc. **72**, 2807 (1950).

*benzoesäure*³⁵) und diese in 225 ccm Eisessig mit 75 ccm *Acetanhydrid* 70 g kristallisiertes **7b**. Schmp. 250–252° (nach Umkristallisieren aus Methanol/Wasser).

$C_{13}H_{17}NO_3$ (235.3) Ber. C 66.36 H 7.28 N 5.95 Gef. C 66.66 H 7.32 N 5.86

2-Nitro-3-acetamino-4-äthyl-benzoesäure-methylester (11b) und 2-Nitro-5-acetamino-4-äthyl-benzoesäure-methylester (8b): 19 g **7a** gab man unter Rühren in 65 ccm auf 0–5° gehaltene 99proz. *Salpetersäure*, goß nach 2 Stdn. auf Eis, nahm das ausgefallene, getrocknete Nitrierungsprodukt (21.4 g) in 200 ccm Methanol auf und versetzte mit überschüssiger äther. *Diazomethan*-Lösung. Nach 2 Stdn. wurde das Lösungsmittel verdampft und der Rückstand aus 600 ccm Benzol/Äthylacetat (1:1) an einer 90 × 8-cm-Säule aus neutralem Kieselgel (Korngröße < 0.08 mm, 2% Leuchtstoff „Rot N“, Riedel-de Haën)¹⁹ chromatographiert. Aus der schneller laufenden Zone erhielt man 15.2 g (62%) **11b**; aus Benzol/Petroläther farblose Nadeln vom Schmp. 163–164°.

$C_{12}H_{14}N_2O_5$ (266.3) Ber. C 54.13 H 5.30 N 10.52 Gef. C 54.16 H 5.60 N 10.59

Aus der langsamer wandernden Zone isolierte man 5.0 g (20%) **8b**; aus Benzol/Petroläther farblose Nadeln vom Schmp. 132–133°.

$C_{12}H_{14}N_2O_5$ (266.3) Ber. C 54.13 H 5.30 N 10.52 Gef. C 54.25 H 5.36 N 10.64

2-Nitro-3-acetamino-4-tert.-butyl-benzoesäure-methylester (11d) und 2-Nitro-5-acetamino-4-tert.-butyl-benzoesäure-methylester (8d): Nitrierung von 70 g **7b** und Aufarbeitung wie vorstehend gab 77 g Nitrierungsprodukt. Nach Veresterung erhielt man bei Chromatographie an vier 90 × 8-cm-Säulen aus der schnelleren Zone 32 g (37%) **11d**; aus Benzol/Petroläther farblose Nadeln vom Schmp. 229–230°.

$C_{14}H_{18}N_2O_5$ (294.3) Ber. C 57.13 H 6.17 N 9.52 Gef. C 57.45 H 6.25 N 9.54

Die langsamere Zone lieferte 43.5 g (49%) **8d**; aus Benzol/Petroläther farblose Nadeln vom Schmp. 151–152°.

$C_{14}H_{18}N_2O_5$ (294.3) Ber. C 57.13 H 6.17 N 9.52 Gef. C 57.43 H 6.07 N 9.46

2-Nitro-3-hydroxy-4-äthyl-benzoesäure (12a): 20 g **11b** kochte man 50 Stdn. in 250 ccm 20proz. wäbr. *Kaliumhydroxid*, extrahierte die angesäuerte Lösung teilweise mit insgesamt 1 l Äthylacetat und verdampfte die mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschene organische Phase i. Vak. zur Trockene. Chromatographie des Rückstandes aus Benzol/Äthylacetat (7:3) an einer 50 × 7-cm-Säule aus saurem Kieselgel (lufttrocken) und Umkristallisieren des Inhaltsstoffes der gelben Hauptzone aus Benzol/Cyclohexan gab 14.3 g (90%) gelbe Nadeln vom Schmp. 142–144°.

NMR (DMSO- d_6): τ δ 1.18 (3) ($J = 7.5$ Hz), q 2.70 (2) ($J = 7.5$ Hz), s 7.42 (2); OH 10.00 (1) breit.

$C_9H_9NO_5$ (211.2) Ber. C 51.19 H 4.30 N 6.63 Gef. C 51.45 H 4.31 N 6.76

2-Nitro-3-hydroxy-4-äthyl-benzoesäure-methylester (12b): Eine von Chlorwasserstoff durchströmte Lösung von 4.0 g **12a** in 100 ccm *Methanol* hielt man 15 Stdn. am Sieden, gab sie dann in 400 ccm Wasser, extrahierte erschöpfend mit Äther und chromatographierte den Verdampfungsrückstand des Ätherauszuges aus Chloroform an einer 15 × 4-cm-Säule aus neutralem Kieselgel (Korngröße < 0.08 mm). Die schnell wandernde orangefarbene Hauptzone gab aus *n*-Pentan gelbe Nadeln vom Schmp. 42–43°, Ausb. 3.6 g (85%).

NMR (CDCl₃): τ δ 1.25 (3) ($J = 7.5$ Hz), q 2.52 (2) ($J = 7.5$ Hz), s 3.88 (3), d 6.98 (1) ($J = 8$ Hz), d 7.37 (1) ($J = 8.0$ Hz), s 10.31 (1).

$C_{10}H_{11}NO_5$ (225.2) Ber. C 53.33 H 4.92 N 6.22 Gef. C 53.63 H 5.12 N 5.91

2-Nitro-3-benzyloxy-4-äthyl-benzoessäure (13a): Unter ständigem Rühren versetzte man eine Lösung von 12.4 g **12a** und 7.5 g Kaliumhydroxid in 100 ccm Methanol mit 15.5 g *Benzylchlorid*, kochte 10 Stdn. unter Rückfluß und hielt zur Esterverseifung nach Zugabe von 70 ccm 20proz. wäbr. *Kaliumhydroxid* noch 30 Min. am Sieden. Aus der durch Wasserdampfdestillation von Methanol und Benzylalkohol befreiten roten Lösung wurde **13a** mit Salzsäure ausgefällt. Aus Äthanol/Wasser farblose Nadeln vom Schmp. 163–166°. Ausb. 12.7 g (72%).

NMR (DMSO- d_6): t δ 1.25 (3) ($J = 7$ Hz), q 2.33 (2) ($J = 7$ Hz), s 4.97 (2), s 7.40 (5), d 7.60 (1) ($J = 8$ Hz), d 7.80 ppm (1) ($J = 8$ Hz).

$C_{16}H_{15}NO_5$ (301.3) Ber. C 63.78 H 5.02 N 4.65 Gef. C 63.56 H 4.86 N 4.63

2-Nitro-5-hydroxy-4-äthyl-benzoessäure (9a): 3.0 g **8b**, umgesetzt und aufgearbeitet wie bei **12a** (Chromatographie aus Benzol/Äthylacetat 1 : 1 an 20×3.5 -cm-Säule) lieferten 2.1 g (89%) gelbliche Nadeln (aus Äthylacetat/Cyclohexan) vom Schmp. 164–166°.

NMR (DMSO- d_6): t δ 1.15 (3) ($J = 7$ Hz), q 2.63 (2) ($J = 7$ Hz), s 7.05 (1), s 7.84 (1).

$C_9H_9NO_5$ (211.2) Ber. C 51.19 H 4.30 N 6.63 Gef. C 51.50 H 4.36 N 6.63

4-Nitro-2-äthyl-phenol (10): Eine mit 0.5 g *Kupferpulver* versetzte Lösung von 0.5 g **9a** in 10 ccm *Chinolin* hielt man am Sieden, bis die CO_2 -Entwicklung beendet war, goß in 100 ccm Wasser und extrahierte die vom Kupfer abfiltrierte, mit konz. Salzsäure angesäuerte Lösung mit Äther. Der beim Verdampfen des Äthers hinterbliebene Rückstand (150 mg, 38%) kristallisierte aus Petroläther in farblosen Nadeln vom Schmp. 78–80°.

NMR ($CDCl_3$): t δ 1.25 (3) ($J = 7.5$ Hz), q 2.73 (2) ($J = 7.5$ Hz), s 6.23 (1), dd 6.76 (1) ($J = 8$ Hz und 2 Hz), dd 8.00 (1) ($J = 8$ Hz und 2 Hz), s 8.07 (1).

$C_8H_9NO_3$ ((167.2) Ber. C 57.84 H 5.42 N 8.36 Gef. C 57.59 H 5.43 N 8.46

2-Nitro-3-hydroxy-4-tert.-butyl-benzoessäure (12c): 20 g **11d** wie bei **12a** umgesetzt und aufgearbeitet (40proz. wäbr. *Kaliumhydroxid* statt 20proz.; 20×6 -cm-Säule, Benzol/Äthylacetat, 1 : 1) lieferten 14 g (86%) **12c**, aus Äthylacetat/n-Pentan gelbe Kristalle vom Schmp. 199° (Zers.).

NMR (Aceton- d_6): s δ 1.48 (9), d 7.40 (1) ($J = 8$ Hz), d 7.70 (1) ($J = 8$ Hz), OH 9.25 (breit).

$C_{11}H_{13}NO_5$ (239.2) Ber. C 55.23 H 5.48 N 5.86 Gef. C 55.69 H 5.72 N 5.97

2-Nitro-5-hydroxy-4-tert.-butyl-benzoessäure (9b): 20 g **8d** wie bei **12c** umgesetzt, gaben ohne Chromatographie 14.4 g (88%) **9b**; aus Benzol/Petroläther farblose Oktaeder vom Schmp. 199°. Ein Gemisch mit **12c** (Schmp. 199°) schmolz bei 175°.

NMR (DMSO- d_6): s δ 1.36 (9), s 7.02 (1), s 7.80 (1), OH 5.00 (breit).

$C_{11}H_{13}NO_5$ (239.2) Ber. C 55.23 H 5.48 N 5.86 Gef. C 55.40 H 5.49 N 5.96

2-Nitro-3-hydroxy-4-tert.-butyl-benzoessäure-methylester (12d): 4.0 g **12c** wurden verestert und aufgearbeitet wie bei **12b**. Ausb. 3.75 g (89%), aus Methanol/Wasser gelbe Nadeln vom Schmp. 93–95°.

NMR ($CDCl_3$): s δ 1.40 (9), s 3.90 (3), d 6.98 (1) ($J = 8$ Hz), d 7.52 (1) ($J = 8$ Hz), s 9.80 (1).

$C_{12}H_{15}NO_5$ (253.3) Ber. C 56.91 H 5.97 N 5.53 Gef. C 56.75 H 5.83 N 5.67

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-benzoyl]-L-threonin (2a): Eine Suspension von 5.7 g **13e** mit Schmp. 196–198° (aus **12e** analog dargestellt wie **13a**¹⁷⁾) in 15 ccm *Thionylchlorid* hielt man 15 Min. am Sieden und verdampfte i. Vak. zur Trockene. Das hinterbliebene, kristallisierte,

i. Vak. über Kaliumhydroxid getrocknete **13e**-Chlorid nahm man in 90 ccm Benzol/Äther (7:2) auf, versetzte bei 0° mit 2.4 g *L*-Threonin in 40.5 ccm 0.5*n* NaOH und dann am Vibromischer tropfenweise mit 20.3 ccm *n* NaOH. Nach 3 Stdn. wurde die wäbr. Phase abgetrennt, mehrmals mit Äther durchgeschüttelt, angesäuert und erschöpfend mit Äthylacetat extrahiert. Das nach Verdampfen des Äthylacetats hinterbliebene **2a** kristallisierte aus Aceton/Chloroform in farblosen Nadeln vom Schmp. 130–131°. Ausb. 5.7 g (73%), $[\alpha]_D^{20}$: $-70 \pm 1^\circ$ ($c = 1.6$, Äthanol).

$C_{18}H_{18}N_2O_7$ (374.3) Ber. C 57.75 H 4.85 N 7.48 Gef. C 57.73 H 4.90 N 7.47

Dicyclohexylammoniumsalz von N-[2-Nitro-4-methoxy-3-benzyloxy-benzoyl]-L-threonin (2b): 6.2 g **13f**³⁶, wie vorstehend mit *Thionylchlorid* behandelt und als **13f**-Chlorid in Benzol/Äther (2:1) suspendiert mit *L*-Threonin umgesetzt, gab ein amorphes Kupplungsprodukt, das in 35 ccm Äthylacetat bei 0° mit 3.8 g *Dicyclohexylamin* in 35 ccm Äther versetzt wurde. Das ausgefallene Salz (7.4 g, 62%) kristallisierte aus Äthylacetat in farblosen Nadeln vom Schmp. 167–169°. $[\alpha]_D^{20}$: $-7.7 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1.5$, Methanol).

$(C_6H_{11})_2NH_2]C_{19}H_{19}N_2O_8$ (585.7) Ber. C 63.57 H 7.40 N 7.18 Gef. C 63.60 H 7.52 N 7.05

N-[2-Nitro-4-methoxy-3-benzyloxy-benzoyl]-L-threonin (2b): 4.1 g des vorstehenden *Dicyclohexylammoniumsalzes* in 200 ccm Methanol/Wasser (3:1) schüttelte man 1 Stde. mit 7 g Ionenaustauscher (E. Merck, H[⊖]-Form), engte die abfiltrierte Lösung auf 50 ccm ein, versetzte mit wenig verd. Salzsäure und extrahierte mehrmals mit Äthylacetat. Chromatographie des Äthylacetat-Rückstandes aus Chloroform/Aceton (1:1) an einer 15 × 2.8-cm-Säule aus saurem Kieselgel gab eine im UV-Licht bei 366 m μ erkennbare Hauptzone, aus deren mit Wasser gewaschenem Eluat 2.7 g (95%) amorphes **2b** isoliert wurde. $[\alpha]_D^{21}$: $-42.0 \pm 1^\circ$ ($c = 1.6$, Äthanol).

$C_{19}H_{20}N_2O_8$ (404.4) Ber. C 56.43 H 4.99 N 6.93 Gef. C 56.44 H 5.06 N 7.07

Dicyclohexylammoniumsalz von N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-äthyl-benzoyl]-L-threonin (2c): 6.3 g **13a** verwandelte man wie bei **2a** ins Chlorid, kuppelte dieses mit 2.4 g *L*-Threonin und erhielt das *Dicyclohexylammoniumsalz* aus Äthanol oder Chloroform in farblosen Nadeln vom Schmp. 178°. Ausb. 7.5 g (61%), $[\alpha]_D^{21}$: $-18 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1.5$, Methanol).

$(C_6H_{11})_2NH_2]C_{20}H_{21}N_2O_7$ (583.7) Ber. C 65.84 H 7.77 N 7.20 Gef. C 65.67 H 7.68 N 7.38

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-äthyl-benzoyl]-L-threonin (2c): 2.9 g des vorstehenden *Dicyclohexylammoniumsalzes*, mit Ionenaustauscher umgesetzt und aufgearbeitet wie bei **2b**, gaben 1.85 g (92%) gelbliches, amorphes **2c**. $[\alpha]_D^{21}$: $-58 \pm 1^\circ$ ($c = 1.6$, Methanol).

$C_{20}H_{22}N_2O_7$ (402.4) Ber. C 59.69 H 5.51 N 6.96 Gef. C 59.52 H 5.53 N 7.01

N-[2-Nitro-3-hydroxy-4-tert.-butyl-benzoyl]-L-threonin-methylester (14a): Zu 4.8 g **12c** und 2.66 g *L*-Threonin-methylester in 300 ccm Methylenchlorid gab man bei 0° eine gesättigte Lösung von 4.2 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (Farbumschlag von gelb nach rot) und rührte 2 Stdn. bei 0° und 12 Stdn. bei 20°. Die vom *Dicyclohexylharnstoff* abfiltrierte, mit *n* HCl und 5proz. wäbr. Natriumhydrogencarbonat durchgeschüttelte Lösung verdampfte man i. Vak. zur Trockene, hielt die Lösung des Rückstandes in 400 ccm Aceton einige Stdn. bei 0° und filtrierte vom *Dicyclohexylharnstoff* ab. Das nach Verdampfen des Acetons hinterbliebene **14a** kristallisierte aus Äthylacetat in gelben Prismen (5.3 g, 75%) vom Schmp. 198–199°. $[\alpha]_D^{20}$: $-62.5 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1.3$, Methanol).

$C_{16}H_{22}N_2O_7$ (354.4) Ber. C 54.23 H 6.26 N 7.91 Gef. C 54.50 H 6.40 N 8.00

³⁶ Chow-Shu-Wei, Kao Yee-sheng, Chou Ching-Hsu und Hsu Bin, *Scientia Sinica* **12**, 49 (1963).

N-[2-Nitro-3-methoxy-4-*tert*-butyl-benzoyl]-*L*-threonin-methylester (**14c**): Eine mit überschüssigem äther. Diazomethan versetzte Lösung von 300 mg **14a** in 30 ccm Methanol verdünnte man nach 30 Min. mit 50 ccm Chloroform und erhielt aus der mit verd. Salzsäure und wäßr. Natriumhydrogencarbonat gewaschenen organischen Phase 283 mg (91%) **14c**, das aus Äthylacetat/Cyclohexan in gelblichen Nadeln vom Schmp. 160° kristallisierte. $[\alpha]_D^{20}$: $-62 \pm 1^\circ$ ($c = 1.0$, Methanol).

$C_{17}H_{24}N_2O_7$ (368.4) Ber. C 55.43 H 6.56 N 7.61 Gef. C 55.30 H 6.48 N 7.65

N-[2-Nitro-3-hydroxy-4-*tert*-butyl-benzoyl]-*L*-threonin (**14b**): 1.77 g **14a** in 20 ccm *n* NaOH rührte man 30 Min. bei 20°, verdünnte mit 300 ccm Wasser, schüttelte einmal mit Chloroform aus, extrahierte die mit Salzsäure angesäuerte wäßr. Phase mit Äthylacetat und erhielt nach Verdampfen des Äthylacetates 1.65 g (98%) amorphes, gelbes **14b** mit $[\alpha]_D^{20}$: $-70 \pm 1^\circ$ ($c = 1.2$, Methanol).

$C_{15}H_{20}N_2O_7$ (340.3) Ber. C 52.93 H 5.92 N 8.23 Gef. C 52.81 H 6.04 N 8.11

2-Amino-4,6-diäthyl-phenoxazon-(3)-dicarbonsäure-(1,9)-dimethylester (**29c**): Eine mit Pd/Kohle aushydrierte Lösung von 2.25 g **12b** in 50 ccm Methanol wurde nach Abfiltrieren des Katalysators mit 200 ccm auf 40° erwärmten 0.07 *m* Phosphatpuffer (pH 7.2) und dann anteilweise unter Rühren mit einer Lösung von 9.9 g Kaliumhexacyanoferrat(III) in 75 ccm Puffer versetzt, wobei man mit *n* NaOH auf pH 7.2 hielt, Nach 1 Stde. löste man das ausgefallene, abzentrifugierte **29c** in Chloroform, wusch mit Wasser und erhielt aus der eingeeengten, mit Methanol versetzten Lösung 1.75 g (91%) rotbraune Nadeln vom Schmp. 172–173°.

UV (Methanol): λ_{max} 435, 240 m μ ($\epsilon = 29200, 37400$).

NMR (CDCl₃): τ δ 1.17 (3), τ 1.34 (3) (beide mit 7 Hz), τ 2.78, τ 2.95 (zusammen (4), $J = 7$ Hz), τ 4.00 (6), τ 7.30 (1) ($J = 8$ Hz), τ 7.60 (1) ($J = 8$ Hz), NH 7.70 (breit).

$C_{20}H_{20}N_2O_6$ (384.4) Ber. C 62.49 H 5.24 N 7.29

Gef. C 62.48 H 5.26 N 7.38 Mol.-Gew. 384 (Massenspektrum)

2-Amino-4,6-di-*tert*-butyl-phenoxazon-(3)-dicarbonsäure-(1,9)-dimethylester (**29d**): Zu einer mit Pd/Kohle aushydrierten, filtrierten Lösung von 1.27 g **12d** in 50 ccm Äthanol gab man 200 ccm 0.07 *m* Phosphatpuffer (pH 7.2) und anteilweise eine konz. Lösung von 4.45 g Kaliumhexacyanoferrat(III) in Puffer. Nach 1 Stde. schüttelte man mit Chloroform aus, wusch mit Wasser, löste den Chloroform-Abdampfrückstand (1 g) in 100 ccm Eisessig und kochte nach Zugabe von 4 ccm Trifluoressigsäure 3 Min. unter Durchleiten von Sauerstoff, wobei die anfangs rote Lösung gelbrot wurde. Nach 10 Min. versetzte man mit dem doppelten Vol. Chloroform sowie viel Wasser und erhielt aus der mit wäßr. Natriumhydrogencarbonat gewaschenen Chloroformphase nach zweimaligem Umkristallisieren aus Chloroform/Methanol 550 mg (50%) gelbbraune Prismen vom Schmp. 166–168°.

UV (Methanol): λ_{max} 422, 240 m μ ($\epsilon = 26500, 34700$).

NMR (CDCl₃): τ δ 1.51 (9), τ 1.56 (9), τ 3.91 (3), τ 3.94 (3), τ 7.44 (2), NH 7.35 (breit).

$C_{24}H_{28}N_2O_6$ (440.5) Ber. C 65.44 H 6.41 N 6.36

Gef. C 65.38 H 6.45 N 6.42 Mol.-Gew. 440 (Massenspektrum)

N,N'-[3-Amino-2'-hydroxy-5,3'-di-*tert*-butyl-benzochinon-(1,4)-1-anil-dicarbonyl-(2,6')]-bis[*L*-threonin-methylester] (**24d**): Eine Lösung von 1.77 g **14a** in 200 ccm Methanol wurde mit Pd-Mohr aushydriert, vom Katalysator abfiltriert und mit 300 ccm Methanol sowie 250 ccm 0.07 *m* Phosphatpuffer (pH 7.2) verdünnt. Nach Zugabe von 5 g in wenig Wasser gelöstem Kaliumhexacyanoferrat(III) (Farbumschlag nach rot) und 250 ccm Puffer rührte man 12 Std. bei 20°, schüttelte mit Chloroform aus und erhielt nach Verdampfen des Chloroforms 1.4 g

(87%) **24d**, das aus Benzol/Petroläther in braunroten Nadeln vom Schmp. 206° kristallisierte und auf der Kieselgelplatte (Äthylacetat/Cyclohexan, 4:1) nur eine Zone bildete.

UV (Methanol): λ_{\max} 486, 300 m μ ($\epsilon = 4900, 14900$).

$C_{32}H_{44}N_4O_{10}$ (644.7) Ber. C 59.61 H 6.88 N 8.69 O 24.82
Gef. C 59.91 H 6.92 N 8.46 O 25.05

N,N'-[2-Amino-4.6-di-*tert*-butyl-phenoazon-(3)-dicarbonyl-(1.9)]-bis-*L*-threonin-methyl-ester] (**26d**): Eine mit 0.5 ccm Trifluoressigsäure versetzte rote Lösung von 100 mg **24d** in 25 ccm Eisessig hielt man unter Durchleiten von Sauerstoff 2–3 Min. am Sieden (Gelbfärbung), unterbrach die Sauerstoffzufuhr, verdünnte nach 20 Min. mit 100 ccm Chloroform, entfernte die Säuren durch mehrmaliges Ausschütteln mit Wasser und chromatographierte den Verdampfungsrückstand der Chloroformlösung aus Chloroform/Methanol (98:2) an einer 15 \times 2.5-cm-Säule aus Aluminiumoxid IV (neutral, Woelm). Aus dem eingeeengten Chloroformulat der Hauptzone fiel Cyclohexan 60 mg (60%) gelbrotes, amorphes **26d** mit $[\alpha]_D^{20}$: +82 \pm 3° ($c = 0.1$, Chloroform).

UV (Methanol): λ_{\max} 422, 239 m μ ($\epsilon = 22000, 35500$).

NMR (CDCl₃): d δ 1.26 (6) ($J = 7$ Hz), s 1.54, s 1.57 (zusammen 18), s 3.70 (3), s 3.80 (3), m 4.40 (2), dd 4.80 (1) ($J = 8$ und 3 Hz), q 5.04 (1), d 7.43 (1) ($J = 8$ Hz), d 7.52 (1) ($J = 8$ Hz), NH 11.7 (breit).

$C_{32}H_{42}N_4O_{10}$ (642.7) Ber. C 59.80 H 6.59 N 8.69 Gef. C 59.99 H 6.49 N 8.61

3.6-Di-*tert*-butyl-benzochinon-(1.2) (**33**): Zu 220 mg **30**²⁵) in 25 ccm Methanol gab man unter Rühren langsam eine Lösung von 1 g Kaliumhexacyanoferrat(III) in 50 ccm 0.07 *m* Phosphatpuffer (pH 7.2), hielt durch Zugabe von 2 *n* NaOH ständig bei pH 7.2, verdünnte nach 3 Stdn. mit Wasser und extrahierte erschöpfend mit Chloroform. Der Verdampfungsrückstand des Chloroformauszuges gab aus Benzol an einer 30 \times 2.5-cm-Kieselgel G-Säule eine grüne Hauptzone, die aus *n*-Hexan dunkelbraune Nadeln (145 mg) ergab; Schmp. 204°.

$C_{14}H_{20}O_2$ (220.3) Ber. C 76.32 H 9.23 O 14.53 Gef. C 76.20 H 9.04 O 14.61

2-Amino-5-[2-methoxy-6-methoxycarbonyl-anilino]-3-methoxycarbonyl-benzochinon-(1.4) (**40b**): 100 mg des aus **36a** durch Luftoxydation bei pH 11.6 entstandenen roten, kristallisierten Kondensationsproduktes²⁶) in 15 ccm Tetrahydrofuran versetzte man mit überschüssiger äther. Diazomethan-Lösung und verdampfte nach 2 Stdn. zur Trockene. Der Rückstand kristallisierte aus Chloroform/Methanol in roten Nadeln vom Schmp. 221° (65 mg, 57%) und gab auf der Kieselgel-Dünnschichtplatte (Äthylacetat/Cyclohexan 8:2) eine einheitliche Zone.

UV (Methanol): λ_{\max} 486, 325, 269 m μ ($\epsilon = 2200, 19100, 13000$).

$C_{17}H_{16}N_2O_7$ (360.3) Ber. C 56.67 H 4.47 N 7.78 O 31.08
Gef. C 56.63 H 4.46 N 7.72 O 31.10
Masse Ber. 360.096 Gef. 360.094

3-Methoxy-anthransäure (**36c**) aus **40b**: Eine Lösung von 10 mg **40b** in 2 ccm 5 *n* NaOH erhitzte man 1 Stde. unter Stickstoff, säuerte mit Salzsäure an und verdampfte zur Trockene. Der Rückstand zeigte im Rund-Papierchromatogramm (Laufmittel: Butanol mit 5 *n* Ammoniak gesättigt) eine im UV-Licht blau fluoreszierende Zone mit dem R_F -Wert von **36c**.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-benzylester (**3a**): Zu einer Lösung von 1.01 g **2a** und 0.37 ccm Triäthylamin in 10 ccm Nitromethan, in die man unter Rühren 0.7 g fein zerkleinertes *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-3'-sulfonat eingetragen hatte, gab man nach 7 Min. eine Lösung von 1.42 g 1-Hydrochlorid⁵)

und 0.40 ccm Triäthylamin in 15 ccm Nitromethan. Nach 10 Stdn. wurde das Lösungsmittel i. Vak. verdampft, die Lösung des Rückstandes in Chloroform mit 2*n* HCl und 5proz. wäbr. Natriumhydrogencarbonat gewaschen und das nach Verdampfen des Chloroforms hinterbleibende Rohprodukt (2.2 g) aus Benzol an einer 20 × 2-cm-Säule aus Aluminiumoxid IV (neutral, Woelm) chromatographiert, wobei Verunreinigungen ins Filtrat gingen. Das Chloroform- oder Äthylacetat-Eluat der Hauptzone wurde durch ein gehärtetes Filter gegeben und lieferte nach Verdampfen des Lösungsmittels 1.5 g (66%) farbloses, amorphes **3a**. $[\alpha]_D^{20}$: $-53 \pm 1^\circ$ ($c = 0.4$, Methanol). — Zur Analyse wurde 5 Stdn. i. Hochvak. bei 80° getrocknet.

C₄₄H₅₆N₆O₁₁ (844.9) Ber. C 62.55 H 6.69 N 9.95 Gef. C 62.45 H 6.74 N 10.05

N-[2-Nitro-4-methoxy-3-benzyloxy-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-benzylester (**3b**): 1.09 g **2b**, mit 1.42 g **1**-Hydrochlorid umgesetzt und aufgearbeitet wie bei **3a**, gaben 1.55 g (66%) farbloses, amorphes **3b**, $[\alpha]_D^{20}$: $-40 \pm 2^\circ$ ($c = 0.75$, Methanol). — Zur Analyse wurde zusätzlich aus Chloroform/Methanol (95 : 5) an neutralem Kieselgel chromatographiert und 8 Stdn. bei 80° i. Hochvak. getrocknet.

C₄₅H₅₈N₆O₁₂ (875.0) Ber. C 61.77 H 6.68 N 9.61 Gef. C 61.63 H 6.80 N 9.78

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-äthyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-benzylester (**3c**): 1.09 g **2c**, mit 1.42 g **1**-Hydrochlorid umgesetzt und aufgearbeitet wie bei **3a**, gaben 1.5 g (64%) farbloses, amorphes **3c**, das 8 Stdn. bei 60° i. Hochvak. getrocknet wurde. $[\alpha]_D^{20}$: $-50 \pm 2^\circ$ ($c = 0.75$, Methanol).

C₄₆H₆₀N₆O₁₁ (873.0) Ber. C 63.28 H 6.93 N 9.63 Gef. C 63.09 H 7.06 N 9.82

N-[2-Nitro-3-hydroxy-4-tert.-butyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-benzylester (**3f**): Zu einer Lösung von 1.02 g **2f** und 1.58 g **1**-Hydrochlorid in 60 ccm Methylenchlorid gab man 0.43 ccm Triäthylamin, versetzte bei 0° mit 0.62 g in wenig Methylenchlorid gelöstem Dicyclohexylcarbodiimid und rührte 2 Stdn. bei 0° sowie 12 Stdn. bei 20°. Die vom Dicyclohexylharnstoff abfiltrierte Lösung wurde mit verd. Salzsäure und wäbr. Natriumhydrogencarbonat gewaschen und ihr Verdampfungsrückstand (2 g) aus Chloroform/Methanol (95 : 5) an einer 65 × 5-cm-Säule aus Kieselgel G chromatographiert. Aus der gelben Hauptzone erhielt man 1.5 g (58%) amorphes **3f** mit $[\alpha]_D^{20}$: $-53 \pm 1^\circ$ ($c = 0.65$, Methanol). — Zur Analyse wurde 5 Stdn. bei 60° i. Hochvak. getrocknet.

C₄₁H₅₈N₆O₁₁ (810.9) Ber. C 60.73 H 7.22 N 10.37 Gef. C 60.54 H 7.24 N 10.34

4.6-Didesmethyl-actinomycin C₁-säure (**5a**): Eine Lösung von 1.25 g **3a** in 40 ccm Methanol wurde mit Pd/Kohle aushydriert, vom Katalysator abfiltriert, auf die Hälfte eingengt und mit 40 ccm 0.07 *m* Phosphatpuffer (pH 7.2) versetzt. Unter Rühren gab man portionsweise 1.5 g Kaliumhexacyanoferrat(III) in 10 ccm Phosphatpuffer hinzu (Rotfärbung), hielt mit *n* NaOH stets bei pH 7.2 (Glaselektrode), versetzte nach 5 Stdn. mit 250 ccm Wasser, extrahierte nach Ansäuern mit Salzsäure erschöpfend mit Chloroform und chromatographierte den braunroten Rückstand (850 mg) des mit angesäuertem Wasser gewaschenen Chloroformauszuges an einer 50 × 4-cm-Cellulosesäule (LS I). Das Methanol-Eluat der langsam wandernden, aus der Säule ausgeschrittenen Hauptzone wurde mit dem dreifachen Vol. Wasser verdünnt, mit Salzsäure angesäuert, mit Chloroform extrahiert und der Verdampfungsrückstand der Chloroformphase aus Chloroform an einer 15 × 2-cm-Säule aus saurem Kieselgel chromatographiert. Nachwaschen mit Chloroform/Aceton (4 : 1) entfernte die *m*-Kresotinsäure, Methanol eluierte **5a**. Das mit der dreifachen Wassermenge verdünnte, angesäuerte Methanol-Eluat extrahierte man mit Chloroform, verdampfte den mit angesäuertem Wasser gewaschenen, durch ein Hartfilter gegebenen Auszug, fällte den Rückstand aus Methanol

mit Äthylacetat um und erhielt **5a** als gelbrot Pulver, das 20 Stdn. bei 90° i. Hochvak. getrocknet wurde und sich oberhalb 185° zersetzte. Ausb. 600 mg (64%), $[\alpha]_D^{20}$: $-170 \pm 2^\circ$ ($c = 0.15$, Methanol).

UV (Methanol): λ_{\max} 441, 422, 234 m μ ($\epsilon = 22100, 21700, 40000$).

C₆₀H₈₆N₁₂O₁₈ (1263.4) Ber. C 57.04 H 6.86 N 13.32 Gef. C 56.88 H 6.97 N 13.42
Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Pro 2.0 Sar 2.0 MeVal 2.0
Gef. Mol Thr 1.5³⁷⁾ Val 1.8 Pro 1.9 Sar 1.9 MeVal 2.0

4.6-Dimethoxy-4.6-didesmethyl-actinomycin C₁-säure (**5b**): 1.15 g **3b**, mit Kaliumhexacyanoferrat(III) wie bei **5a** oxydiert und aufgearbeitet (LS II statt LS I), lieferten 375 mg (47%) gelbrotes, amorphes **5b**, das bei 90° 30 Stdn. i. Hochvak. getrocknet wurde. $[\alpha]_D^{20}$: $-134 \pm 4^\circ$ ($c = 0.2$, Methanol). Zers. oberhalb 185°.

UV (Methanol): λ_{\max} 448, 246 m μ ($\epsilon = 27600, 45700$).

C₆₂H₉₀N₁₂O₂₀ (1323.4) Ber. C 56.25 H 6.85 N 12.67 Gef. C 56.01 H 6.99 N 12.40
Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Pro 2.0 Sar 2.0 MeVal 2.0
Gef. Mol Thr 1.5³⁷⁾ Val 1.8 Pro 1.9 Sar 1.9 MeVal 2.0

4.6-Diäthyl-4.6-didesmethyl-actinomycin C₁-säure (**5c**): 1.29 g **3c**, oxydiert mit Kaliumhexacyanoferrat(III) und aufgearbeitet wie bei **5a**, gaben 600 mg (62%) gelbrotes, amorphes **5c**, das 25 Stdn. bei 110° i. Hochvak. getrocknet wurde. $[\alpha]_D^{20}$: $-138 \pm 4^\circ$ ($c = 0.2$, Methanol). Zers. oberhalb 180°.

UV (Methanol): λ_{\max} 446, 239 m μ ($\epsilon = 27800, 44300$).

C₆₄H₉₄N₁₂O₁₈ (1319.5) Ber. C 58.25 H 7.18 N 12.74 Gef. C 57.93 H 7.29 N 12.69
Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Pro 2.0 Sar 2.0 MeVal 2.0
Gef. Mol Thr 1.8³⁷⁾ Val 2.0 Pro 1.8 Sar 1.9 MeVal 2.0

4.6-Di-tert.-butyl-4.6-didesmethyl-actinomycin C₁-säure (**5d**): 1.3 g **3f** wurden wie bei **5a** in 70 ccm Methanol aushydriert und oxydiert [100 ccm 0.07 m Phosphatpuffer pH 7.2, 1.5 g Kaliumhexacyanoferrat(III)]. Den wie bei **5a** gewonnenen Chloroformextrakt verdampfte man zur Trockene, nahm den Rückstand in 40 ccm Eisessig auf, versetzte mit 2 ccm Trifluoressigsäure und kochte 3 Min. unter Durchleiten von Sauerstoff. Nach Zugabe von Chloroform schüttelte man mehrmals mit Wasser durch, verdampfte die Chloroformphase zur Trockene, nahm den Rückstand in wenig Äthylacetat auf und fällte mit n-Pentan ein gelbbraunes Rohprodukt (785 mg), das aus Methanol an einer 45 × 6-cm-Säule aus MN-Polyamid-SC 6, Korngröße <0.16 mm, chromatographiert wurde. Das Methanol/Eisessig (99 : 1)-Eluat der herausgeschnittenen Hauptzone versetzte man mit viel Chloroform, schüttelte mehrmals mit Wasser aus, verdampfte das Chloroform und chromatographierte den Rückstand aus Chloroform an einer 15 × 2.5-cm-Säule aus saurem, lufttrockenen Kieselgel, wusch mit 200 ccm Chloroform nach und eluierte mit Methanol. Das mit Wasser versetzte Eluat wurde mit Chloroform extrahiert und das beim Verdampfen des Chloroforms hinterbliebene **5d** aus Äthylacetat mit n-Pentan umgefällt. Gelbrotes Pulver (450 mg, 46%) mit $[\alpha]_D^{20}$: $-51 \pm 3^\circ$ ($c = 0.16$, Methanol). — Zur Analyse wurde 20 Stdn. bei 80° i. Hochvak. getrocknet.

UV (Methanol): λ_{\max} 424, 237 m μ ($\epsilon = 20500, 38700$).

C₆₈H₁₀₂N₁₂O₁₈ (1375.6) Ber. C 59.36 H 7.47 N 12.20 O 20.97
Gef. C 59.07 H 7.49 N 12.11 O 20.85

³⁷⁾ Bei der Totalhydrolyse von Actinomycinen und Actinomycinsäuren wird ein Teil des Threonins zerstört.

4.6-Didesmethyl-actinomycin C₁ (**6a**): Zu 28.6 g *Imidazol* („Fluka“ reinst) in 350 ccm wasserfreiem Tetrahydrofuran gab man unter Rühren am Rückflußkühler bei 20° 14.9 ccm *Acetylchlorid*, rührte 1 Stde. bei 55° und saugte rasch vom weißen Niederschlag ab. Das warme Filtrat wurde nach Zugabe von 22.4 ccm *Acetylchlorid* noch 1 Stde. bei 55° gerührt und dann vom hellgelben Niederschlag in einen auf 55° vorgewärmten Meßzylinder dekantiert. Das „Cyclisierungsreagenz“ wurde sofort verwendet.

Eine Mischung aus 165 ccm der warmen Reagenzlösung und 425 mg **5a** in 30 ccm absol. Tetrahydrofuran hielt man 2 Stdn. bei 55°, verdampfte das Lösungsmittel i. Vak. und schüttelte die Chloroformlösung des Rückstands mit verd. Salzsäure sowie wäßr. Natriumhydrogencarbonat durch. Den Eindampfrückstand der Chloroformlösung chromatographierte man aus Benzol an einer 15 × 3.5-cm-Säule aus neutralem Aluminiumoxid (IV, Woelm), wusch mit Benzol nach, eluierte mit Äthylacetat und chromatographierte den Verdampfungsrückstand (270 mg) des Eluates an einer 50 × 4-cm-Cellulosesäule (LS III).

Das Methanol-Eluat der aus der Säule ausgeschnittenen Hauptzone wurde mit dem vierfachen Vol. Wasser verdünnt, mit Benzol ausgeschüttelt, der mit wäßr. Natriumhydrogencarbonat und verd. Salzsäure gewaschene Benzolauszug verdampft und der Rückstand an einer 10 × 3.5-cm-Säule aus neutralem Aluminiumoxid (IV, Woelm) adsorbiert. Nachdem mit Benzol nachgewaschen war, eluierte man mit Äthylacetat, gab das Eluat durch ein Hartfilter und erhielt das beim Verdampfen des Lösungsmittels hinterbliebene **6a** aus Methanol in gelbroten Kristallen vom Schmp. 290–293°. Ausb. 85 mg (21%). — Zur Analyse wurde 24 Stdn. i. Hochvak. auf 130° erhitzt.

C₆₀H₈₂N₁₂O₁₆ (1227.4) Ber. C 58.71 H 6.73 N 13.71 Gef. C 58.93 H 6.84 N 13.39

4.6-Dimethoxy-4.6-didesmethyl-actinomycin C₁ (**6b**): 235 mg **5b** in 15 ccm Tetrahydrofuran gaben, umgesetzt mit 85 ccm *Cyclisierungsreagenz* und aufgearbeitet wie bei **6a**, 50 mg (22%) **6b**, aus Äthylacetat/Cyclohexan gelbrote Nadeln vom Schmp. 242–244°. — Zur Analyse wurde 30 Stdn. i. Hochvak. auf 120° erhitzt.

C₆₂H₈₆N₁₂O₁₈ (1287.4) Ber. C 57.84 H 6.73 N 13.06 Gef. C 58.10 H 6.97 N 12.89

4.6-Diäthyl-4.6-didesmethyl-actinomycin C₁ (**6c**): 329 mg **5c** in 25 ccm Tetrahydrofuran, umgesetzt mit 142 ccm *Cyclisierungsreagenz* und aufgearbeitet wie bei **6a** (LS IV statt LS III), gaben 115 mg (30%) **6c**, aus Äthylacetat/Petroläther gelbrote Prismen vom Schmp. 242° (Zers.). — Zur Analyse wurde 30 Stdn. i. Hochvak. auf 110° erhitzt.

C₆₄H₉₀N₁₂O₁₆ (1283.5) Ber. C 59.89 H 7.07 N 13.09 Gef. C 59.83 H 7.38 N 12.95

4.6-Di-*tert.*-butyl-4.6-didesmethyl-actinomycin C₁ (**6d**): 630 mg **5d** in 50 ccm Tetrahydrofuran wurden mit 228 ccm *Cyclisierungsreagenz* umgesetzt und bis zur Adsorption an Aluminiumoxid IV aufgearbeitet wie bei **6a**. Der mit Benzol nicht eluierbare Anteil trennte sich beim Nachwaschen mit Äthylacetat in eine schnell und eine nur langsam ins Filtrat gehende Fraktion. Chromatographie der schnell eluierbaren Fraktion unter Lichtabschluß auf drei Kieselgel G-Platten (20 × 20 cm, Schichtdicke 2.5 mm) mit Benzol/Äthylacetat/Methanol (10 : 25 : 1) gab neben zwei anderen eine schnell wandernde gelbe Hauptzone, deren Methanol-Eluat mit Wasser verdünnt und mit Benzol extrahiert wurde. Aus dem Verdampfungsrückstand des Methanol-Auszuges erhielt man nach Umfällen aus Äthylacetat/*n*-Pentan **6d** als gelbrotes Pulver (29 mg, 5%). Zur Analyse wurde 30 Stdn. i. Hochvak. auf 110° erhitzt.

C₆₈H₉₈N₁₂O₁₆ (1339.6) Ber. C 60.97 H 7.37 N 12.55 Gef. C 60.66 H 7.55 N 12.52

[182/71]