

Helmut Lackner

Synthesen von selektiv deuterierten Pentapeptidlactonen und stellungsspezifisch im (α)- oder (β)-Peptidring markierten Actinomycinen¹⁾

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 9. Juli 1971)

Für NMR-spektrometrische Konformationsanalysen wurden fünf unterschiedlich deuterierte Pentapeptidlactone (**9a–e**) und daraus vier selektiv nur im (α)- bzw. (β)-Peptidteil deuterierte Actinomycin C₁-säure-lacton-Paare (**12, 13**) sowie einige in *beiden* Peptid-Gruppen jeweils *gleich* markierte *iso*-Deutero-actinomycine (**15**) aufgebaut. Lactonisierung von **12, 13** gab acht stellungsspezifisch in (α) oder (β) markierte *aniso*-Deutero-actinomycine C₁ (**16, 17**). Über **15–17** gelang erstmals die (α , β)-stellungsspezifische Zuordnung der NMR-Signale von Actinomycin C₁(D) (**2**) und eng damit verwandten Actinomycinen wie z. B. C₂, i-C₂ und C₃²⁾.

Syntheses of Selectively Deuterated Pentapeptide Lactones and Actinomycines Specifically Labelled in the (α)- or (β)-Peptide Ring

For n.m.r. spectroscopic conformational analysis five diversely deuterated pentapeptide lactones (**9a–e**) and derived from them four pairs of actinomycine C₁-acid lactones (**12, 13**) selectively deuterated only in the (α)- or (β)-peptide chain, as well as some *iso*-deutero-actinomycines (**15**) *equally* labelled in *both* peptides were synthesized. Lactonization of **12, 13** yielded eight *aniso*-deutero-actinomycines C₁ (**16, 17**) specifically deuterated in (α) or (β). By use of **15–17** structure specific assignments of the n.m.r. signals from actinomycine C₁(D) (**2**) and closely related actinomycines (C₂, i-C₂, C₃²⁾ etc.) could be achieved.

Mit den beiden in (α)- oder (β)-Stellung am Actinocinylrest einseitig fixierten, rotationsbehinderten Peptidgruppen eignen sich Actinomycine (**2**) und deren Vorstufen – u. a. im Vergleich mit entsprechenden *freien* Peptiden – hervorragend zum Studium der Wechselwirkung eng benachbarter Peptidketten. Derartige Untersuchungen sind, ebenso wie die der *intermolekularen* Komplex- (z. B. mit DNS³⁾) oder Assoziatbildung von Actinomycinen, fest mit der Klärung von Konformations- bzw. Sekundär/Tertiärstrukturfragen verbunden und erfolgen in Lösung vorzugsweise, oft ausschließlich NMR-spektrometrisch. Dies setzt zunächst eine sichere, auch (α , β)-stellungsspezifische Zuordnung der NMR-Signale des jeweiligen Actinomycins oder Peptids voraus.

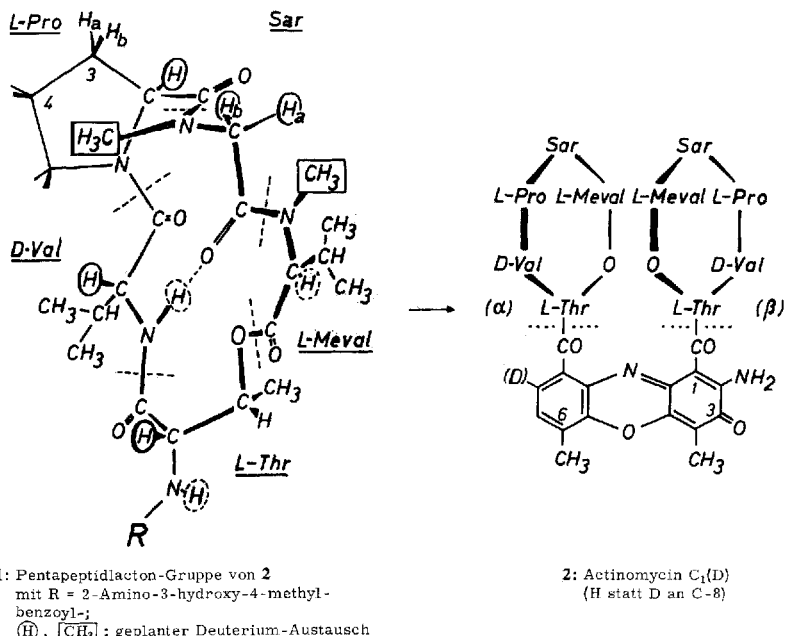
Die identischen Peptidlactonringe eines *iso*-Actinomycins wie C₁ (**2**) geben – vermutlich aufgrund der Chromophorasymmetrie, weniger konformativ bedingt⁴⁾ –

¹⁾ Auszugsweise vorgetragen auf dem „V. BGZ-Symposium über Naturstoffchemie“ vom 16.–18. 9. 1968 in Zürich (Schweiz).

²⁾ H. Brockmann, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe [Wien] **18**, 1 (1960).

³⁾ Vgl. z. B. W. Müller und D. M. Crothers, J. molecular Biol. **35**, 251 (1968).

⁴⁾ H. Lackner, Tetrahedron Letters [London] **1971**, 2221.



z. T. unterschiedliche NMR-Signale, deren δ -Werte nicht ohne weiteres mit der (α)- oder (β)-seitigen Stellung des betreffenden Protons korrelierbar sind. Um dieses sowie eine einwandfreie Bandenidentifizierung (vier N—CH₃-Gruppen!) zu erreichen und dann beide Peptidlactone über ihre Teilspektren *getrennt* beobachten zu können, schien der Einsatz gezielt in (α) oder (β) *deuterierter* Actinomycine besonders erfolgversprechend.

Für deren Darstellung entfiel der nicht stellungsspezifische Deuteriumaustausch an fertigen Actinocinylpeptiden oder Actinomycinen von vornherein. Vielmehr mußten aus deuterierten Aminosäuren markierte Peptidderivate synthetisiert und diese durch Kombination mit unmarkierten Bausteinen in die Deutero-actinomycine übergeführt werden.

Die selektive Deuterierung von Peptiden oder Proteinen wurde — neben der durch Titration⁵⁾, Substitution⁶⁾, Komplexbildung⁷⁾ u. dgl. erreichbaren Veränderung bestimmter Signale — bereits vereinzelt zur genaueren NMR-Spektren-Analyse herangezogen. So berichteten z.B. Nakamura und Jardetzky⁵⁾ von Messungen an Deutero-oligoglycinen und Meadows, Jardetzky, Epand, Rüterjans und Sheraga^{8a)} sowie Putter, Barreto, Markley und Jardetzky^{8b)} von Untersuchungen teilweise biosynthetisch deuterierter Nucleasen. Kopple, Ohnishi und Go⁹⁾ synthetisierten Dideuterglycin enthaltende Hexapeptide.

⁵⁾ A. Nakamura und O. Jardetzky, Proc. natl. Acad. Sci. USA **58**, 2212 (1967); Biochemistry **7**, 1226 (1968).

⁶⁾ A. M. Crestfield, W. H. Stein und S. Moore, J. biol. Chemistry **238**, 2413 (1963).

⁷⁾ M. K. Kim und A. E. Martell, J. Amer. chem. Soc. **91**, 872 (1969).

^{8a)} D. H. Meadows, O. Jardetzky, R. M. Epand, H. H. Rüterjan und H. Sheraga, Proc. natl. Acad. Sci. USA **60**, 766 (1968).

^{8b)} I. Putter, A. Barreto, J. L. Markley und O. Jardetzky, Proc. natl. Acad. Sci. USA **64**, 1396 (1969).

⁹⁾ K. D. Kopple, M. Ohnishi und A. Go, Biochemistry **8**, 4087 (1969).

Deuteroamino-säuren sind durch Austausch oder Synthese auf üblichem Wege (vgl. unten) meist gut zugänglich. Partiiell *N*-methyldeuteriertes Sarkosin benutzten *Cohn, Simmonds, Chandler* und *duVigneaud*¹⁰⁾ für Stoffwechseluntersuchungen.

Der Aufbau gezielt markierter *aniso*-Actinomycine erforderte allerdings außer der selektiven Deuterierung von Peptidlactongruppen noch deren (α,β)-stellungsspezifische Verknüpfung mit dem Actinocinylrest (2).

Deuterierte Pentapeptidlactone

Die hier als Beispiel gewählte Synthese einiger Deutero-pentapeptidlactone mit der in Actinomycin C₁ (2) aufgefundenen Aminosäuresequenz²⁾ (9a–e; Formelschema 1) verlief im Prinzip wie die der unmarkierten Verbindungen¹¹⁾. Ausgetauscht wurden zunächst die NMR-spektrometrisch besonders interessierenden Protonen an C-2 aller fünf Aminosäuren und die im *N*-Methyl von Sarkosin und Methylvalin (1). Eine ebenso mögliche Deuterierung der Isopropyl- und Trimethylseitenketten von Valin, Methylvalin und Prolin stellten wir, da dem NMR-spektrometrischen Nutzen (vgl. 3. Abschnitt) ein zu hoher Syntheseaufwand gegenüberstand, in diesem Zusammenhang zurück.

Ausgangssubstanz für Actinomycinpeptide mit D-Val als Aminosäure [2] (z. B. 9a) ist Formyl-D-valin (Formelschema 1; 4a), das nun, ebenso wie der Prolylrest zur Darstellung von 9b, an C-2 deuteriert werden mußte.

Hierzu wurde DL-Valin durch Kochen mit Acetanhydrid/Deuteriumoxid unter Racemisierungsbedingungen¹²⁾ in zu 86% markiertes¹³⁾ 2-Deutero-DL-valin (3a) übergeführt, dies wie üblich formyliert und das Formyl-2-deutero-DL-valin nach *E. Fischer*¹⁴⁾ mit Brucin in 4a und dessen Enantiomerer gespalten.

2-H von DL-Prolin ließ sich analog austauschen, das 2-Deutero-DL-prolin (3c, 83% 2-D) wurde jedoch sogleich mit benzylalkohol. Salzsäure zu 3d verestert. Durch Verzicht auf die Antipodentrennung entstanden die auf 3d basierenden Peptide 5c–8d zwar stets als Diastereomeren-Paare, nach den Erfahrungen bei Actinomycinsäure-Cyclisierungen¹⁵⁾ hofften wir aber, daß auch hier in der Lactonisierungsstufe 8d $\rightarrow$ 9b die „falsche“ Komponente infolge Versagens der Ringschlußreaktion abgetrennt werden würde.

Formyl-2-deutero-D-valin (4a) gab mit L-Prolin-benzylester und Dicyclohexylcarbodiimid den Formyl-dipeptidester 5a, der laut NMR-Spektrum (Tab., Sp. 2) zu 85%¹³⁾ an C-2 (Val) deuteriert war. Das zusätzlich im Prolinrest (82% 2-D) markierte 5c entstand auf gleiche Weise aus 4a und 3d.

Zum Aufbau der Formyl-tripeptidester 6a, c, i wurden die 5a, c-Hydrierungsprodukte 5b, d sowie unmarkiertes Formyl-D-valyl-L-prolin¹⁵⁾ mit Sarkosin- bzw. *N*-Tri-deuteromethyl-glycin-benzylester (4j) und Dicyclohexylcarbodiimid nach Formel-

¹⁰⁾ *M. Cohn, S. Simmonds, J. P. Chandler und V. duVigneaud, J. biol. Chemistry* **162**, 343 (1946).

¹¹⁾ *H. Brockmann und H. Lackner, Chem. Ber.* **101**, 2231 (1968).

¹²⁾ *M. Bergmann und L. Zervas, Biochem. Z.* **203**, 280 (1928).

¹³⁾ Der Deuteriumgehalt ($\pm 2-3\%$ absol.) wurde auch in den folgenden Stufen stets NMR-spektrometrisch kontrolliert; massenspektrometrische Bestimmungen waren bei länger-kettigen Verbindungen infolge zu geringer Molekülstabilität aufwendig und unsicherer.

¹⁴⁾ *E. Fischer, Ber. dtsch. chem. Ges.* **39**, 2320 (1906).

¹⁵⁾ *H. Brockmann und H. Lackner, Chem. Ber.* **101**, 1312 (1968).

schema 1 umgesetzt. In den NMR-Spektren von **6a, c, i** (Tab., Sp. 3) fehlten die Signale der ausgetauschten Protonen entweder völlig [$\text{N}-\text{CH}_3$ (Sar)] oder zu 80 bis 85 % [2-H (Val, Pro)].

Das benötigte **4j**-Hydrochlorid erhielten wir nach Fischer und Bergmann¹⁶⁾ durch Methylierung von Tosylglycin mit Trideuteromethyljodid/Alkali zu **3i**, dessen Spaltung mittels konz. Salzsäure sowie Veresterung des rohen **4i**-Hydrochlorids mit Benzylalkohol/Benzolsulfonsäure¹⁷⁾. Es war vollständig im *N*-Methyl deuteriert (NMR s. Versuchsteil) und, da sich Tosylglycinderivate bei der **3i**-Kristallisation abgetrennt hatten, frei von Glycinderivaten.

Auch vorgefertigte Peptide konnten ohne Verlust *N*-terminaler Formylgruppen an C-2 der carboxylendständigen Aminosäure deuteriert werden. So gab unmarkiertes Formyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin¹⁵⁾ bei 1stdg. Erwärmen auf 35° in Deuteroessigsäure/Acetanhydrid unter NMR-spektrometrischer Kontrolle [2-H₂(Sar)-Signal] in 80proz. Ausbeute acetylfreies **6g** (Deuterierungsgrad: 0.80).

Die durch Hydrieren von **6a, c, i** gewonnenen krist. Formyl-tripeptide **6b, d, j** sowie **6g** wurden weiter mit *N*-Trideuteromethyl-L-valin- (**3h**), *N*-Methyl-2-deutero-DL-valin- (**4h**) oder *N*-Methyl-L-valin-methylester nach Formelschema 1 zu den *Formyl-tetrapeptidestern* **7a, c, i** sowie **7g** verknüpft (Dicyclohexylcarbodiimid). NMR-Spektren (Tab., Sp. 4) bestätigten deren Markierungen; der 2-H-Bandenkomplex bei δ 4.6 – 5.0 ließ sich einwandfrei auflösen und integrieren.

Der Aufbau von **3h** über **3g** aus Tosyl-L-valin erfolgte analog dem von **4j**; das rohe *N*-Trideuteromethyl-L-valin gab nach Verestern mit methanol. Salzsäure vollständig *N*-methyl-deuteriertes, valinesterfreies **3h**-Hydrochlorid. — **4h** entstand aus *N*-Methyl-DL-valin durch 85proz. Austausch von 2-H (Acetanhydrid/Deuteriumoxid) und Veresterung des **4g**-Hydrochlorids mit methanol. Salzsäure. Eine Enantiomerentrennung erübrigte sich hier, da bei der späteren Lactonisierung **8j** $\rightarrow$ **9e** ohnehin eine weitgehende Racemisierung von Aminosäure [5]¹⁵⁾ und damit Verluste an C-2-Markierung zu erwarten waren.

Die Entformylierung von **7a, c, g, i** gelang wie üblich mit 1.5 *n* methanol. Salzsäure bei 20°. Die Tetrapeptid-methylester **7b, d, h, j** wurden dann mit *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-L-threonin¹⁸⁾ und Woodward's Reagens¹⁹⁾ zu den geschützten *Pentapeptidestern* **8a, c, g, i** verknüpft.

8e schien schwieriger zugänglich, da L-Threonin unter den üblichen C-2-Deuterierungsbedingungen sehr instabil ist und vom zugleich entstehenden D-*allo*-Threonin getrennt werden muß. Versuche mit D₂O/Kaliumhydroxid ergaben zwar einen 65proz. 2-H-Austausch (25 % D-*allo*-Produkt), jedoch unter beträchtlichem Substanzverlust. Ähnlich einem milden, bereits für das stabilere Serin²⁰⁾ benutzten Racemisierungsverfahren²¹⁾ haben wir dann L-Threonin in D₂O und Pyridin bei 20° vorsichtig mit kleinen Acetanhydridmengen behandelt und nach Verseifen mit 2 *n* HCl so bei fast 50% Ausbeute eine 80 $\pm$ 2proz. C-2-Deuterierung (NMR-Daten im Versuchsteil) erzielt. Das Reaktionsprodukt **3e** enthielt laut NMR-Integral und Drehwert [$-22.0 \pm 0.3^\circ$;

¹⁶⁾ E. Fischer und M. Bergmann, Liebigs Ann. Chem. **398**, 96 (1913).

¹⁷⁾ F. Cramer und A. Vollmer, Chem. Ber. **92**, 392 (1959).

¹⁸⁾ H. Lackner, Chem. Ber. **103**, 2476 (1970).

¹⁹⁾ R. B. Woodward, R. A. Olofson und H. Mayer, J. Amer. chem. Soc. **83**, 1010 (1961).

²⁰⁾ J. P. Greenstein und M. Winitz, Chemistry of the Amino Acids, S. 2234 und 2238, John Wiley & Sons, Inc., New York, London 1961.

²¹⁾ V. du Vigneaud und C. E. Meyer, J. biol. Chemistry **98**, 295 (1932).

L- bzw. D-*a*-Thr: $-28.4/-10.0^\circ$ ($c = 1-2$ in Wasser)²⁰⁾] $35 \pm 2\%$ 2-Deutero-D-*allo*-threonin ($90-95\%$ 2-D); der L-Threonin-Anteil war demnach zu $72 \pm 3\%$ an C-2 deuteriert²²⁾.

Das 3e-Gemisch wurde wie üblich mit dem Chlorid der 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoesäure gekuppelt; die erhaltenen Epimeren ließen sich wider Erwarten durch zweimalige fraktionierte Kristallisation weitgehend trennen. Die 1. Fraktion [41 %, $[\alpha]_D^{20}$: $-42.7 \pm 0.2^\circ$ ($c = 1.2$ in Methanol)]; unmarkiertes 4e: -44.0°] war auch nach den NMR-Spektren (Versuchsteil) und Schmp. fast reines 4e, die 2. Fraktion [20 %, -37.0°] zu ca. 88 % 4e und Fraktion 3 [39 %, $+2.8^\circ$] etwa 80proz. D-*allo*-Threonin-Produkt (NMR), das demnach in reiner Form $+15-20^\circ$ (Methanol) drehen sollte. Die Deuterierungsgrade lagen um 0.70, 0.75 und 0.90 (NMR).

4e und D-Valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-methylester¹¹⁾ gaben mit Woodwards Reagens zu 60 % 8e. — Die zunehmend komplizierteren NMR-Spektren von 8a, c, e, g, i (Tab., Sp. 5) waren auch im 2-H-Bereich von δ 4.4–5.1, u. a. durch die unterschiedlichen Markierungen, noch sicher zuzuordnen und mit den Strukturen im Einklang. Diastereomerenpaare (8c, i) zeigten einige eng benachbarte, quantitativ aber schlecht auszuwertende Doppelbanden.

Obleich die Synthesen von 8c und i nur im Hinblick auf das jeweils „richtige“ Diastereomere geführt wurden, interessierte zur Beurteilung der nachfolgenden Lactonisierungsreaktion auch die Isomerenverteilung. Für 7i, j und 8i ergab sie sich mit 1:1 aus den Drehwerten (gef. $-16, -79, -12^\circ$), denn die der Einzelkomponenten waren bekannt^{11,15)} oder ableitbar²³⁾ (ber. für 1:1-Gemische: $-17, -82, -14^\circ$). Gleiches galt für 5c, d und 6c, d; zu 7c, d, 8c lagen ebenfalls Vergleichssubstanzen^{11,15,24)} vor, deren Drehungen zusätzlich Inkremente ($\pm 119, \pm 140, \pm 82^\circ$) für die L $\rightarrow$ D-Prolin-Umkehr in solchen Tetra- und Pentapeptidestern lieferten, so daß auch Drehwerte von noch unbekannten Komponenten abgeschätzt werden konnten (ber. für 1:1-Gemische in 7c, d, 8c: $-32, -83, -13^\circ$; gef. $-43, -90, -25^\circ$). Hier hatten sich die „richtigen“ Diastereomeren ($-91, -153, -54^\circ$ ¹¹⁾) offenbar leicht angereichert.

Bei der milden Verseifung von 8a, c, g, i mit 0.5 *n* wäßrig-methanol. Alkali (40°)¹⁸⁾ zu 8b, d, h, j verlor 8g unerwartet etwa die Hälfte der 2-D₂(Sar)-Markierung. Dies ließ sich durch Hydrolyse in D₂O/Deuteromethanol vermeiden, stattdessen tauschten nun aber 2-H(Thr) und — für eine C-terminale Aminosäure verständlich — 2-H(MeVal) zu ca. 30–50 % aus²⁵⁾. 8e verseiften wir daraufhin gleich in deuterierter Phase zu 8f, der partielle Austausch an C-2(Sar bzw. MeVal) störte nicht. — Da 8b, d, f, h, j als Säuren schwieriger auswertbare NMR-Spektren geben, wurden die Deuterierungen an remethylierten (Methanol, ätherisches Diazomethan) und lactonisierten Proben (vgl. unten) kontrolliert.

Daß mit der partiellen C-2-Deuterierung auch eine nennenswerte Racemisierung des Threonins erfolgte, war — anders als beim endständigen Methylvalin — unwahrscheinlich;

²²⁾ Vor allem nach kürzeren Reaktionszeiten lag stets mehr deuteriertes L- als D-*allo*-Threonin vor; offenbar verläuft der Austausch teilweise unter Retention.

²³⁾ Zahlreiche Werte lagen für entsprechende Benzylester vor¹⁵⁾. Deren molare Drehung gleich in typischen Beispielen der von Methylestern¹¹⁾. — 7d, j: Drehwerte der Hydrochloride.

²⁴⁾ H. Brockmann und H. Lackner, Chem. Ber. **100**, 353 (1967).

²⁵⁾ Auch 8i hatte bei der normalen Verseifung natürlich Deuterium verloren.

nach Rückmethylierung fanden sich keine auf D-*allo*-Threonyl deutende NMR-Signale²⁶⁾. **8b, f, h** ($[\alpha]_D^{20}$: -35 , -31 , -29°) konnten den Drehwerten von **8j** (-12° ; mit DL-MeVal) und über tert.-Butylester²⁷⁾ hergestelltem **11b** (-56° ; L-MeVal) zufolge etwa 25% D-MeVal-Isomeres enthalten.

Die Lactonisierung von **8b, d, f, h, j** zu **9a–e** erfolgte wie üblich¹¹⁾ mit Acetylchlorid/Acetylimidazol²⁸⁾ in Tetrahydrofuran (55°), für **8f, h, j** jedoch bei verkürzter Reaktionszeit. **8h** verlor nämlich unter diesen Bedingungen wiederum bis auf ca. 20% die Sarkosin-Markierung; die Markierung an C-2 (Thr) — aus der Hydrolyse — war ebenso wie das 2-D(Thr) in **8f** stabil. Der Verlust des C-2(MeVal)-Deuteriums von **8j** und (den Verseifungen entstammend) **8h** und **f** überraschte nicht, da Aminosäure [5] auch bei Actinomycinsäure(14)-Cyclisierungen¹⁵⁾ vollständig racemisiert wird.

Die weitgehende Stereospezifität der Ringschlußreaktion (vgl. l. c.¹⁵⁾) bestätigte sich hier: Das ($\sim 1:1$)-Diastereomergemisch **8d** lieferte nach Trennung der Reaktionsprodukte an Kieselgelplatten in 50% der üblichen Ausbeute (25–30%) NMR-spektrometrisch einheitliches **9b** mit $[\alpha]_D^{20}$: $-13.9 \pm 0.5^\circ$ [authent. **11d**: $-14.0 \pm 0.5^\circ$, beide $c = 2.0$ in Methanol]; für ein Lacton mit D-Prolyl fand sich kein Hinweis. Ebenso gab eine noch 25% D-*allo*-Threonyl-Isomeres enthaltende **8f**-Probe bei 20proz. Ausb. einheitliches, richtig drehendes **9c**. Daß auch das **8j**-Gemisch nur vom L-MeVal-Isomeren aus zu gleichfalls reinem **9e** cyclisierte, war nach den Erfahrungen mit Actinomycinsäuren²⁹⁾ zu erwarten. In allen Fällen hätten nennenswerte Diastereomeren-Beimengungen sicher zusätzliche NMR-Signale (Abbild. 1) und größere Drehwertänderungen verursacht.

Alle fünf *Pentapeptidlactone* entsprachen in ihren NMR-Spektren (Abbild. 1; Tab., Sp. 6), Drehwerten, Analysenzahlen, Schmp. und dem chem. Verhalten den Strukturen **9a–e**. An **9b, c, e** zeigte sich, daß man etwa zugunsten der rascheren Synthese einer Deuteroverbindung durchaus konfiguratív uneinheitliche Bausteine (auch vom Valin¹⁵⁾) benutzen und die Diastereomeren-Abtrennung der späteren Lactonisierungsreaktion überlassen kann. Isomere mit der natürlichen Konfigurationssequenz LDL-L cyclisieren dabei — offenbar infolge besonders günstiger Konformation — stets bevorzugt oder gar selektiv.

Markierungen an C-2(MeVal) sind, obgleich unter Cyclisierungsbedingungen nicht haltbar, für die Analyse von Spektren linearer Peptidgruppen (z. B. in **12, 13**) wichtig. Die ca. 20proz. C-2(Sar)-Deuterierung in **9d** genügt in der Regel für Untersuchungen an Cyclopeptiden. Ein gleichzeitiger Austausch an CH₂- und NCH₃(Sar) ist ungünstig, da sich z. B. NCH₃- und 2-H₂(Sar)-Signale (s. Formel 1) von interessanten assoziierten Peptidlactonen³⁰⁾ überlagern. Die der 8g-Verseifung entstammende Deuterierung an C-2(Thr) in **9d** reicht für manche Zwecke [u. a. zur Identifizierung des NH(Thr)-Signals] bereits aus. Aminosäure [1] läßt sich aber bei dem kurzen Syntheseweg zu **9c** ohnehin rasch markieren.

²⁶⁾ Sogar die Verseifung von unmarkiertem **4e**-Methylester verlief praktisch ohne Racemisierung.

²⁷⁾ J. Meienhofer, J. org. Chemistry **32**, 1143 (1967).

²⁸⁾ H. Brockmann und J. H. Manegold, Chem. Ber. **100**, 3814 (1967).

²⁹⁾ Diese geben, ob sie nun L-, DL- oder D-Methylvalin enthalten, stets in gleicher Ausbeute und optischer Reinheit nur das Actinomycin mit der natürlichen Konfigurationssequenz¹⁵⁾. Für viele über die Lactonisierungsstufe laufende Synthesen setzen wir daher in Position [5] DL-Aminosäuren ein.

³⁰⁾ H. Lackner, Tetrahedron Letters [London] **1970**, 3189.

Mit **9a–e** standen uns nun sowohl Vergleichssubstanzen für NMR-Untersuchungen an freien und assoziierten Peptidlactonen³⁰⁾ als auch eine Reihe selektiv deuterierter Bausteine zur (α,β)-stellungsspezifischen Synthese von markierten Actinocinylpeptiden und Actinomycinen zur Verfügung.

(α,β)-Stellungsspezifisch deutierte Actinocinylpeptide und Actinomycine

Von den Peptidlactonen **9a–e** bzw. deren Hydrierungsprodukten **10a–e** (Formelschema 2) gelangt man zu selektiv im (α)- oder (β)-Peptidring markierten Actinomycinen (**16**, **17**), wie für synth. *aniso*-Actinomycine allgemein schon erörtert¹⁸⁾, am besten über Actinomycinsäure-monolactone (**12**, **13**). Oxydative Selbstkondensation von **10a–e** gibt in α und β gleich markierte *iso*-Actinomycine (z. B. **10e** $\rightarrow$ **15e**), die zur Lösung mancher Probleme ausreichen. Direkte Mischkondensation mit bereits lactonisierten, unmarkierten Partnern (**11c**) dagegen führt zu einem Gemisch der zwar verschieden deuterierten, jedoch untrennbaren Actinomycine **15–18**.

Die Synthese von **16a**, **17a** beginnt mit der gemeinsamen Hydrierung von **9a** und **11b**¹¹⁾ (oder dessen Benzylester¹⁵⁾) zum **10a/11a**-Gemisch, das in Methanol/0.07 *m* Phosphatpuffer pH 7.2 mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxydiert wird. Dabei entstehen vier an Cellulosepulver gut trennbare Kondensationsprodukte: im (α)- und (β)-Peptid gleich deuteriertes *Pentadecadeutero-actinomycin* C₁ (**15a**) (in den nicht deuterium-spezifischen Eigenschaften mit **18** identisch; NMR: Abbild. 2, C), unmarkierte Actinomycin C₁-säure (**14a**)¹⁵⁾ sowie zwei stellungsisomere *Octa(bzw. Hepta)-deutero-actinomycin* C₁-säure-lactone (**12a**, **13a**).

Für eine sichere Identifizierung dieser Isomeren war der markierte Kondensationspartner **10a** zugleich auch an C-6 des Aminophenolteils deuteriert worden (vgl. Stufe **7b** $\rightarrow$ **8a** u.¹⁸⁾), so daß — falls er die α -Seite der Lactonsäure bildet (**12a**) — das Deuterium (nun als 8-D) erhalten bleibt. Wird **10a** zur β -Hälfte, so geht 6-D verloren (**13a**). NMR-Spektren zeigten, daß das an Cellulose langsamer wandernde Isomere in 8 deuteriert (7-H: s δ 7.34, vgl. auch Abbild. 2) und somit **12a** war.

12a und **13a** stimmten in *R_F*-Werten (Papierchromatogramm), Drehungen, Schmp., Analysenzahlen (von D statt H abgesehen) und chemischen Eigenschaften mit den unmarkierten Verbindungen¹⁸⁾ überein, waren aber untereinander vor allem im Drehwert und in den NMR-Spektren verschieden.

Über die **12a,13a**-Spektren können nun z. B. die NCH₃-Signale der undeuterierten Lactonsäuren **12f**, **13f** einwandfrei dem cyclischen oder linearen Peptidteil zugeordnet werden. Dabei fällt auf, daß sich die δ -Werte von NCH₃(Sar, MeVal) beim Übergang des freien Cyclopeptids **11d** (3.37, 3.21; **9** in der Tab.) in **12f** (3.40, 3.25) kaum verändern, während sie bei **13f** (2.89/2.87, Nebenbanden 2.94, 2.80) schon denen des späteren Actinomycins (**18**) (2.86, 2.93/2.90; Tab.) gleichen. Die NCH₃-Signale des linearen **11b** (3.13, 2.91) sind in **12f** (3.15, 3.06–2.84) und **13f** (3.15, 3.03, 2.87) wenig verschoben, jedoch bei **12f** in zahlreiche Linien aufgefächert³¹⁾. Dies deutet auf eine

³¹⁾ Eine sichere Identifizierung sämtlicher **12f,13f**-NCH₃-Signale (ca. 20) erfordert außer **12a,13a** [Unterscheidung Cyclo-/Linearpeptid] noch die *beidseitig* — **12b,13b** reichen nicht aus — in Sar oder MeVal markierten Lactonsäuren [Sar/MeVal-Zuordnung] sowie zum Erkennen von Fremdsignalen [etwa von 2-H(Sar)] ein in *allen* NCH₃-Gruppen deuteriertes Isomerenpaar (Synthesen z. B. durch Kombination **9b/8d** bzw. **9a/8b**).

uneinheitliche Konformation der (β)-Ketten [mangelnde Stabilisierung infolge ungünstiger Einstellung zu den (α)-Ringen] und stünde im Einklang mit der bei Actinomycinsäure-(α)-lactonen um 8–12% niedrigeren Cyclisierungsausbeute (vgl. unten und l. c.¹⁸⁾). In **13f**, das auch im Gesamtspektrum (und der Drehung) dem Actinomycin ähnlicher ist, sollten die (β)-Peptidringe dagegen auf derselben Seite wie im Actinomycin⁴⁾ durch die (α)-Ketten abgeschirmt und diese wiederum durch die benachbarten Cyclopeptide in wenigen ³²⁾ *Vorzugskonformationen* stabilisiert sein, von denen zumindest *eine* die Lactonbildung begünstigt (Ausb. bis 65%). — Ursache für die **12,13**-Unterschiede ist die Unsymmetrie des Chromophors (vgl. auch $\lambda_{\max}$ **12f**: 445, 427 nm; **13f**: 449, 434 nm¹⁸⁾).

Die Lactonisierung der in **12a** und **13a** noch offenen Peptidketten mit Acetylchlorid/Acetylimidazol in Tetrahydrofuran^{18, 28)} führte mit 52 bzw. 60% Ausb. zu den stellungsspezifisch markierten, krist. *Octa(bzw. Hepta)deutero-actinomycinen 16a* und **17a**. Beide zeigten alle Eigenschaften von Actinomycin C₁, wobei in den NMR-Spektren die Signale der jeweils in α oder β ausgetauschten Protonen fehlten (Abbild. 2). **16a** war wie zu erwarten an C-8 deuteriert und somit in α markiert.

Da sich auch die bei der Mischkondensation entstandene Actinomycin C₁-säure (**14a**) zu 25–30% cyclisieren läßt¹⁵⁾, sind über den Lactonsäureumweg nun alle vier unterschiedlich markierten Actinomycine (**15–18**) getrennt zugänglich.

Um unter Ausnutzung des kostbaren Deutero-cyclopeptids etwa gleiche Mengen **15a**, **16a**, **17a** und **18** zu erhalten, wurden **10a/11a** im *Molverhältnis 1 : 2* oxydiert. Nimmt man für die Bildung der vier Kondensationsprodukte gleiche Wahrscheinlichkeiten an, dann führt allgemein der Einsatz von m Mol A und n Mol B zu $1/2[m^2/m+n]$ Mol AA, je $1/2[m \cdot n/m+n]$ AB und BA sowie $1/2[n^2/m+n]$ BB. Im **10a/11a**-Beispiel ($m = 1$, $n = 2$) bedeutet das eine **15a, 12a, 13a, 14a**-Verteilung von 1 : 2 : 2 : 4 und somit bei normalen Cyclisierungsausbeuten (**12a, 13a**: 50–60%, **14a**: 25–30%) etwa gleiche Mengen der 4 Actinomycine. Bei $m : n \ll 1$ geht fast alles Cyclopeptid in Lactonsäuren und damit weitgehend in die *aniso*-Deutero-actinomycine **16, 17** über. 8 Mischkondensationen wie die von **10a/11a** bestätigten etwa die berechnete Produktverteilung (Mittelwerte): $m : n = 1 : 2.8$; Ausb. gef. 1 : 2.9 : 2.3 : 8.3, ber. 1 : 2.8 : 2.8 : 7.8. Der Anteil (2.3) der in β lactonisierten Isomeren **13** war merkwürdigerweise stets etwas kleiner als der von **12**³³⁾.

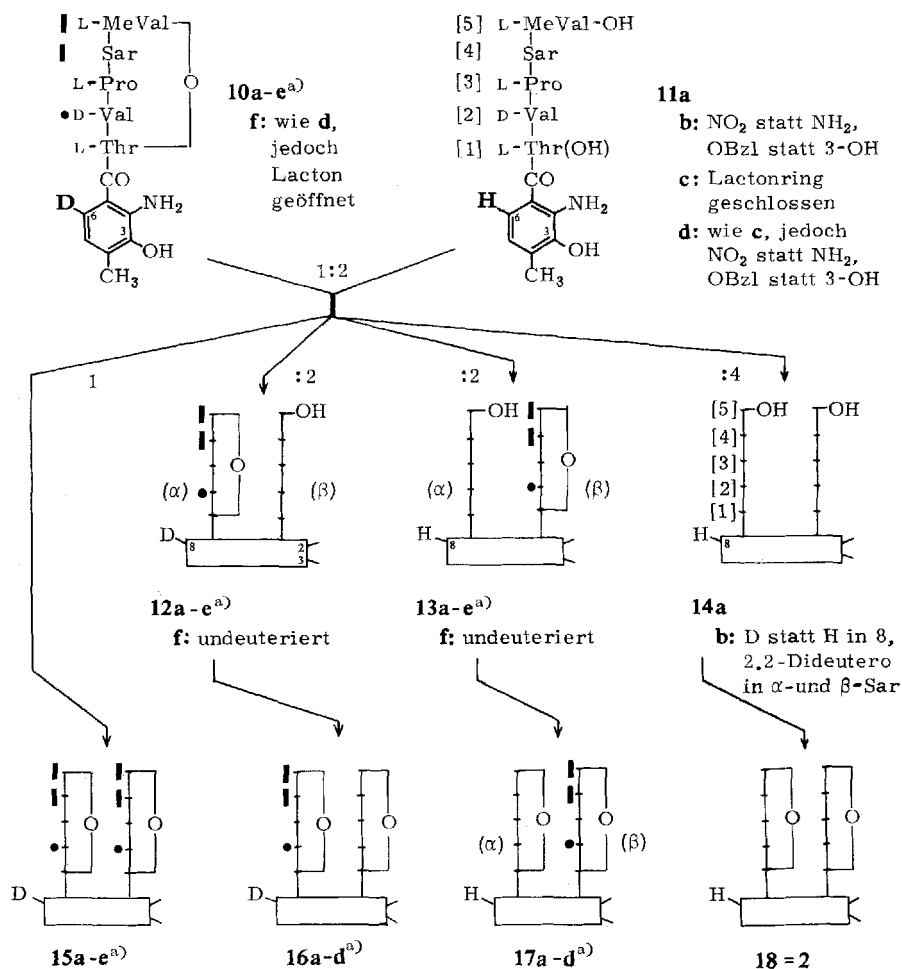
Durch gemeinsame Hydrierung von **9b** bzw. **9c** und **11b** sowie Kondensation der **10b, c/11a**-Gemische entstanden wie oben die *iso*-Deutero-actinomycine **15b, c**, Actinomycin C₁-säure (**14a**) sowie die Lactonsäure-Paare **12b, 13b** und **12c, 13c**. Deren Cyclisierung gab wiederum die NMR-spektrometrisch sicher identifizierbaren, wie geplant in α oder β markierten *aniso*-Deutero-actinomycine **16b, 17b** und **16c, 17c**.

Zur Darstellung der C-2(Sar)-dideuterierten Actinomycine **15–17d** war der übliche Weg von **9d** über **10d/11a** und **12d, 13d** ungünstig, vielmehr gingen wir, um das labile Sarkosyl-Deuterium nur *einmal* der Cyclisierungsreaktion auszusetzen, bereits von **8h** aus. Dies wurde zusammen mit dem schon vorcyclisierten **11d**¹¹⁾ zum **10f/11c**-Gemisch hydriert, dessen oxydative Kondensation nun zu Actinomycin C₁ (**18**), der *iso*-Deutero-

³²⁾ Zwei wären naheliegend, da die α -Kette nur drei wesentliche NCH₃-Signale ($\sim 2 : 1 : 1$) gibt, von denen das große wahrscheinlich dem Sarkosin entstammt³¹⁾.

³³⁾ Wieweit die unterschiedlichen Peptidketten hier eine Steuerung der Kondensation bewirken, müßte genauer geprüft werden.

Formelschema 2. Deuterierte Actinomycine



a) 10,12,13,15-17a: 2-Deutero (●) in Val [2], *N*-Trideuteromethyl (■) in Sar [4] und MeVal [5].  = Actinocinyl (vgl. 2).

b: 2-Deutero in Val [2] und Pro [3], *N*-Trideuteromethyl in MeVal [5].

c: 2-Deutero in Thr [1].

d: 2,2-Dideutero in Sar [4].

10,15e: *N*-Trideuteromethyl in Sar [4].

12,13e: wie 12,13d, jedoch Lactonring in β statt α bzw. in α statt β.

α- und β-Anordnung aller Markierungen: wie für 12,13,15-17a skizziert.

actinomycin C₁-säure **14b** ($\rightarrow$ **15d**) sowie den Lactonsäuren **12e** (jetzt in β lactonisiert) und **13e** führte. **12e, 13e** cyclisierten – wie vorn **8h** in verkürzter Zeit – zu den selektiv in α bzw. β deuterierten Actinomycinen **16d** und **17d**. Das aus der **8g**-Hydrolyse stammende C-2(Thr)-Deuterium blieb dabei erhalten. – Für spezielle Messungen benötigtes **15e** entstand durch einfaches Kondensieren von **10e**.

Mit den vier unterschiedlich und α, β -stellungsspezifisch markierten *aniso*-Deuteroactinomycin-Paaren **16a–d**, **17a–d** sowie den *iso*-Deuteroactinomycinen **15a–e** hatten wir nun zahlreiche Modellsubstanzen zur Hand, mit denen sich das nächstliegende Problem, die möglichst weitgehende, stellungsspezifische Zuordnung eines Actinomycin-NMR-Spektrums, einfach und sicher lösen ließ.

NMR-Spektren von Actinomycin C₁ und dessen Peptidvorstufen

Zum NMR-spektroskopischen Vergleich von Actinomycinen (**18**) oder Peptidlactonen (**11d**) mit linearen Peptiden eignen sich am besten deren *N*-terminal geschützte Ester (Tab., Sp. 2–5). Daß diese wie auch **11d** und **18** in Chloroform und sogar Benzol gut löslich sind, erleichtert – in Anbetracht der sonst für Peptide oft nötigen stark polaren Solventien – Konformationsanalysen und Assoziatuntersuchungen erheblich³⁴⁾.

Gemessen wurden sowohl trockene als auch mit wenig D₂O geschüttelte Peptidesterlösungen (Deuteriochloroform), wobei letztere unter vereinzelt, geringfügigen δ -Wert-Änderungen – ähnlich, aber in kleinerem Maße wie **11d**³⁰⁾ und **18**⁴⁾ – leicht verschärfte und genauer reproduzierbare Spektren gaben. Die ebenfalls chloroformlöslichen Tetrapeptidester (z. B. **7b**)-hydrochloride oder Peptidsäuren (**6g**, **8b** etc.) zeigten u. a. ihrer polaren Gruppen wegen teilweise etwas kompliziertere, jedoch noch gut zu analysierende Spektren.

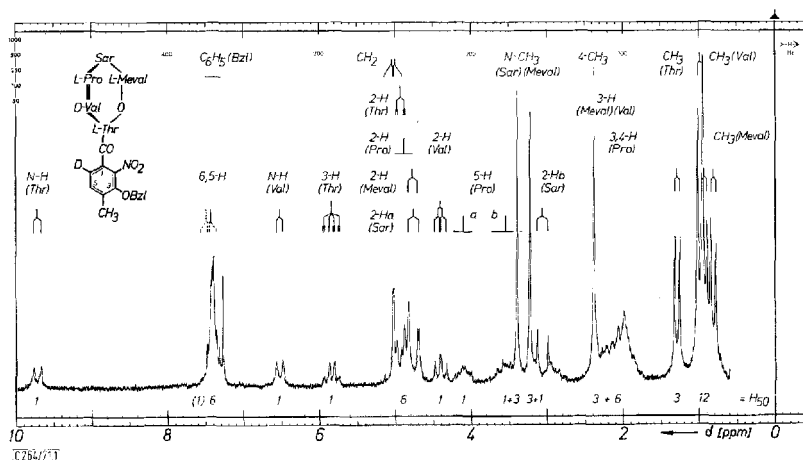
Die trotz scheinbar vieler Konformationsmöglichkeiten recht scharfen Spektren der Di- bis Pentapeptidester (Tab., Sp. 2–5) lassen sich, u. a. durch Doppel- und Tripelresonanzmessungen sowie mit Hilfe der Deuteriummarkierungen (NCH₃-, 2-H- und NH-Bereich), weitgehend und sicher zuordnen. Sowohl die Lage der Signale als auch die Kopplungskonstanten [$J_{\text{NH,CH}}(\text{Val})$ z. B.] ändern sich mit zunehmender Peptidkettenlänge bemerkenswert wenig. Selbst so charakteristische³⁵⁾ δ -Werte wie die von 2-H_a und 2-H_b(Sar) bleiben bis zum Pentapeptid hin erhalten, wobei δH_a offenbar infolge „deshielding“ von H_a seitens des Prolincarbonyls (vgl. **1**) sehr hoch liegt; beides würde eine über die Kettenverlängerung hinweg stets synperiplanare Einstellung der C-2/H_a(Sar)- und N(Sar)/C-1(Pro)-Bindungen bedeuten. Es scheint, daß die kürzeren Peptide (Tripeptide wie **6a, i** liegen in Chloroform laut osmotrischer Mol.-Gew.-Bestimmung monomer vor) bereits eine Vorzugskonformation einnehmen, die beim Übergang in die Pentapeptide und weiter zu den konformativ wohl ebenfalls weitgehend einheitlichen Cyclopeptiden³⁰⁾ und Actinomycinen⁴⁾ im wesentlichen gewahrt bleibt. Ob die in den Spektren längerer Linearpeptide auftretenden *Nebenbanden*, wie die beim Cyclopeptid **11d** von Assoziaten oder z. B. von Konformeren

³⁴⁾ Mit denselben Lösungen und bei gleicher Temperatur können z. B. NMR-, IR-Messungen und osmotrische Mol.-Gew.-Analysen erfolgen.

³⁵⁾ In CHO-D-Val-Sar-L-Pro-OBzl z. B. geben 2-H_{a,b}(Sar) ein Singulett bei δ 4.15 (der Übergang Ester- $\rightarrow$ Peptidbindung beeinflusst δ 2-H_{a,b} nur wenig; vgl. Tab.) – Für CHO-D-Val-L-Pro-Sar-OH (**6g**) liegt 2-H₂(Sar) bei δ 4.07 (verbreitertes Singulett).

oder vielleicht auch beigemengten Diastereomeren herrühren, wird noch entschieden und an anderer Stelle zusammen mit eingehenderen Konformationsuntersuchungen diskutiert werden.

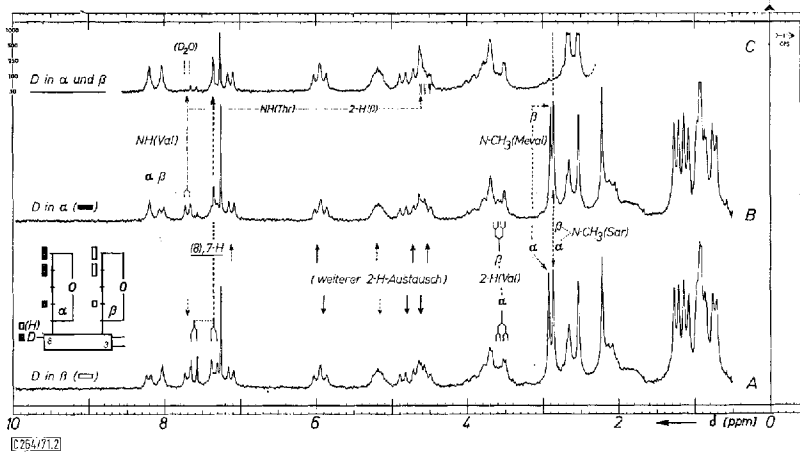
Das charakteristische Spektrum des *Pentapeptidlactons* **11d** (Tab., Sp. 6; vgl. auch Abbild. 1) ließ sich überwiegend durch Mehrfachresonanz analysieren; über **9b** (oder **9e**) wurden die N-CH₃-Banden (δ 3.37, 3.21) zugeordnet. **9b** bestätigte auch die δ -Werte von 2-H(Val,Pro) ebenso wie **9d** die von 2-H₂(Sar) und NH(Thr). Eine Analyse der von Abbild. 1 ziemlich verschiedenen **11d**-Spektren in Benzol [NCH₃(Sar,MeVal)-Signale z. B. in umgekehrter Folge (δ 2.99, 3.05)] und anderen Solventien war durch die Deuteriummarkierungen sehr erleichtert und die Identifizierung von Assoziatbanden des Peptidlactons (Chloroform, Benzol) erst möglich. — Einzelheiten des Spektrums von **11d** und ein diesbezüglicher Konformationsvorschlag (vgl. **1**), der zusätzlich auf Modellbetrachtungen basiert, wurden bereits kurz erörtert³⁰⁾.



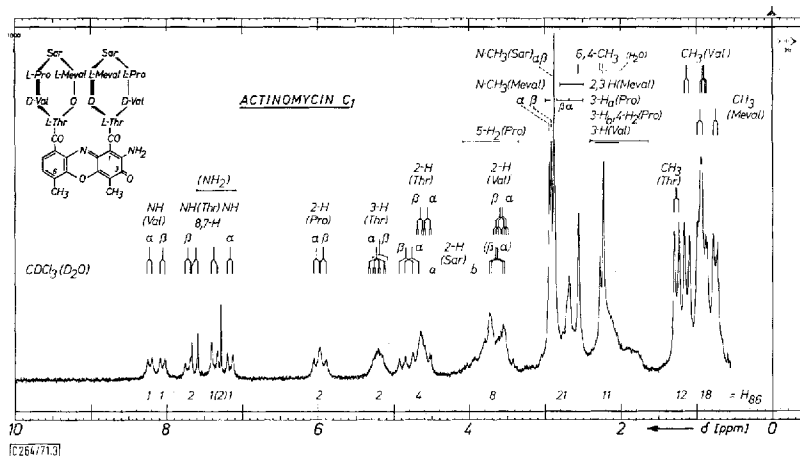
Abbild. 1. 100-MHz-NMR-Spektrum von *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-cyclo-[L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-L-valyl-L-valyl-O-Thr] in Deuteriochloroform (mit D₂O geschüttelt)

Für eine sichere, stellungsspezifische Zuordnung³⁶⁾ der *Actinomycin* C₁(**18**)-Signale (Abbild. 3) brauchten jetzt nur die Spektren ausgewählter *iso*- und *aniso*-Deutero-actinomycine (im NCH₃-Bereich z. B. **16a**, **15e** und **15a** — s. auch Abbild. 2 und l. c.³¹⁾) mit dem **18**-Spektrum verglichen und die Ergebnisse mit denen von Mehrfachresonanz-Messungen an **15**–**18** kombiniert zu werden. Da der Austausch bestimmter Wasserstoffe zugleich das Kopplungsschema ändert, ließen sich auch Banden von Nachbarprotonen gut zuordnen — z. B. bei **16c** mit 2-D in Thr _{α} , dessen 3-H- und NH(Thr) _{α} -Signale zum scharfen Quadruplett (δ 5.22; Kopplung mit 3-CH₃) bzw. verbreiterten Singulett (δ 7.13) vereinfacht wurden [für NH(Val) vgl. Abbild. 2]. Die

³⁶⁾ Mehrere inzwischen erfolgte, aber nicht stellungsspezifische Analysen von Actinomycin C₁-Spektren [T. A. Victor, F. E. Hruska, C. L. Bell und S. S. Danyluk, Tetrahedron Letters [London] **1969**, 4721; B. H. Arison und K. Hoogsteen, Biochemistry **9**, 3976 (1970); F. Conti und P. De Santis, Nature [London] **227**, 1239 (1970)] zeigen sowohl untereinander als auch von der hier getroffenen Zuordnung einige Abweichungen.



Abbild. 2. 100-MHz-NMR-Spektren des *aniso*-Deutero-actinomycin C_1 -Paares **16a** (B), **17a** (A) sowie des Pentadecadeutero-actinomycins **15a** (C) [Deuteriochloroform (D_2O)]



Abbild. 3. 100-MHz-NMR-Spektrum von Actinomycin C_1 (**18** = **2**) in Deuteriochloroform (mit D_2O geschüttelt)

NH-Signale zeigen — besonders deutlich bei partieller C-2(Thr,Val)-Markierung — einen Isotopenshift von ca. -0.02 ppm. Der Deuterierungsgrad reichte in allen Fällen für eine sichere Signalzuordnung aus; selbst bei dem an C-2(Sar) erwartungsgemäß schwach (vgl. **9d**) markierten **16d,17d**-Paar wiesen die 2- H_a -Signale (δ 4.74, 4.82; die von 2- H_b liegen zu dicht) einen ca. 20proz. Intensitätsunterschied auf.

Die δ -Wert-Änderungen beim Übergang vom Cyclopeptid (**11d**) zum Actinomycin C_1 (**18**) [Tab.: Sp. 6 $\rightarrow$ 7a, b] dürften sowohl auf einer gegenseitigen Abschirmung der Peptidgruppen als auch — wie Modellsubstanzen¹⁸⁾ zeigten — auf unterschiedlichen Chromophoreinflüssen beruhen³⁷⁾. Die ursprüngliche Gerüstkonformation des Pep-

³⁷⁾ Derartige Einflüsse beobachtet man auch im Spektrum von Pseudo-actinomycin C_1 [1.9- und 4.6-Substituenten am Chromophor von **2** vertauscht]: H. Brockmann und E. Schulze, Tetrahedron Letters [London] **1971**, 1489.

tidlactons (wie etwa in **1**) sollte dabei trotz kleinerer Kopplungskonstantenänderungen [z. B. $J_{\text{CH,NH}}(\text{Val})$: 8.2 $\rightarrow$ 5.6 Hz] und einiger noch nicht plausibler δ -Wert-Verschiebungen im wesentlichen erhalten bleiben. Einzelheiten hierzu und zum Problem der räumlichen Einstellung der Lactongruppen wurden schon kurz diskutiert⁴⁾.

Die Zuordnung der Actinomycin C₁(**18**)-Signale läßt sich auf Spektren von eng mit **18** verwandten Actinomycinen wie C₂, i-C₂ und C₃ (D-*a*-Ile statt D-Val in β , α oder β und α) — auch nicht native **18**-Varianten mit L-Ser statt L-Thr oder D-Leu statt D-Val¹⁵⁾ zählen dazu — ohne weiteres übertragen. Selbst bei stärker von **18** abweichenden Actinomycinen der X-, F-, E- oder Z-Reihen^{2, 38)} ist, wie einige Messungen bestätigten, die Bandenidentifizierung nun sehr vereinfacht. Diese weitgehende Übereinstimmung zahlreicher Actinomycine in den konformationsempfindlichen NMR-Spektren stützt die auf chemischen Befunden [stereospezifische Cyclisierung, gleiche Konfigurationssequenzen (LDL-L oder LD--L), enge Variationsbreite in den Aminosäuren etc.] beruhende Annahme, daß allen Actinomycinen als charakteristisches Strukturmerkmal eine bestimmte, *einheitliche Gerüstkonformation* zugrunde liegt.

Die genaue NMR-Analyse der ganzen Verbindungsfolge Dipeptid $\rightarrow$ lineares Pentapeptid $\rightarrow$ Cyclopentapeptid $\rightarrow$ einseitig fixiertes Bis-cyclopeptid ist eine zuverlässige Basis für weitergehende NMR-, IR- und osmometrische Mol-Gew.-Untersuchungen solcher Peptidderivate in unterschiedlichen Solventien. Besonders interessant sind sowohl zusammenhängende *Konformationsanalysen* bis hin zur Ermittlung der Sekundärstruktur von Actinomycinen als auch Untersuchungen der *Peptid/Peptid-Wechselwirkung* in verschiedenartigen freien oder am Actinocinyl fixierten Kombinationen wie linear/linear (Assoziation, Wasserstoffbrücken), linear/cyclisch (z. B. in **12, 13** die Präformierung eines linearen durch den benachbarten cyclischen Peptidteil) und cyclisch/cyclisch (Dimerenbildung freier Peptidlactone, Verhalten im „fixierten Zustand“). Damit zusammen hängt die räumliche Einstellung der Lactonringe in Assoziaten und Actinomycinen (Rotationsisomerie, Tertiärstruktur)⁴⁾. Im übrigen sollten die auch präparativ gut zugänglichen Deutero-actinomycine bei der Untersuchung *inter-molekularer* Actinomycin/Actinomycin- und Actinomycin-Substrat-Wechselwirkungen von Nutzen sein, insbesondere, da bei bestimmter Fragestellung (z. B. Zuordnung der NH-Signale nach Komplexbildung) oft nur einfache, jedoch stellungsspezifische Markierungen nötig sind.

Die Kombination des *aniso*-Actinomycin-Syntheseweges mit gängigen oder speziellen Deuterierungsmethoden führt somit zu einem selektiven, α, β -stellungsspezifischen Markierungsverfahren für Actinocinylpeptide und Actinomycine, das gleichzeitig vielfältige, vor allem NMR-spektrometrisch interessante Peptidderivate liefert, bei der Synthese entstehende Diastereomere meist selbsttätig eliminiert und im übrigen auf andere Markierungsarten (¹⁴C, ¹⁵N usw.) übertragbar ist. Selbst Actinomycine mit *perdeuterierten* Peptidlactongruppen in α, β oder α und β können als weitgehend ¹H-NMR-neutrale Verbindungen, die die ungestörte NMR-spektrometrische Beobachtung eines Komplex- oder Reaktionspartners erlauben, von großem Interesse sein.

38) H. Brockmann und J. H. Manegold, Chem. Ber. **95**, 1081 (1962); H. Brockmann und J. H. Manegold, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **343**, 86 (1965).

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Brockmann für die sehr großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Frau M. Köppler danke ich für sehr geschickte experimentelle Mitarbeit und Frau I. Beller, Fräulein E. Pietsch sowie Herrn U. Leonhardt für sorgfältige NMR-spektroskopische Messungen.

Beschreibung der Versuche³⁹⁾

Lösungsmittelsysteme (LS) für die Chromatographie⁴⁰⁾

LS I: Butanol/Dibutyläther/15proz. wäßriges Natrium-*m*-kresotinat⁴¹⁾ (3 : 7 : 10).

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

LS III: Butanol/Dibutyläther/10proz. wäßriges Natrium-*m*-kresotinat (1 : 1 : 2).

LS IV: (2 : 3 : 5).

LS V [für präparative Schichtchromatographie an Kieselgel PF₂₅₄ („Merck“)] : Chloroform/Methanol (18 : 1).

N-*p*-Toluolsulfonyl-*N*-trideuteromethyl-glycin (**3i**): 5.0 g *N*-*p*-Toluolsulfonyl-glycin¹⁶⁾, 26 ccm 3*n* NaOH und 2 ccm Trideuteromethyljodid wurden im 50-ccm-Bombenrohr 6 Stdn. auf 80° erhitzt und nach Erkalten mit Chloroform ausgeschüttelt. Die mit konz. Salzsäure angesäuerte wäßrige Phase extrahierte man 3–4 mal mit Chloroform/Äthylacetat (1 : 1), wusch den Extrakt mit *n* HCl (etwas Kaliumhydrogensulfit enthaltend) sowie Wasser und kristallisierte den Eindampfrückstand zweimal aus wenig Wasser um (4.7 g). Erneutes Kristallisieren aus ca. 200 ccm Wasser bei 20° ergab 3.6 g (Mutterlauge: 0.48 g) **3i**, das laut NMR-Spektrum frei von Tosylglycin und vollständig am *N*-Methyl deuteriert war. Schmp. 147–150°; zur Analyse wurde 6 Stdn. bei 65° i. Hochvak. getrocknet.

NMR⁴²⁾ (Aceton-*d*₆): Tos dd δ 7.40/7.71 ($J = 8.0$ Hz), s 2.41; 2-H₂(Sar) s 3.94; kein NCH₃-Signal. — Tosylglycin: 2-H₂ d 3.75 ($J = 6$ Hz).

C₁₀H₁₀D₃NO₄S (246.3) Ber. C 48.76 H 6.54 N 5.68 Gef. C 48.87 H 5.63⁴³⁾ N 5.61

p-Toluolsulfonyl-*N*-trideuteromethyl-*L*-valin (**3g**): 6.0 g *N*-*p*-Toluolsulfonyl-valin⁴⁴⁾, 26 ccm 3*n* NaOH und 2 ccm Trideuteromethyljodid wurden wie vorstehend behandelt und aufgearbeitet, der Eindampfrückstand des Chloroform/Äthylacetat-Extraktes jedoch zur Abscheidung restlichen Tosylvalins (1.65 und 0.23 g) zweimal langsam aus Äthylacetat/Benzol/Cyclohexan kristallisiert. Die eingedampfte Mutterlauge gab aus Benzol/Cyclohexan (ca. 1 : 18) 4.0 g dem NMR-Spektrum nach vollständig am *N*-Methyl deuteriertes und praktisch tosylvalin-freies **3g**; Schmp. 77–81°, $[\alpha]_D^{20}$: $-25 \pm 1^\circ$ ($c = 1.5$ in Methanol). Zur Analyse wurde 6 Stdn. bei 50° i. Hochvak. getrocknet.

³⁹⁾ Schmp. auf dem Kofler-Block bestimmt und korrigiert.

⁴⁰⁾ Cellulosepulver (Nr. 123) und Chromatographiepapier (2043 b mg/l) von Fa. Schleicher & Schüll, Dassel. — Neutrales Kieselgel: Fa. Gebr. Hermann, Köln-Ehrenfeld; Kieselgel M, Körnung DIN 60–80.

⁴¹⁾ Alle Kresotinat-Lösungen mit *m*-Kresotinsäure gesättigt.

⁴²⁾ Gerät: NMR-Spektrometer HA-100 der Fa. Varian Ass., Palo Alto (Calif./USA). Interner Standard war — wenn nicht anders angegeben — Tetramethylsilan ($\delta_{\text{TMS}} = 0$ ppm).

⁴³⁾ Bei der Verbrennungsanalyse entsprechen 1.0 D etwa 1.1 H. Die für deuterierte Verbindungen gefundenen Wasserstoffwerte liegen daher zu tief und müßten besser mit den für unmarkierte Substanzen berechneten verglichen werden (C₁₀H₁₃NO₄S: H ber. 5.39).

⁴⁴⁾ E. Fischer und W. Lipschitz, Ber. dtsch. chem. Ges. **48**, 360 (1915).

NMR⁴²⁾ (CDCl₃): Tos dd δ 7.24/7.68 ($J = 8.0$ Hz), s 2.38; CO₂H s 8.7; 2-H(MeVal) d 4.14 (10.3); 3-H m 2.05 (10.3/6.5); (CH₃)₂ dd 0.93/0.98 (6.5). — Tosylvalin: 2-H dd δ 3.76 ($J = 10/5$ Hz); 3-H m 2.09 (5/6.5); (CH₃)₂ dd 0.94/0.86 (6.5).

C₁₃H₁₆D₃NO₄S (288.4) Ber. C 54.14 H 7.68 N 4.85 Gef. C 54.15 H 6.68⁴³⁾ N 4.93

N-Trideuteromethyl-glycin-benzylester-hydrochlorid (**4j**·HCl): 5.0 g **3i** und 25 ccm Salzsäure ($d = 1.19$) hielt man im Bombenrohr 24 Stdn. bei 105°, filtrierte dann bei 0° die Toluolsulfonsäure (mit wenig konz. Salzsäure nachgewaschen) ab und dampfte das Filtrat i. Vak. ein. Das zur Entfernung von Salzsäure mit Wasser abgedampfte, rohe Sarkosin-hydrochlorid (**4i**·HCl) (ca. 3 g) wurde sogleich mit Benzylalkohol/Benzolsulfonsäure wie üblich¹⁷⁾ verestert und das **4j**-Hydrochlorid aus Methanol/- oder Aceton/Äther umkristallisiert. Ausb. 3.2 g; Schmp. 176–179°; zur Analyse wurde 8 Stdn. bei 60° i. Hochvak. getrocknet.

NMR⁴²⁾ (Methanol-d₄): Bzl δ 7.38, 5.28; 2-H₂ s 4.01.

C₁₀H₁₁D₃NO₂]Cl (218.7) Ber. C 54.92 H 7.83 Cl 16.2 N 6.39
Gef. C 54.55 H 6.44⁴³⁾ Cl 16.1 N 6.26

N-Trideuteromethyl-L-valin-methylester-hydrochlorid (**3h**·HCl): 4.0 g **3g** wurden mit 20 ccm Salzsäure ($d = 1.19$) wie **3i** hydrolysiert und das rohe Methylvalin-hydrochlorid auf übliche Weise mit methanol. Salzsäure verestert. Mehrmaliges Umkristallisieren aus Aceton/Äther gab 2.0 g **3h**-Hydrochlorid mit Schmp. 136–139° und $[\alpha]_D^{20}$: $+29 \pm 1^\circ$ ($c = 2.5$ in Methanol). Zur Analyse wurde 6 Stdn. bei 50° i. Hochvak. getrocknet.

NMR⁴²⁾ (CDCl₃): CH₃O s δ 3.85; 2-H d 3.64 (3.0); 3-H m 2.60 (3.0/6.5); (CH₃)₂ dd 1.19/1.13 ($J = 6.5$ Hz). — Ein NCH₃-Signal läge bei δ 2.82.

C₇H₁₃D₃NO₂]Cl (184.7) Ber. C 45.52 H 10.36 Cl 19.2 N 7.58
Gef. C 45.66 H 9.16⁴³⁾ Cl 19.1 N 7.46

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-2-deutero-L-threonin (**4e**): Zu 2.5 g *L*-Threonin, 14 g Deuteriumoxid, 1.6 g Pyridin und 1 ccm Acetanhydrid gab man in 30-Minuten-Abständen unter Rühren mit dem Vibromischer bei 20° je 1 ccm Acetanhydrid, insgesamt 10 ccm. Das noch 2 Stdn. weitergerührte und dann i. Vak. (40°) eingedampfte Reaktionsgemisch wurde mit 5 ccm Deuteriumoxid abgedampft und 90 Min. mit 60 ccm 2*n* HCl gekocht. Den mehrmals mit Wasser abgedampften Eindampfrückstand versetzte man in wenig Wasser bis zur basischen Reaktion mit Triäthylamin, dampfte wiederum mit Wasser ab und kristallisierte den Rückstand dreimal aus Wasser/Äthanol um. Ausb. 1.11 g eines Gemisches aus 2-Deutero-L-threonin, 2-Deutero-D-allo-threonin und L-Threonin (laut NMR-Spektrum und Drehwert etwa im Verhältnis 45:35:20). Deuterierungsgrad 0.80 ± 0.02 . $[\alpha]_D^{20}$: $-22 \pm 0.3^\circ$ ($c = 2.1$ in Wasser).

NMR⁴²⁾ (D₂O; HDO $\delta = 0$ ppm⁴⁵⁾): 2-Deutero-L-threonin: restliches 2-H d δ -1.15 ($J = 5.0$ Hz); 3-H q -0.48 (6.5); CH₃ d -3.40 (6.5). — 2-Deutero-D-allo-threonin: restl. 2-H d -0.89 (4); 3-H q -0.38 (6.5); CH₃ d -3.52 (6.5).

1.10 g des Threoningemisches wurden dann, wie kürzlich¹⁸⁾ beschrieben, mit dem Chlorid von 2.45 g 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoesäure verknüpft und das rohe Reaktionsgemisch zweimal fraktioniert kristallisiert.

1. Fraktion [aus Aceton/Benzol/Cyclohexan (1:1:1) bei 5°]: 1.0 g (41%) **4e**, Schmp. 169–176°, $[\alpha]_D^{20}$: $-42.7 \pm 0.2^\circ$ ($c = 1.2$ in Methanol). Deuterierungsgrad: 0.70 ± 0.03 . Zur Analyse wurde 6 Stdn. bei 90° i. Hochvak. getrocknet.

C₁₉H₁₈D₂N₂O₇ (390.4) Ber. C 58.45 H 5.67 N 7.17 Gef. C 57.54 H 5.25 N 7.20

⁴⁵⁾ Das HDO-Signal wurde zum Einlocken des Spektrometers benutzt.

2. Fraktion [Lösungsmittel wie oben (1 : 2 : 2), 22°]: 0.48 g (20%) **4e** (ca. 88proz.); Schmp. 155–168°, $[\alpha]_D^{20}$: $-37 \pm 0.3^\circ$ ($c = 1.6$ in Methanol). Deuterierungsgrad: 0.75 ± 0.03 .

3. Fraktion [sehr wenig Aceton, Benzol/Cyclohexan (ca. 1 : 5)]: 0.95 g (39%) *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-2-deutero-D-allo-threonin (ca. 75–80proz.); Schmp. 133–152°, $[\alpha]_D^{20}$: $+2.8 \pm 0.2^\circ$ ($c = 2.5$ in Methanol). Deuterierungsgrad: 0.90 ± 0.03 .

NMR⁴²⁾ (Aceton-d₆): **4e**: 5-H s δ 7.54 (6-H 7.60); OBzl, NH $\sim$ 7.43, s 5.03; restliches 2-H dd 4.62 ($J = 9.0/3.0$ Hz); 3-H q 4.44 (6.5); CH₃(aromat.) s 2.43; CH₃(Thr) d 1.26 (6.5). — D-*a*-Thr-Derivat: NH s δ 7.85; 5-H (6-H), OBzl, CH₃(aromat.) wie in **4e**; 2-H —; 3-H q 4.22 ($J = 6.5$ Hz); CH₃ d 1.32 (6.5).

2-Deutero-DL-prolin-benzylester-hydrochlorid (**3d**·HCl): 102 g Acetanhydrid kochte man 1 Stde. mit 20 g Deuteriumoxid, gab dann 7.0 g L-Prolin sowie weitere 15 g Acetanhydrid hinzu und kochte noch 15 Min. Der mit 5–10 g Deuteriumoxid abgedampfte Eindampfrückstand (i. Vak.) wurde 90 Min. mit 100 ccm 2*n* HCl gekocht und das nach Abdampfen i. Vak. erhaltene rohe 2-Deutero-DL-prolin-hydrochlorid (**3c**·HCl) sogleich mit benzylalkohol. Salzsäure wie üblich verestert. — Nach Umkristallisieren aus Äthanol/Äther oder Aceton erhielt man 5.0 g **3d**-Hydrochlorid mit Schmp. 120–128° und $[\alpha]_D^{20}$: $0 \pm 0.2^\circ$ ($c = 3.0$ in Methanol). Deuterierungsgrad: 0.83 ± 0.03 . Zur Analyse wurde 6 Stdn. bei 60° i. Hochvak. getrocknet.

NMR⁴²⁾ (CDCl₃): Bzl s δ 7.35, dd 5.24/5.19 ($J_{\text{gem.}} = 12$ Hz); restliches 2-H m 4.52; 5-H₂ m 3.52; 3,4-H₂ m 1.8–2.6. — **3c**·HCl in Trifluoressigsäure: restliches 2-H m 4.70; 5-H₂ m 3.73; 3,4-H₂ m 2.1–2.8. Deuterierungsgrad: 0.84 ± 0.03 .

C₁₂H₁₅DNO₂]Cl (242.7) Ber. C 59.38 H 7.06 Cl 14.6 N 5.77
Gef. C 59.15 H 6.80 Cl 14.3 N 5.71

N-Methyl-2-deutero-DL-valin-methylester-hydrochlorid (**4h**·HCl): 5.0 g *N*-Methyl-DL-valin²⁴⁾ wurden in einer zuvor 1 Stde. gekochten Mischung aus 13.5 g Deuteriumoxid und 68 g Acetanhydrid nach Zugabe weiterer 10 g Acetanhydrid 90 Min. gekocht. Den mit 5 g Deuteriumoxid abgedampften Eindampfrückstand (i. Vak.) verseifte man durch 2stdg. Kochen mit 70 ccm *n* HCl, dampfte i. Vak. ab und veresterte das rohe *N*-Methyl-2-deutero-DL-valin-hydrochlorid (**4g**·HCl) wie üblich mit methanol. Salzsäure. Umkristallisieren aus Aceton gab 3.6 g **4h**-Hydrochlorid mit Schmp. 133–135° und einem Deuterierungsgrad (NMR-Spektrum: vgl. **3h**·HCl) von 0.85 ± 0.03 . Zur Analyse wurde 6 Stdn. bei 50° i. Hochvak. getrocknet.

C₇H₁₅DNO₂]Cl (182.7) Ber. C 46.02 H 9.38 Cl 19.4 N 7.67
Gef. C 45.78 H 9.16 Cl 19.6 N 7.52

N-Formyl-2-deutero-D-valin (**4a**): 13.0 g DL-Valin deuterte man wie vorstehend mit 50 g Deuteriumoxid/255 g Acetanhydrid sowie weiteren 35 g Acetanhydrid und verseifte dann mit 250 ccm 2*n* HCl. — Der mit Wasser abgedampfte Eindampfrückstand (i. Vak.) wurde in möglichst wenig Wasser mit Triäthylamin neutralisiert und durch Zugabe von Äthanol kristallisiert. Ausb. nach Umkristallisieren aus Wasser/Äthanol: 10.4 g 2-Deutero-DL-Valin (**3a**). Deuterierungsgrad 0.86 ± 0.03 .

NMR⁴²⁾ (D₂O; HDO $\delta = 0$ ppm⁴⁵⁾): 2-H-Reste: d δ -1.16 ($J = 4.5$ Hz); 3-H -2.48 (4.5/7); (CH₃)₂ dd $-3.71/3.76$ (7).

10.4 g **3a** wurden mit 190 ccm Ameisensäure und 65 ccm Acetanhydrid wie üblich⁴⁶⁾ bei 15° formyliert und der Verdampfungsrückstand aus Wasser umkristallisiert. Ausb. 11.9 g; Schmp. 143–146°. Deuterierungsgrad laut NMR-Spektrum (vgl. unten) 0.85 ± 0.03 .

⁴⁶⁾ J. C. Sheehan und D.-D. H. Yang, J. Amer. chem. Soc. **80**, 1154 (1958).

16.6 g so erhaltenes *Formyl-2-deutero-DL-valin* ließen sich nach *E. Fischer*¹⁴⁾ mit 43.4 g *Brucin* in die Enantiomeren spalten. Dabei kristallisierten aus ca. 800 ccm Methanol (+4°) insgesamt 30.2 g **4a-Brucin-Salz**, aus dessen Lösung in 155 ccm Wasser das *Brucin* mit 29 ccm 2*n* *NaOH* bei 0° wieder abgeschieden wurde. Das mit Chloroform ausgeschüttelte Filtrat versetzte man mit 19.3 ccm 2*n* *HCl*, dampfte i. Vak. ein und kristallisierte den Rückstand bei 4° aus 19.4 ccm *n* *HCl* und wenig Wasser. Ausb. 6.6 g **4a**, das aus wenig Wasser nochmals umkristallisiert und zur Analyse 6 Stdn. bei 80° i. Hochvak. getrocknet wurde. Schmp. 151–153°; $[\alpha]_D^{20}$: $-13.7 \pm 0.2^\circ$ ($c = 1.2$ in absol. Äthanol); $-8.4 \pm 0.2^\circ$ ($c = 1.2$ in Methanol).

NMR⁴²⁾ (Aceton- d_6): CHO d δ 8.23 ($J = 2.0$ Hz); NH 7.50; 2-H (undeuterierter Anteil) dd 4.53 (9.0/5.0); 3-H m 2.21 (7.0); (CH₃)₂ dd 0.97/0.95 (7.0). Deuterierungsgrad: 0.85 ± 0.03 .

C₆H₁₀DNO₃ (146.2) Ber. C 49.30 H 8.27 N 9.58 Gef. C 49.18 H 7.85⁴³⁾ N 9.45

Formyl-2-deutero-L-valin wurde auf gleiche Weise aus der methanol. Mutterlauge isoliert: $[\alpha]_D^{20}$: $+11.8 \pm 0.2^\circ$ ($c = 1.1$ in absol. Äthanol).

Formyl-2-deutero-D-valyl-L-prolin-benzylester (5a)^{15,47)}: 7.3 g **4a** und 12.2 g *L-Prolin-benzylester-hydrochlorid* wurden wie für unmarkierte Verbindungen beschrieben mit 10.8 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (im folgenden DCCD) und 6.9 ccm *Triäthylamin* zu 12.8 g kristallisiertem **5a** verknüpft. Schmp. 108–110°; $[\alpha]_D^{20}$: $+10.1 \pm 0.3^\circ$ ($c = 3.5$ in absol. Äthanol). NMR⁴²⁾: vgl. Tab., Sp. 2. Zur Analyse wurde 6 Stdn. bei 75° i. Hochvak. getrocknet.

C₁₈H₂₃DN₂O₄ (333.4) Ber. C 64.84 H 7.56 N 8.41 Gef. C 65.13 H 7.34 N 8.55

Formyl-2-deutero-D-valyl-2-deutero-DL-prolin-benzylester (5c): 1.82 g **4a**, 3.05 g **3d-Hydrochlorid**, 2.7 g DCCD und 1.73 ccm *Triäthylamin* wurden wie oben umgesetzt und aufgearbeitet. Das schlecht kristallisierende Diastereomergemisch ließ sich aus Benzol an einer 2 × 15-cm-Säule aus saurem Kieselgel⁴⁸⁾ chromatographieren. Nachwaschen mit Benzol und dann Chloroform eluierte 3.2 g harzartiges, NMR-spektroskopisch fast reines **5c** mit $[\alpha]_D^{20}$: $+56 \pm 2^\circ$ ($c = 1.5$ in absol. Äthanol), das sogleich zu **5d** hydriert wurde.

*Formyl-2-deutero-D-valyl-L-prolyl-N-trideuteromethyl-glycin-benzylester (6a)*¹⁵⁾: Verknüpfen von 1.84 g durch Hydrieren von **5a** in Methanol erhaltenem kristall. *Formyl-2-deutero-D-valyl-L-prolin (5b)* und 1.66 g **4j-Hydrochlorid** unter Verwendung von 1.66 g DCCD und 1.05 ccm *Triäthylamin* lieferte nach Trennung des Rohproduktes an einer 11 × 2.6-cm-Kieselgelsäule⁴⁸⁾ 2.2 g NMR-spektrometrisch (vgl. Tab., Sp. 3) einheitliches **6a**. $[\alpha]_D^{20}$: $-18.6 \pm 1^\circ$ ($c = 4.0$ in absol. Äthanol). Zur Analyse wurde 10 Stdn. bei 80° i. Hochvak. getrocknet.

C₂₁H₂₅D₄N₃O₅ (407.5) Ber. C 61.89 H 8.17 N 10.32 Gef. C 61.94 H 7.48⁴³⁾ N 10.17

Formyl-2-deutero-D-valyl-2-deutero-DL-prolyl-sarkosin-benzylester (6c): Umsetzen von 2.38 g *Formyl-2-deutero-D-valyl-2-deutero-DL-prolin (5d)* — dem Hydrierungsprodukt (Methanol-Palladium/Kohle) von **5c** — und 2.15 g *Sarkosin-benzylester-hydrochlorid* mit 2.16 g DCCD und 1.37 ccm *Triäthylamin* führte wie vorstehend zu 2.7 g harzigem **6c**-Gemisch. $[\alpha]_D^{20}$: $+48 \pm 2^\circ$ ($c = 3.0$ in absol. Äthanol).

*Formyl-D-valyl-L-prolyl-N-trideuteromethyl-glycin-benzylester (6i)*¹⁵⁾: 1.05 g *Formyl-D-valyl-L-prolin*, 0.95 g **4j-Hydrochlorid**, 0.95 g DCCD und 0.60 ccm *Triäthylamin* gaben nach

⁴⁷⁾ Zitate an den Namen der deuterierten Peptide und Actinocinylpeptide geben im folgenden an, wo die entsprechenden unmarkierten Verbindungen beschrieben sind.

⁴⁸⁾ Saures Kieselgel: Neutrales Kieselgel in 0.1 *n* *HCl* aufgeschlämmt, abgesaugt und bei 110° bis zur Fließfähigkeit getrocknet.

Trennung des Rohproduktes an saurem Kieselgel⁴⁸⁾, wie schon beschrieben, 1.25 g harzartiges **6i** mit $[\alpha]_D^{20}$: $-17.5 \pm 1^\circ$ ($c = 2.3$ in absol. Äthanol), das nach NMR-spektrometrischer Kontrolle (Tab., Sp. 3) gleich weiterhydriert wurde.

*Formyl-D-valyl-L-prolyl-2,2-dideutero-sarkosin (6g)*¹⁵⁾: 2.5 g *Formyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin* wurden in einer zuvor 1 Stde. gekochten Mischung aus 5.0 g *Deuteriumoxid* und 20.4 g *Acetanhydrid* mit weiteren 5.0 g *Acetanhydrid* 1 Stde. auf 35° erwärmt. Den mit Chloroform abgedampften Eindampfrückstand (i. Vak.) erwärmte man in 5 ccm *Deuteriumoxid*/10 ccm *Aceton* 5 Min. auf ca. 60° und dampfte dann i. Vak. 3–4 mal mit *Aceton* und *Chloroform* ab. Der schaumige Rückstand kristallisierte aus mit sehr wenig *Methanol* versetztem *Äthylacetat*. Ausb. 2.0 g (80%) **6g**. Schmp. $158-161^\circ$; $[\alpha]_D^{20}$: $-2.8 \pm 0.3^\circ$ ($c = 2.7$ in absol. Äthanol). Deuterierungsgrad ca. 0.849). Zur Analyse wurde 8 Stdn. bei 80° i. Hochvak. getrocknet.

NMR⁴²⁾ ($\text{CDCl}_3/\text{D}_2\text{O}$ ⁴⁹⁾): CHO s δ 8.18, 2-H(Val) d 4.73 ($J = 7.5$ Hz), 3-H m ~ 2.05 , $(\text{CH}_3)_2$ dd 0.93/0.95 (6.5); 2-H(Pro) m ~ 4.8 , 3,4-H₂ m 1.8–2.3, 5-H₂ m 3.6/3.9; NCH₃(Sar) s 3.16, restliche 2-H₂ s 4.07.

$\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{D}_2\text{N}_3\text{O}_5$ (315.4) Ber. C 53.31 H 8.00 N 13.34 Gef. C 53.49 H 7.50⁴³⁾ N 13.24

*Formyl-2-deutero-D-valyl-L-prolyl-N-trideuteromethyl-glycyl-N-trideuteromethyl-L-valin-methylester (7a)*¹¹⁾: Aus 1.55 g *Formyl-2-deutero-D-valyl-L-prolyl-N-trideuteromethyl-glycin (6b)* — das wie üblich durch Hydrieren von **6a** in *Methanol* gewonnen wurde —, 0.92 g **3h-Hydrochlorid**, 1.08 g *DCCD* und 0.68 ccm *Triäthylamin* entstanden nach Trennung des Reaktionsgemisches an einer 3×11 -cm-Säule aus saurem Kieselgel⁴⁸⁾ (*Benzol*/*Chloroform* 7:3) 1.5 g (68%) schaumiges **7a**. $[\alpha]_D^{20}$: $-86 \pm 2^\circ$ ($c = 0.5$ in *Methanol*). Im NMR-Spektrum (vgl. Tab., Sp. 4) fehlten die NCH₃(Sar und MeVal)-Signale, NH(Val) gab ein Singulett; Deuterierungsgrad an C-2(Val): ca. 0.85⁵⁰⁾. Zur Analyse wurde 8 Stdn. bei 70° i. Hochvak. getrocknet.

$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{D}_7\text{N}_4\text{O}_6$ (447.5) Ber. C 56.36 H 9.69 N 12.52 1 CH₃O 6.9
Gef. C 56.61 H 8.62⁴³⁾ N 12.37 CH₃O 6.7

Formyl-2-deutero-D-valyl-2-deutero-DL-prolyl-sarkosyl-N-trideuteromethyl-L-valin-methylester (7c): 1.1 g durch Hydrieren von **6c** erhaltenes *Formyl-2-deutero-D-valyl-2-deutero-DL-prolyl-sarkosin (6d)* und 0.65 g **3h-Hydrochlorid** wurden mit Hilfe von 0.77 g *DCCD* und 0.49 ccm *Triäthylamin* verknüpft und wie üblich aufgearbeitet. Ausb. 1.1 g glasiges **7c** mit $[\alpha]_D^{20}$: $-43 \pm 2^\circ$ ($c = 0.5$ in *Methanol*), das nach NMR-spektrometrischer Kontrolle (vgl. Tab., Sp. 4) sogleich entformyliert wurde.

*Formyl-D-valyl-L-prolyl-2,2-dideutero-sarkosyl-N-methyl-L-valin-methylester (7g)*¹¹⁾: Kuppeln von 2.38 g **6g** mit 1.4 g *N-Methyl-L-valin-methylester-hydrochlorid* durch Umsetzen mit 1.7 g *DCCD* und 1.05 ccm *Triäthylamin* gab nach Trennung des Rohproduktes an einer 3.0×17.5 -cm-Säule aus saurem Kieselgel⁴⁸⁾ (*Benzol*/*Chloroform*, 4:1) 2.5 g schaumiges **7g**. Im NMR-Spektrum fehlten hier die 2-H(Sar)-Signale bei δ 3.55 und 4.83. $[\alpha]_D^{20}$: $-91 \pm 2^\circ$ ($c = 1.2$ in *Methanol*).

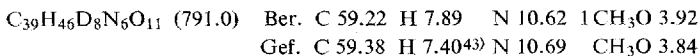
Formyl-D-valyl-L-prolyl-N-trideuteromethyl-glycyl-N-methyl-2-deutero-DL-valin-methylester (7i): 940 mg durch Hydrieren von **6i** erhaltenes, kristall. *Formyl-D-valyl-L-prolyl-N-trideu-*

⁴⁹⁾ NMR-Spektren von Peptiden mit freien Carboxygruppen in CDCl_3 sind — auch nach Durchschütteln der Probe mit etwas D_2O — oft weniger scharf als die von Peptidestern wie **6a**; entsprechend ungenau (hier ca. $\pm 10\%$) wird die Bestimmung des Deuteriumgehaltes.

⁵⁰⁾ Bei längeren Peptiden ist, da die Signale aller C-2-Protonen meist dicht zusammenliegen (vgl. Tab.), die Genauigkeit der Deuteriumbestimmung durch Integration von der Anzahl der C-2-Wasserstoffe abhängig und oft weniger genau (hier ca. $\pm 10\%$).

teromethyl-glycin (**6j**) und 580 mg **4h-Hydrochlorid** gaben durch Umsetzen mit 700 mg *DCCD* und 0.44 ccm *Triäthylamin*, wie für **7a** beschrieben, 0.95 g glasiges **7i**. $[\alpha]_D^{20}$: $-16 \pm 1^\circ$ ($c = 0.6$ in Methanol). Nach NMR-spektrometrischer Kontrolle [die Signale von 2-H(MeVal) und $\text{NCH}_3(\text{Sar})$ fehlten] — vgl. Tab., Sp. 4 — wurde wie üblich mit 1.5 *n* methanol. Salzsäure entformyliert.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-*L*-threonyl-2-deutero-*D*-valyl-*L*-prolyl-*N*-trideuteromethyl-glycyl-*N*-trideuteromethyl-*L*-valin-methylester (**8a**)^{11,18)}: 1.25 g *N*-(2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl)-*L*-threonin und 1.46 g aus **7a** durch Entformylierung in 1.5 *n* methanol. Salzsäure erhaltenes 2-Deutero-*D*-valyl-*L*-prolyl-*N*-trideuteromethyl-glycyl-*N*-trideuteromethyl-*L*-valin-methylester-hydrochlorid (**7b**·HCl)¹¹⁾ ($[\alpha]_D^{20}$: $-146 \pm 3^\circ$, $c = 0.8$ in Methanol) wurden, wie für unmarkiertes **8a** beschrieben, mit 0.81 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3) und 0.44 bzw. 0.46 ccm *Triäthylamin* umgesetzt. Chromatographie des Reaktionsgemisches an Aluminiumoxid II—III („Merck“; 2.5×8 -cm-Säule; eluiert mit Äthylacetat und Aceton — vgl. auch I. c.¹⁸⁾, S. 2492) gab 1.7 g blaßgelbes, schaumiges **8a**, $[\alpha]_D^{20}$: $-51 \pm 2^\circ$ ($c = 1.1$ in Methanol). Im NMR-Spektrum (Tab., Sp. 5) fehlten die $\text{NCH}_3(\text{Sar}, \text{MeVal})$ -, 2-H(Val)- und 6-H-Signale; NH(Val) gab ein Singulett. Zur Analyse wurde 8 Stdn. bei 70° i. Hochvak. getrocknet.



N-(2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl)-*L*-threonyl-2-deutero-*D*-valyl-2-deutero-*D*-L-prolyl-sarkosyl-*N*-trideuteromethyl-*L*-valin-methylester (**8c**): 0.86 g *N*-(2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl)-*L*-threonin¹⁸⁾, 1.0 g aus **7c** durch Entformylierung gewonnenes 2-Deutero-*D*-valyl-2-deutero-*D*-L-prolyl-sarkosyl-*N*-trideuteromethyl-*L*-valin-methylester-hydrochlorid (**7d**·HCl) ($[\alpha]_D^{20}$: $-90 \pm 2^\circ$, $c = 0.8$ in Methanol), 0.56 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3) und 0.31 bzw. 0.32 ccm *Triäthylamin* gaben 1.05 g (60%) blaßgelbes **8c**-Gemisch. $[\alpha]_D^{20}$: $-25 \pm 1^\circ$ ($c = 1.9$ in Methanol). Das NMR-Spektrum (vgl. Tab., Sp. 5) war mit der **8c**-Struktur im Einklang.

N-(2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl)-2-deutero-*L*-threonyl-*D*-valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-methylester (**8e**)¹⁸⁾: 1.92 g **4e** wurden unter Verwendung von 1.3 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3) und 0.69 bzw. 0.71 ccm *Triäthylamin* mit 2.3 g *D*-Valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-methylester-hydrochlorid¹¹⁾ ($[\alpha]_D^{20}$: $-151 \pm 3^\circ$, $c = 2.0$ in Methanol), wie für **8a** erläutert, verknüpft und lieferten 1.8 g (60%) blaßgelbes, schaumiges **8e**. $[\alpha]_D^{20}$: $-49 \pm 2^\circ$ ($c = 1.8$ in Methanol). Im NMR-Spektrum fehlten das 6-H- und das 2-H(Thr)-Signal (Tab., Sp. 5) weitgehend.

N-(2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl)-*L*-threonyl-*D*-valyl-*L*-prolyl-2.2-dideutero-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-methylester (**8g**)¹⁸⁾: Aus 0.86 g *N*-(2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl)-*L*-threonin, 1.0 g *D*-Valyl-*L*-prolyl-2.2-dideutero-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-methylester-hydrochlorid (**7h**·HCl) — dem **7g**-Entformylierungsprodukt mit $[\alpha]_D^{20}$: $-150 \pm 3^\circ$ ($c = 1.6$ in Methanol) — sowie 0.57 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3) und 0.31 bzw. 0.32 ccm *Triäthylamin* entstanden nach Reinigung des Reaktionsproduktes an einer 2×8 -cm-Aluminiumoxid II—III-Säule (eluiert mit Äthylacetat und Aceton) 1.0 g schaumiges, blaßgelbes **8g**. $[\alpha]_D^{20}$: $-48 \pm 2^\circ$ ($c = 0.9$ in Methanol). Die NMR-Signale von 2-H₂(Sar) und 6-H fehlten erwartungsgemäß.

N-(2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl)-*L*-threonyl-*D*-valyl-*L*-prolyl-*N*-trideuteromethyl-glycyl-*N*-methyl-2-deutero-*D*-L-valin-methylester (**8i**): Aus 730 mg *N*-(2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl)-*L*-threonin, 0.85 g *D*-Valyl-*L*-prolyl-*N*-trideuteromethyl-glycyl-*N*-methyl-2-deutero-*D*-L-valin-methylester-hydrochlorid (**7j**·HCl) — dem **7i**-Ent-

formylierungsprodukt, $[\alpha]_D^{20}$: $-79 \pm 2^\circ$ ($c = 0.5$ in Methanol) —, 0.26 bzw. 0.28 ccm Tri-äthylamin sowie 0.48 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3) erhielt man 1.1 g blaß-gelbes, amorphes **8i**. $[\alpha]_D^{20}$: $-12 \pm 1^\circ$ ($c = 1.3$ in Methanol). Das NMR-Spektrum stimmte mit der **8i**-Struktur überein.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-cyclo-[L-threonyl-2-deutero-D-valyl-L-prolyl-N-trideuteromethyl-glycyl-N-trideuteromethyl-L-valyl-O_{Thr}] (**9a**)¹¹⁾: 1.45 g **8a** in 4 ccm Methanol wurden mit 2.05 ccm *n* NaOH bei 40° in 90 Min. zu 1.2 g *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-L-threonyl-2-deutero-D-valyl-L-prolyl-N-trideuteromethyl-glycyl-N-trideuteromethyl-L-valin (**8b**) verseift¹⁸⁾; $[\alpha]_D^{20}$: $-35 \pm 1^\circ$ ($c = 0.7$ in Methanol). 1.1 g davon — 3 Stdn. bei 60° i. Hochvak. getrocknet — cyclisierte man wie beschrieben mit 350 ccm Acetylchlorid/*N*-Acetyl-imidazol-Reagenzlösung²⁸⁾, arbeitete auf (l. c.¹¹⁾, S. 2240) und chromatographierte das Reaktionsgemisch an einer 2.5 × 10-cm-Aluminiumoxid IV-säule⁵¹⁾ mit Benzol (Vorlauf) und Äthylacetat (1.05 g).

Die Äthylacetat-Fraktion ließ sich nun entweder direkt an Kieselgelplatten (günstig für kleinere Ansätze) oder — bei Mengen von >1–2 g rationeller — an einer vorgeschalteten Cellulosesäule und sodann auf erheblich weniger Platten trennen (vgl. l. c.¹¹⁾ S. 2241, Absatz c).

Das rohe **9a** wurde an einer 4 × 45-cm-Cellulosesäule (LS I) vorgereinigt und die fluoreszenzlöschende Hauptzone (0.42 g) nach üblicher Aufarbeitung auf 5 mit je 35 g Kieselgel PF₂₅₄ („Merck“) beschichteten 20 × 40-cm-Platten (LS V) getrennt. Die zweitschnellste Zone (Fluoreszenzlöschung) enthielt reines **9a**, das wie beschrieben isoliert, aus wenig Chloroform mit Benzol und Petroläther gefällt, abzentrifugiert und 8 Stdn. bei 70° i. Hochvak. getrocknet wurde. Ausb. 295 mg (28%) amorphes, bei 160–164° schmelzendes Pulver mit $[\alpha]_D^{20}$: $-13.0 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2.4$ in Methanol).

C₃₈H₄₂D₈N₆O₁₀ (758.9) Ber. C 60.14 H 7.71 N 11.08 Gef. C 60.12 H 6.83⁴³⁾ N 11.15

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-cyclo-[L-threonyl-2-deutero-D-valyl-2-deutero-L-prolyl-sarkosyl-N-trideuteromethyl-L-valyl-O_{Thr}] (**9b**): Das durch Verseifen von 0.93 g **8c** mit 1.3 ccm *n* NaOH in 3 ccm Methanol erhaltene *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-L-threonyl-2-deutero-D-valyl-2-deutero-DL-prolyl-sarkosyl-N-trideuteromethyl-L-valin (**8d**) (0.75 g, $[\alpha]_D^{20}$: $-12 \pm 0.5^\circ$, $c = 0.8$ in Methanol) wurde mit ca. 280 ccm Reagenzlösung wie bei **9a** cyclisiert und die von der 2 × 8-cm-Aluminiumoxid IV-Säule eluierte Äthylacetatfraktion (0.7 g) direkt auf 10 20 × 40-cm-Kieselgelplatten getrennt. Aus der drittschnellsten Hauptzone erhielt man — NMR-spektrometrisch (Abbild. 1) leicht zu identifizieren — 92 mg (13%) **9b**, das 8 Stdn. i. Hochvak. bei 70° getrocknet wurde. Schmp. 158–164°; $[\alpha]_D^{20}$: $-13.9 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2.0$ in Methanol).

C₃₈H₄₄D₆N₆O₁₀ (756.9) Ber. C 60.30 H 7.47 N 11.11 Gef. C 60.16 H 6.93 N 11.19

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-cyclo-[2-deutero-L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valyl-O_{Thr}] (**9c**): 1.10 g (1.4 mMol) **8e** in 3.2 ccm Tetradeuteromethanol und 1.6 ccm Deuteriumoxid wurden mit 66 mg (1.65 mMol) Natriumhydroxid 90 Min. auf 40° erwärmt, dann i. Vak. vom Methanol befreit und nach Zugabe von 10 ccm Deuteriumoxid mit 20 ccm Chloroform/Äthylacetat (1:1) geschüttelt. Die durch Zentrifugieren abgetrennte und mit *n* HCl angesäuerte wäßrige Phase extrahierte man mit Chloroform/Äthylacetat (1:1), wusch den Extrakt mit angesäuertem Wasser, dampfte i. Vak. ein und trocknete den schaumigen Rückstand 3 Stdn. bei 70° i. Hochvak. Ausb. 0.92 g *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-2-deutero-L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin (**8f**); $[\alpha]_D^{20}$: $-31 \pm 1^\circ$ ($c = 0.8$ in Methanol).

⁵¹⁾ 100 g Aluminiumoxid II–III („Merck“) mit 9 g Wasser inaktiviert.

8f (0.8 g) wurde dann mit 250 ccm *Reagenzlösung* wie **8b** cyclisiert, jedoch die Reaktionszeit von 120 auf 90 Min. verkürzt und der Eindampfrückstand (i. Vak.) vor der Aufarbeitung 10 Min. bei 40° mit 5 ccm Deuteriumoxid behandelt. Man trennte wiederum an Aluminiumoxid IV (2.5×8 -cm-Säule) und danach die Äthylacetat-Fraktion (0.76 g) an $10 \times 20 \times 40$ -cm-Kieselgelplatten (LS V) und erhielt aus der 3. Hauptzone von vorn 210 mg (27%) weißes, amorphes **9c**. Schmp. $160-166^\circ$; $[\alpha]_D^{20}$: $-14.3 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1.5$ in Methanol). Zur Analyse wurde 6 Stdn. bei 70° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{38}H_{48}D_2N_6O_{10}$ (752.9) Ber. C 60.62 H 6.96 N 11.17 Gef. C 60.40 H 6.97 N 11.22

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-cyclo-[L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-2,2-dideutero-sarkosyl-N-methyl-L-valyl- O_{Thr}] (**9d**): 0.9 g (1.15 mMol) **8g** wurden in 3 ccm Tetradeuteromethanol und 1.5 ccm Deuteriumoxid mit 54 mg (1.35 mMol) Natriumhydroxid, wie für **8e** beschrieben, zu *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-2,2-dideutero-sarkosyl-N-methyl-L-valin (**8h**) verseift. Ausb. 0.72 g; $[\alpha]_D^{20}$: $-29 \pm 1^\circ$ ($c = 0.7$ in Methanol)⁵².

0.32 g **8h** cyclisierte man wie **8f** (120 ccm *Reagenzlösung*, 90 Min.), nahm den Eindampf-rückstand wiederum in etwas Deuteriumoxid auf und trennte das Reaktionsgemisch wie üblich an Aluminiumoxid IV (2×4 -cm-Säule) und Kieselgel ($5 \times 20 \times 40$ -cm-Platten). Die 3. Hauptzone von vorn ergab 79 mg (25%) bei $160-168^\circ$ schmelzendes **9d**, das 6 Stdn. bei 70° i. Hochvak. getrocknet wurde. $[\alpha]_D^{20}$: $-14 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2.5$ in Methanol).

$C_{38}H_{47}D_3N_6O_{10}$ (753.9) Ber. C 60.54 H 7.09 N 11.15 Gef. C 60.62 H 6.85 N 11.13

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-cyclo-[L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-N-trideuteromethyl-glycyl-N-methyl-L-valyl- O_{Thr}] (**9e**): 0.96 g **8i** wurden in 3 ccm Methanol mit 1.35 ccm *n* NaOH zu 0.75 g *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-6-deutero-benzoyl]-L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-N-trideuteromethyl-glycyl-N-methyl-2-deutero-DL-valin (**8j**) verseift ($[\alpha]_D^{20}$: $-12 \pm 0.5^\circ$, $c = 1.0$ in Methanol)⁵². 0.62 g davon cyclisierte man, wie bei **9a** erläutert, mit 120 ccm *Reagenzlösung* und trennte die von der 2×8 -cm-Aluminiumoxid IV-Säule eluierte Äthylacetat-Fraktion (0.6 g) an $8 \times 20 \times 40$ -cm-Kieselgelplatten. **9e** aus der 3. Zone von vorn war ein weißes, amorphes Pulver mit Schmp. $157-163^\circ$ und $[\alpha]_D^{20}$: $-13.0 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2.4$ in Methanol). Ausb. 166 mg; bei 70° wurde i. Hochvak. 6 Stdn. getrocknet.

$C_{38}H_{46}D_4N_6O_{10}$ (754.9) Ber. C 60.46 H 7.21 N 11.13 Gef. C 60.17 H 7.13 N 11.19

[2($Val_{\alpha,\beta}$), *N*-Methyl($Sar_{\alpha,\beta}$; $MeVal_{\alpha,\beta}$), 8-pentadecadeutero]actinomycin C_1 (**15a**) sowie [2(Val_α), *N*-Methyl(Sar_α , $MeVal_\alpha$), 8-octadeutero]actinomycin C_1 -säure-(α)-lacton (**12a**), [2(Val_β), *N*-Methyl(Sar_β , $MeVal_\beta$)-heptadeutero]actinomycin C_1 -säure-(β)-lacton (**13a**) und Actinomycin C_1 -säure (**14a**)¹⁸: Ein aus 228 mg (0.30 mMol) **9a** und 465 mg (0.60 mMol) *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-L-threonyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin (**11b**)¹¹) (oder 520 mg **11b**-Benzylester¹⁵) durch Hydrierung mit 10proz. Palladium/Kohle in 40 ccm Methanol erhaltenes **10a/11a**-Gemisch wurde in 80 ccm Methanol/0.07 *m* Phosphatpuffer, pH 7.2, (1:1) mit 1.0 g Kaliumhexacyanoferrat(III) bei pH 7.2 oxydiert. Aufarbeitung und Isolierung der vier Reaktionsprodukte (Cellulosesäule: 4.5×80 cm, LS II) erfolgten genau wie auf S. 2498–2499 der letzten Mittel.¹⁸ beschrieben. — **15a** aus dem Vorlauf wurde an einer 3×25 -cm-Cellulosesäule (LS III) nachgereinigt (vgl. **15e**) und zweimal aus Äthylacetat (oder Chloroform)/sehr wenig Methanol/Cyclohexan umkristallisiert.

15a (Vorlauf): 49 mg rote Nadeln; Schmp. $239-246^\circ$ (Zers.); $[\alpha]_D^{20}$: $-321 \pm 10^\circ$ ($c = 0.1$ in Methanol). Zur Analyse wurde 15 Stdn. bei 115° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{62}H_{71}D_{15}N_{12}O_{16}$ (1270.6) Ber. C 58.60 H 8.01 N 13.23 Gef. C 58.84 H 7.34⁴³) N 13.19

⁵²) Während der Verseifung wurde **8h** — ebenso wie oben **8f** an C-2(Sar , $MeVal$) — an C-2(Thr , $MeVal$) zu ca. 30–50% deuteriert. **8j** verlor die gleiche Menge C-2($MeVal$)-Markierung.

13a (Zone III, schnell): 92 mg amorphes Pulver; Schmp. 207–215° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: $-195 \pm 5^\circ$ ($c = 0.24$ in Methanol). Zur Analyse wurde 12 Stdn. bei 90° i. Hochvak. getrocknet.
 $C_{62}H_{81}D_7N_{12}O_{17}$ (1280.5) Ber. C 58.15 H 7.47 N 13.13 Gef. C 57.90 H 7.22 N 13.05

12a (Zone II, langsam): 116 mg amorphes Pulver; Schmp. 204–213° (Zers.), $[\alpha]_D^{20}$: $-131 \pm 5^\circ$ ($c = 0.24$ in Methanol). Getrocknet wie **13a**.

$C_{62}H_{80}D_8N_{12}O_{17}$ (1281.5) Ber. C 58.10 H 7.54 N 13.12 Gef. C 57.50 H 7.39 N 13.22

14a (Zone I, Säulenkopf): 240 mg gelbrotes, amorphes Pulver; in allen Eigenschaften mit Actinomycin C₁-säure¹⁵⁾ identisch.

$\{2(Val_{\alpha\beta}, Pro_{\alpha\beta}), N\text{-Methyl}(MeVal_{\alpha\beta}), 8\text{-undecadeutero}\}$ actinomycin C₁ (**15b**), $\{2(Val_{\alpha}, Pro_{\alpha}), N\text{-Methyl}(MeVal_{\alpha}), 8\text{-hexadeutero}\}$ actinomycin C₁-säure-(α)-lacton (**12b**), $\{2(Val_{\beta}, Pro_{\beta}), N\text{-Methyl}(MeVal_{\beta}), 8\text{-pentadeutero}\}$ actinomycin C₁-säure-(β)-lacton (**13b**) und Actinomycin C₁-säure (**14a**): Das durch Hydrieren von 98 mg (0.13 mMol) **9b** und 300 mg (0.39 mMol) **11b** entstandene **10b/11a**-Gemisch gab nach oxydativer Kondensation [0.6 g Kaliumhexacyanoferrat(III)] und Aufarbeitung, wie bei **15a** angegeben (4 × 60 cm-Cellulosesäule, LS II), 15 mg kristallisiertes **15b** (Vorlauf), 40 mg **13b** (Zone III), 45 mg **12b** (Zone II) und 160 mg **14a** (Zone I).

15b: Rote, bei 239–244° schmelzende Nadeln, $[\alpha]_D^{20}$: $-315 \pm 10^\circ$ ($c = 0.1$ in Methanol); auch papierchromatographisch (LS IV) mit Actinomycin C₁ identisch. Zur Analyse wurde 12 Stdn. bei 115° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{62}H_{75}D_{11}N_{12}O_{16}$ (1266.6) Ber. C 58.80 H 7.72 N 13.28 Gef. C 58.99 H 7.27⁴³⁾ N 13.19

Die Lactonsäuren **13b** und **12b** wurden nach 6stdg. Trocknung bei 80° sogleich cyclisiert.

$\{2(Thr_{\alpha\beta}), 8\text{-Trideutero}\}$ actinomycin C₁ (**15c**), $\{2(Thr_{\alpha}), 8\text{-Dideutero}\}$ actinomycin C₁-säure-(α)-lacton (**12c**), $\{2(Thr_{\beta}), 8\text{-Deutero}\}$ actinomycin C₁-säure-(β)-lacton (**13c**) sowie Actinomycin C₁-säure (**14a**): 195 mg (0.26 mMol) **9c** und 520 mg (0.60 mMol) **11b-Benzylester** wurden, wie für **15a** erläutert, durch Hydrierung zum **10c/11a**-Gemisch und dessen oxydative Mischkondensation [1.0 g Kaliumhexacyanoferrat(III)] in **15c**, **13c**, **12c** und **14a** übergeführt (5 × 70-cm-Cellulosesäule, LS II).

15c (Vorlauf): 29 mg; rote Nadeln mit Schmp. 241–245° (Zers.) und $[\alpha]_D^{20}$: $-319 \pm 10^\circ$ ($c = 0.21$ in Methanol). Zur Analyse wurde 15 Stdn. bei 115° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{62}H_{83}D_3N_{12}O_{16}$ (1258.5) Ber. C 59.17 H 7.13 N 13.36 Gef. C 58.93 H 7.19 N 13.36

Die beiden Lactonsäuren **13c** (Zone III: 80 mg) und **12c** (Zone II: 93 mg) wurden nach 6stdg. Trocknen bei 80° i. Hochvak. sofort weitercyclisiert.

Zone I: 220 mg Actinomycin C₁-säure (**14a**).

$\{2.2(Sar_{\alpha\beta}), 8\text{-Pentadeutero}\}$ actinomycin C₁-säure (**14b**), $\{2.2(Sar_{\alpha}), 8\text{-Trideutero}\}$ actinomycin C₁-säure-(β)-lacton (**12e**), $\{2.2(Sar_{\beta}), 8\text{-Dideutero}\}$ actinomycin C₁-säure-(α)-lacton (**13e**) sowie Actinomycin C₁ (**18**): Das aus 85 mg (0.113 mMol) **11d**¹¹⁾ und 275 mg (0.36 mMol) **8h** durch Hydrierung erhaltene **11c/10f**-Gemisch wurde mit 0.6 g Kaliumhexacyanoferrat(III) oxydativ kondensiert und das Reaktionsgemisch wie üblich (4.5 × 80-cm-Cellulosesäule, LS II) aufgearbeitet.

14b (Zone I, Säulenkopf): 135 mg gelbrotes amorphes Pulver mit Schmp. 182–190° (Zers.) und $[\alpha]_D^{20}$: $-109 \pm 3^\circ$ ($c = 0.23$ in Methanol). Zur Analyse wurde 8 Stdn. bei 80° i. Hochvak. getrocknet.

$C_{62}H_{85}D_5N_{12}O_{18}$ (1296.5) Ber. C 57.43 H 7.39 N 12.97 Gef. C 57.61 H 7.13 N 12.86

Aus dem Vorlauf erhielt man 14 mg **18**.

Die Lactonsäuren **13e** (40 mg; Zone II) und **12e** (45 mg; Zone III) wurden nach 6stdg. Trocknen bei 80° i. Hochvak. ebenfalls gleich weitercyclisiert.

[*N*-Methyl(*Sar* _{α,β}), 8-heptadeutero]actinomycin C₁ (**15e**): Das durch Hydrieren von 63 mg **9e** erhaltene **10e** wurde mit 90 mg Kaliumhexacyanoferrat(III) wie oben bei pH 7.2 oxydiert und das rohe **15e** an einer 3.5 $\times$ 20-cm-Cellulosesäule (LS III) chromatographiert. Die herausgeschnittene Hauptzone eluierte man mit Methanol und Wasser, extrahierte das mit 0.2*n* NaHCO₃ verdünnte Eluat mit Chloroform und wusch den Extrakt mit *n* NaHCO₃, 0.1*n* HCl und Wasser. Der Eindampfrückstand gab nach 2fachem Umkristallisieren aus Äthylacetat/wenig Methanol/Cyclohexan 41 mg rote Nadeln, Schmp. 239–245° (Zers.); [α]_D²⁰: $-328 \pm 10^\circ$ (*c* = 0.21 in Methanol). Zur Analyse wurde 10 Stdn. bei 115° i. Hochvak. getrocknet.

C₆₂H₇₉D₇N₁₂O₁₆ (1262.5) Ber. C 58.98 H 7.42 N 13.32 Gef. C 58.87 H 7.10 N 13.21

[2(*Val* _{α}), *N*-Methyl(*Sar* _{α} , *MeVal* _{α}), 8-octadeutero]actinomycin C₁ (**16a**) und [2(*Val* _{β}), *N*-Methyl(*Sar* _{β} , *MeVal* _{β})-heptadeutero]actinomycin C₁ (**17a**): 105 mg **12a** und 80 mg **13a** wurden genau wie kürzlich¹⁸⁾ für aniso-Actinomycine beschrieben mit je 25 ccm Acetylchlorid/*N*-Acetyl-imidazol-Reagenzlösung cyclisiert und die Rohprodukte an zwei 2.5 $\times$ 25-cm-Cellulosesäulen (LS III, vgl. bei **15e**) chromatographiert. Zweimaliges Umkristallisieren aus Äthylacetat/sehr wenig Methanol/Cyclohexan gab 55 mg (52%) **16a** (aus **12a**) und 49 mg **17a** (60%) (aus **13a**) als rote, jeweils bei 241–245° (Zers.) schmelzende Nadeln. [α]_D²⁰: -328 bzw. $-322 \pm 10^\circ$ (*c* = 0.23/0.13 in Methanol). Zur Analyse wurde 15 Stdn. bei 115° i. Hochvak. getrocknet.

16a: C₆₂H₇₈D₈N₁₂O₁₆ (1263.5) Ber. C 58.93 H 7.50 N 13.31
Gef. C 58.71 H 7.31 N 13.26

17a: C₆₂H₇₉D₇N₁₂O₁₆ (1262.5) Ber. C 58.98 H 7.42 N 13.32
Gef. C 58.80 H 7.46 N 13.19

[2(*Val* _{α} , *Pro* _{α}), *N*-Methyl(*MeVal* _{α}), 8-hexadeutero]actinomycin C₁ (**16b**) und [2(*Val* _{β} , *Pro* _{β}), *N*-Methyl(*MeVal* _{β})-pentadeutero]actinomycin C₁ (**17b**): Durch Cyclisieren von 37 mg **12b** und 32 mg **13b** mit je 25 ccm Reagenzlösung und Aufarbeiten der Ansätze, wie für **16a**, **17a** erläutert, erhielt man 23 mg **16b**⁵³⁾ (aus **12b**) und 21 mg **17b**⁵³⁾ (aus **13b**). Zweimaliges Umkristallisieren wie oben gab rote Nadeln mit Schmp. 239–245° (Zers.) und [α]_D²⁰: -331 bzw. $-322 \pm 10^\circ$ (*c* = 0.26/0.20 in Methanol). 10 Stdn. wurde bei 115° i. Hochvak. getrocknet.

[2(*Thr* _{α}), 8-Dideutero]actinomycin C₁ (**16c**) und [2(*Thr* _{β})-Deutero]actinomycin C₁ (**17c**): 70 mg **12c** und 71 mg **13c** wurden wie **12a**, **13a** mit je 30 ccm Reagenzlösung cyclisiert und die Reaktionsprodukte — hier unter Verzicht auf die Chromatographie an Cellulosesäulen — entsprechend aufgearbeitet. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthylacetat/1 Tropfen Methanol/Cyclohexan erhielt man 43 mg **16c** (aus **12c**) und 36 mg **17c** (aus **13c**). Schmp. 241–246° (Zers.); [α]_D²⁰: -314 bzw. $-319 \pm 10^\circ$ (*c* = 0.10/0.12 in Methanol). Zur Analyse wurde 15 Stdn. bei 115° i. Hochvak. getrocknet.

16c: C₆₂H₈₄D₂N₁₂O₁₆ (1257.5) Ber. C 59.21 H 7.06 N 13.37
Gef. C 59.47 H 6.95 N 13.29

17c: C₆₂H₈₅DN₁₂O₁₆ (1256.5) Ber. C 59.26 H 6.98 N 13.38
Gef. C 59.16 H 6.99 N 13.18

⁵³⁾ Auf Verbrennungsanalysen wurde, da die übrigen Daten mit denen von Actinomycin C₁¹⁵⁾ übereinstimmten, in Anbetracht der kleinen Substanzmengen verzichtet.

[2.2(*Sar_α*),8-*Trideutero*]actinomycin *C*₁ (**16d**) und [2.2(*Sar_β*)-*Dideutero*]actinomycin *C*₁ (**17d**): 42 mg **12e** und 37 mg **13e** wurden wiederum mit je 25 ccm *Reagenzlösung* (90 Min. Reaktionszeit; vgl. **9c**) cyclisiert und die Eindampfrückstände der Reaktionsprodukte nach 10 Min. Erwärmen mit je 3 ccm Deuteriumoxid auf 40° wie **16a,17a** aufgearbeitet [2.5 × 20-cm-Cellulosesäulen (LS III)]. Zweimaliges Umkristallisieren aus Äthylacetat/1 Tropfen Methanol/Cyclohexan gab 19 mg **16d**⁵³⁾ (aus **12e**) und 20 mg **17d**⁵³⁾ (aus **13e**); rote Nadeln mit Schmp. 239–246° (Zers.) und $[\alpha]_D^{20}$: –320 bzw. –325 ± 10° (*c* = 0.10/0.08 in Methanol). Getrocknet wurde 12 Stdn. bei 115° i. Hochvak.

[264/71]