

Hans Brockmann und Helmut Lackner

Actinomycine, XXXI¹⁾; Synthesen von Actinomycinen und actinomycin-ähnlichen Chromopeptiden, V¹⁾

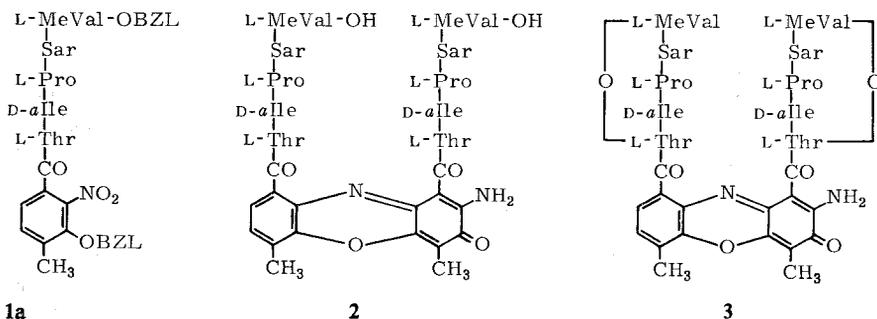
Aufbau von Actinomycinen über Actinomycinsäuren; ein zweiter Syntheseweg

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

(Eingegangen am 18. September 1967)

Elf Actinomycinsäuren, ein Actinocinyl-bis-pentapeptid und ein Actinocinyl-bis-hexapeptid werden synthetisiert. — Durch Cyclisierung synthet. Actinomycin C₁-säure (**12b**) und Actinomycin C₃-säure (**12a**) gelingt die erste Totalsynthese von Actinomycin C₁ (D) (**14a**) und die zweite von Actinomycin C₃ (**14b**). — Aus den entsprechenden Actinomycinsäuren werden drei in der Natur bisher nicht aufgefundene, antibiotisch wirksame Actinomycine (**14e**, **14f**, **14g**) dargestellt; ferner ein Gemisch aus Actinomycin C₂ (**14c**) und einem Isomeren **14d**, in dem D-Val und D-Alle vertauscht sind.

Von allen Wegen, die für die Synthese von Actinomycinen in Betracht kommen, von uns erprobt und kürzlich erörtert worden sind²⁾, erscheint der über die Actinomycinsäuren (z. B. **1a** → **2** → **3**) der nächstliegende. Denn bei der Darstellung von Actinomycinsäuren nach dem Vorbild der Actinocinyl-bis-aminosäure-Synthese^{3,4)} waren



1a

2

3

b: H statt BZL,
NH₂ statt NO₂

¹⁾ XXX. bzw. IV. Mitteil.: H. Brockmann und J. H. Manegold, Chem. Ber. 100, 3814 (1967).

²⁾ H. Brockmann und H. Lackner, Chem. Ber. 100, 353 (1967).

³⁾ H. Brockmann und H. Muxfeldt, Chem. Ber. 91, 1242 (1958).

⁴⁾ H. Brockmann, H. Lackner, R. Mecke, G. Troemel und H. S. Petras, Chem. Ber. 99, 717 (1966).

keine Komplikationen zu erwarten und für das Studium des zweifachen Ringschlusses, des schwierigsten Syntheseschrittes, konnten statt synthetischer Actinomycinsäuren „native“⁵⁾ verwendet werden.

Dennoch ist das erste synthetische Actinomycin über ein *Bis-seco*-actinomycin dargestellt worden²⁾, weil erst nach längeren Vorarbeiten⁶⁾ Actinomycine ohne Nebenreaktionen in guter Ausbeute zu Actinomycinsäuren abgebaut werden konnten¹⁾ und daher Material für Lactonisierungsversuche zunächst fehlte. Nachdem dann die Partialsynthese von Actinomycin C₁ (D) aus „nativer“ Actinomycin C₁-säure gelungen war^{1,7)}, wurden über die entsprechenden Actinomycinsäuren die Actinomycine C₁ (D)⁸⁾, C₂⁹⁾ und C₃¹⁰⁾ sowie Actinomycin-(L-Ser-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal)¹¹⁾, Didesmethyl-actinomycin C₁¹²⁾ und Actinomycin-(D-Thr-L-Val-D-Pro-Sar-D-MeVal)¹³⁾, der Antipode von Actinomycin C₁, synthetisiert.

Dem *Bis-seco*-actinomycin-Verfahren²⁾ gegenüber hatte der Weg über die Actinomycinsäuren den Vorteil, daß die nur unter rauen Bedingungen zu erreichende Veresterung des *N*-Methyl-L-valins mit dem Threoninhydroxyl entfällt und die Ausbeute beim Peptid-Ringschluß im Gegensatz zu den *Bis-seco*-actinomycinen statt 3–4%¹⁴⁾, 20–30% betrug.

Im folgenden berichten wir ausführlicher über die bisher nur kurz mitgeteilten Synthesen von Actinomycin C₁, C₂ und C₃ aus den zugehörigen Actinomycinsäuren sowie über drei neue, auf gleichem Wege synthetisierte Actinomycine.

Zur Nomenklatur der Actinomycinsäuren und Actinomycine

Für die Actinomycinsäuren verwenden wir die gleiche abgekürzte Bezeichnung wie für Actinomycine¹⁵⁾. Bei *iso*-Actinomycinen steht die Aminosäuresequenz der strukturgleichen Peptidringe mit Aminosäure [1]¹⁶⁾ beginnend in Klammern hinter Actinomycin; z. B. Actinomycin C₁ (D) (**14a**) = Actinomycin-(L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal).

Bei *aniso*-Actinomycinen (ungleiche Peptidringe) stehen die Aminosäuren gleicher Sequenzzahl, aber unterschiedlicher Struktur bzw. Konfiguration untereinander; oben die zum α -

⁵⁾ „nativ“ bedeutet bei Actinomycinsäuren aus nativen Actinomycinen dargestellt.

⁶⁾ G. Döring, Dissertat., Univ. Göttingen 1960.

⁷⁾ Vorläufige Mitteil.: H. Brockmann und J. H. Manegold, *Naturwissenschaften* **51**, 383 (1964); mit dem Buchstaben D wurde von L. C. Vining und S. A. Waksman [Science [Washington] **120**, 389 (1954)] ein nicht näher charakterisiertes Actinomycinpräparat bezeichnet, das im Papierchromatogramm nur die Zone des 1953 von H. Brockmann und H. Gröne [Naturwissenschaften **41**, 65 (1954)] chromatographisch einheitlichen und kristallisiert isolierten Actinomycins C₁ zeigte. Seitdem wird Actinomycin C₁ in den USA als Actinomycin D bezeichnet.

⁸⁾ Vorläufige Mitteil.: H. Brockmann und H. Lackner, *Naturwissenschaften* **51**, 384 (1964); Farbenfabriken Bayer AG (Erf. H. Brockmann, J. H. Manegold und H. Lackner), D. A. S. 1172680, C. 1965, 3924.

⁹⁾ Vorläufige Mitteil.: H. Brockmann und H. Lackner, *Tetrahedron Letters* [London] **1964**, 3517.

¹⁰⁾ Vorläufige Mitteil.: H. Brockmann und H. Lackner, *Naturwissenschaften* **51**, 407 (1964).

¹¹⁾ Vorläufige Mitteil.: H. Brockmann und H. Lackner, *Tetrahedron Letters* [London] **1964**, 3523.

¹²⁾ Vorläufige Mitteil.: H. Brockmann und F. Seela, *Tetrahedron Letters* [London] **1965**, 4803.

¹³⁾ Vorläufige Mitteil.: H. Brockmann und W. Schramm, *Tetrahedron Letters* [London] **1966**, 2331.

¹⁴⁾ Zur Verbesserung der Ausb. vgl. J. Ammann, Dissertat., Univ. Göttingen 1963.

¹⁵⁾ H. Brockmann, *Angew. Chem.* **72**, 939 (1960); *Fortschr. Chem. org. Naturstoffe* [Wien] **18**, 1 (1960).

¹⁶⁾ Ziffer in eckigen Klammern = Sequenzzahl; Bezifferung vom Chromophor ab.

Peptidring gehörende, unten die des β -Peptidringes; z. B. Actinomycin C₂ (**14c**) = Actinomycin-(L-Thr- $\frac{\text{D-Val}}{\text{D-alle}}$ -L-Pro-Sar-L-MeVal). Ist unbekannt, welchem Ring die beiden in Struktur bzw. Konfiguration verschiedenen Aminosäuren angehören, so steht der kleinere Rest oben und an Stelle des Trennungsstriches tritt eine eckige Klammer.

Dementsprechend ist Actinomycin C₁-säure (**12b**) = Actinomycinsäure-(L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal-OH) und Actinomycin C₂-säure (**12m**) = Actinomycinsäure-(L-Thr- $\frac{\text{D-Val}}{\text{D-alle}}$ -L-Pro-Sar-L-MeVal-OH). Die systematische Bezeichnung der Actinomycinsäuren (Versuchsteil) ist die gleiche wie bei kürzerkettigen *iso*- und *aniso*-Actinocinyl-bis-peptiden¹⁷⁾.

Synthetische Chromopeptide, die sich von nativen Actinomycinen in der Struktur der Peptidringe unterscheiden, bezeichnen wir nur dann als Actinomycine, wenn sich der Unterschied auf die Alkylreste der Peptidlactonringe beschränkt. Gleiches gilt für die Actinomycinsäuren.

Synthese von Actinomycinsäuren

Zur Synthese von Actinomycinsäuren sind alle von Actinocin oder Actinocinyl-bis-aminosäuren ausgehenden Wege ungeeignet, weil die beiden Actinocincarboxyle bzw. die mit ihnen verknüpften Aminosäuren oder Peptide wegen sterischer Hinderung nicht in gleichem Ausmaß kuppeln¹⁷⁾. Zu verfahren war demnach wie bei den schon bekannten Actinocinyl-bis-peptiden; z. B. zur Gewinnung von Actinomycin C₃-säure (**2**): 1. Synthese des *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-pentapeptid-benzylesters **1a**, 2. Hydrierung von **1a** zu **1b**, 3. Oxydative Kondensation von 2 Moll. **1b** zu **2**.

1a = **11a** (vgl. Blockschema) erhielten wir zu 53% aus *N*-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methylbenzoyl]-L-threonin (**10a**)⁴⁾, *D-allo*-Isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-L-valin-benzylester (**9a**) und Woodwards Reagenz¹⁸⁾; und **9a** aus Formyl-*D-allo*-isoleucyl-L-prolyl-sarkosin-benzylester (**6a**)²⁾ durch katalytische Hydrierung zu **7a**, Kupplung von **7a** mit *N*-Methyl-L-valin-benzylester und Dicyclohexylcarbodiimid zu **8a** und dessen Entformylierung mit Benzylalkohol. Chlorwasserstoff.

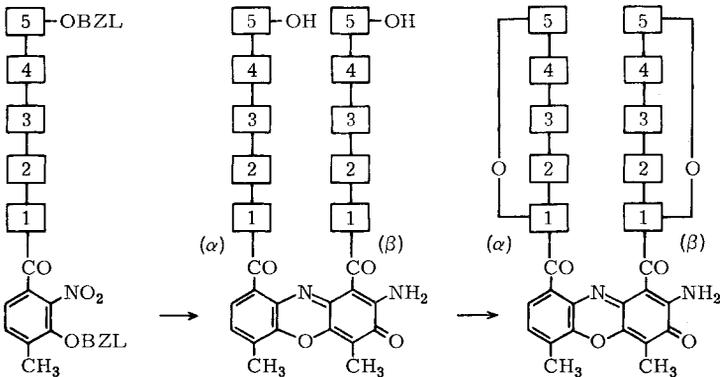
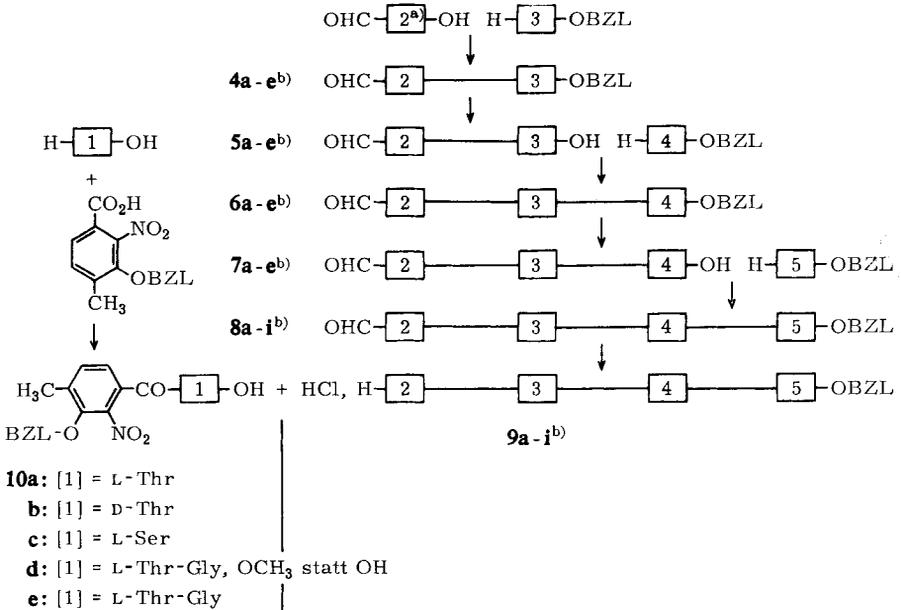
Katalytische Hydrierung von **11a** gab unter Abspaltung beider Schutzgruppen **11m**, das, weil luftempfindlich, *in situ* bei pH 7.2 mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxydiert wurde. Die aus dem Reaktionsprodukt zu 85% isolierte gelbrote, amorphe, chromatographisch einheitliche Verbindung war nach Analysenzahlen, R_F -Werten, Äquiv.-Gew., Aminosäuregehalt und den Daten in Tab. 2 Actinomycin C₃-säure (**12a** = **2**). Auf Formyl-*D-allo*-isoleucin bezogen, betrug die **12a**-Ausbeute 12%; d. h. die Synthese des letzten Actinomycin-Vorproduktes ist hier ergiebiger als beim *Bis-seco*-actinomycin-Verfahren (4.4%)²⁾.

Analog zu **12a** wurde ausgehend von Formyl-*D*-valin die Actinomycin C₁-säure (**12b**) (Tab. 2) aufgebaut, deren Lactonisierung das erste synthetische Actinomycin C₁ (**D**) (**14a**) geliefert hat⁸⁾. Die Zwischenstufen **4b**, **5b**, **6b**, **7b**, **8b**, **9b** und **11b** unterscheiden sich wenig von denen der **a**-Reihe. Das synthetische **12b** stimmte in seinen

¹⁷⁾ H. Brockmann, H. Lackner, R. Mecke, S. v. Grunelius, H.-S. Petras und H. D. Berndt, Chem. Ber. **99**, 3672 (1966).

¹⁸⁾ R. B. Woodward, R. F. Olofson und H. Mayer, J. Amer. chem. Soc. **83**, 1010 (1961).

charakteristischen Daten (Tab. 2) mit Actinomycin C₁-säure aus Actinomycin C₁ (D)^{1,7)} überein¹⁹⁾.



m-x: H statt BZL,
NH₂ statt NO₂

wie in **11a-1**

m: wie **12a**, jedoch D-Val anstatt D-alle in [2] und (α)

n: wie **12a**, jedoch D-Val anstatt D-alle in [2] und (β)

^{a)} Sequenzzahl¹⁶⁾.

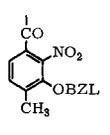
^{b)} Aminosäurekombinationen: vgl. Tab. 1.

^{c)} Vgl. Tab. 2.

^{d)} Nicht alle Actinomycinsäuren **12a-n** werden cyclisiert (vgl. Tab. 3).

¹⁹⁾ J. Meienhofer, [J. org. Chemistry **32**, 1143 (1967)] fand später für ein Actinomycin C₁-säure-Präparat, dessen Peptidteil auf einem anderen Weg synthetisiert war: $[\alpha]_D^{25}$: -117° (c = 0.2 in Methanol); $\epsilon_{445 \text{ m}\mu}$ 25200, $\epsilon_{237 \text{ m}\mu}$ 41300 (Methanol).

Tab. 1. Aminosäurekombinationen in den Peptiden (zum Blockschema)

		[1] ^{a)}				[2]			[3]	[4]	[5]									
		L-Thr	D-Ser	L-Thr	L-Gly	D-Ile	D-Val	L-Val	D-Leu	D-Ala	L-Pro	Sar	L-MeVal	DL-D-	L-Sar	L-Pro				
4a						+												-OBZL		
b							+													
c								+												
d									+											
e									+											
5a						+												-OH		
b							+													
c								+												
d									+											
e									+											
6a						+												-OBZL		
b							+													
c								+												
d									+											
e									+											
7a						+												-OH		
b							+													
c								+												
d									+											
e									+											
8a						+												-OBZL		
b							+													
c								+												
d									+											
e										+										
f											+									
g							+							+						
h								+									+			
i									+										+	
9a	HCl, H-					+												-OBZL		
b							+													
c								+												
d									+											
e										+										
f											+									
g							+							+						
h								+											+	
i									+											+
11a		+																-OBZL		
b						+														
c							+													
d								+												
e									+											
f										+										
g											+									
h												+								
i													+							
j																				
k																				
l																				

a) Sequenzzahl¹⁶⁾

Katalytische Hydrierung eines äquimolaren **11a/11b**-Gemisches und Kaliumhexacyanoferrat(III)-Oxydation des entstandenen **11m/11n**-Gemisches lieferte neben **12a** und **12b** eine dritte Actinomycinsäure, der Darstellung aus **11a** und **11b** und den Eigenschaften nach (Tab. 2) ein chromatographisch nicht trennbares Gemisch aus Actinomycin C₂-säure (**12m**) und deren Isomeren **12n**. Damit waren zum ersten Mal zwei *aniso*-Actinomycinsäuren synthetisiert.

Tab. 2. Synthetisierte Actinomycinsäuren 12

Actinomycinsäure-	Schmp. (Zers.)	$[\alpha]_D^{20}$ (c) in Methanol	ϵ_{\max} (m μ) in Methanol	Ausb. an Actinomycin nach Cyclisat.
-L-Thr-D-alle-L-Pro- Sar-L-MeVal-OH (12a)	180–195°	-128 \pm 3° (0.24)	26 900 (446) 25 800 (427) 42 500 (238)	16–20%
-L-Thr-D-Val-L-Pro- Sar-L-MeVal-OH (12b)	182–195°	-121 \pm 3° (0.27)	26 400 (445) 25 500 (427) 43 300 (238)	25–30%
-L-Thr-L-Val-L-Pro- Sar-L-MeVal-OH (12c)	182–188°	-191 \pm 4° (0.30)	26 800 (445) 25 800 (427) 39 000 (238)	—
-L-Thr-D-Leu-L-Pro- Sar-L-MeVal-OH (12d)	182–189°	-159 \pm 3° (0.26)	27 000 (445) 25 800 (427) 43 000 (238)	30%
-L-Thr-D-Ala-L-Pro- Sar-L-MeVal-OH (12e)	192–198°	-160 \pm 3° (0.29)	27 000 (445) 25 800 (427) 43 000 (238)	6–8%
-L-Thr-D-alle-L-Pro- Sar-DL-MeVal-OH (12f)	180–186°	-93 \pm 3° (0.31)	26 900 (445) 25 800 (427) 43 500 (238)	18%
-L-Thr-D-Val-L-Pro- Sar-D-MeVal-OH (12g)	182–188°	-46 \pm 2° (0.21)	26 400 (445) 25 300 (427) 42 000 (238)	26%
-L-Thr-D-Val-L-Pro- Sar-Sar-OH (12h)	180–188°	-86 \pm 2° (0.23)	27 100 (445) 26 100 (427) 39 700 (238)	—
-D-Thr-D-Val-L-Pro- Sar-L-MeVal-OH (12j)	181–190°	+43 \pm 2° (0.20)	27 000 (445) 26 000 (427) 42 600 (238)	—
-L-Ser-D-Val-L-Pro- Sar-L-MeVal-OH (12k)	195–200°	-222 \pm 4° (0.24)	26 600 (446) 25 500 (427) 46 900 (238)	4–5%
-L-Thr- $\begin{matrix} \text{D-Val} \\ \text{D-alle} \end{matrix}$ -L-Pro- Sar-L-MeVal-OH (12m)	181–189°	-131 \pm 3° (0.20)	26 400 (445) 25 300 (426) 41 700 (238)	20–25%
-L-Thr- $\begin{matrix} \text{D-alle} \\ \text{D-Val} \end{matrix}$ -L-Pro- Sar-L-MeVal-OH (12n)				
Actinocinyl-				
-L-Thr-D-Val-L-Pro- Sar-L-Pro-OH (12i)	196–201°	-123 \pm 3° (0.28)	26 900 (446) 25 800 (427) 42 200 (238)	—
-L-Thr-Gly-D-Val-L-Pro- Sar-L-MeVal-OH (12l)	180–188°	-74 \pm 2° (0.20)	25 900 (446) 24 900 (426) 41 100 (238)	—

Die Peptidketten der Actinomycinsäuren **12c**, **12d**, **12e**, **12f**, **12g**, **12h**, **12j**, **12k** sowie der Actinocinyl-bis-peptide **12i** und **12l** zeigen gegenüber Actinomycin C₁-säure (**12b**) dreierlei Abwandlungen: 1. Umgekehrte Konfiguration an zwei Aminosäuren gleicher Sequenzzahl (**12c**, **12f**, **12g**, **12j**). 2. Veränderte Struktur von zwei Aminosäuren gleicher Sequenzzahl (**12d**, **12e**, **12h**, **12i**, **12k**). 3. Verlängerung beider Peptidketten durch Einführung von Glycin zwischen Aminosäure [1] und [2] (**12l**).

Als Vorprodukte zur Synthese von **12c**–**12l** brauchte man **11c**–**11l**. Bei deren Darstellung war der eine Reaktionspartner die mit 2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure *N*-acylierte Aminosäure [1] der gewünschten Actinomycinsäure bzw. des Actinocinyl-bis-peptides, z. B. *D*-Threonin bei **10b**, *L*-Serin bei **10c**; ferner *L*-Threonyl-glycin bei **10e**, dargestellt durch Kupplung von **10a** mit Glycin-methylester (Woodwards Reagenz) und milde Alkalihydrolyse des entstandenen **10d**. Wie **10a** fielen **10b**, **10c**, **10d** und **10e** kristallisiert an.

Die Verknüpfung mit dem anderen Reaktionspartner, dem jeweiligen Tetrapeptid-benzylester (**9c**–**9i**), unter Verwendung von Woodwards-Reagenz gelang bei Estern mit β -verzweigter, *N*-terminaler Aminosäure zu 60%, bei den anderen zu 80%. Dicyclohexylcarbodiimid gab ähnliche Ausbeuten, die chromatographische Reinigung der Kupplungsprodukte war jedoch schwieriger.

11o–**11x**, durch Hydrierung aus **11c**–**11l** entstanden, lieferten, bei pH 7.2 mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxydiert, die amorphen, gelbroten Actinomycinsäuren bzw. Actinocinyl-bis-peptide **12c**–**12l** (Tab. 2); **12j** zu 53%, die übrigen zu 70–90%. **12h**, **12i** und **12e** sind in organischen Solvenzien weniger löslich als die anderen Actinomycinsäuren.

Von einem Maximum bei 427 $m\mu$ abgesehen, gleicht das Absorptionsspektrum (Methanol) der Actinomycinsäuren dem der Actinomycine (Abbild.). Die ϵ_{\max} -Werte liegen im Durchschnitt bei 26 800 (445), 25 800 (427) sowie 42 300 (238) und fallen nach Ringschluß der Peptidketten ab, Actinomycine: 25 000 (443) und 33 500 (240). Der ϵ -Wert des längstwelligsten Actinomycinsäure-Maximums gleicht erwartungsgemäß dem des *Bis-seco*-actinomycins **C**₃ [26 500 (446)] und der kürzerkettigen Actinocinyl-bis-peptide [26 500 (445)]. Bei Actinocinyl-bis-[*L*-threonin-methylester] [27 900 (444)] und Actinocinyl-bis-[glycin-methylester] [30 600 (444)] liegt er höher. Für Actinocin und dessen Methylester findet man 25 400 (448) bzw. 30 600 (433).

Die $[\alpha]_D^{20}$ -Werte der Actinomycine sind etwa 2.5 mal größer als die der zugehörigen Actinomycinsäuren.

Actinomycin C₁(D), C₂ und C₃ aus den synthetischen Actinomycinsäuren **12a**, **12b** und **12m/12n**

Bei den 16gliedrigen, zwei voluminöse Alkylreste und zwei *N*-Methyl-aminosäuren enthaltenden Peptidringen der Actinomycine mit nicht drehbarer Bindung zwischen N und C- α von Aminosäure [3]²⁰⁾ und — laut NMR-Spektrum²¹⁾ — Wasserstoffbrücke zwischen N und CO der Aminosäuren [2] und [4] kann die Zahl der erlaubten Konformationen nur sehr klein sein²²⁾. Daß Actinomycine ein viel ausgeprägteres NMR-Spektrum haben als Actinomycinsäuren, überrascht daher nicht. Die gleichen Faktoren, die für die Zahl der erlaubten Cyclopeptid-Konformationen maßgebend sind, bestimmen auch, in welchem Ausmaß die Peptidketten von Actinomycinsäuren Konformere bilden, in denen die Carboxygruppe mit dem um 14 Kettenglieder entfernten Hydroxyl der Aminosäure [1] reagieren kann.

²⁰⁾ Ausgenommen Actinomycin F₂ und F₄ sowie F₁ und F₃ mit Sar statt Pro in einem bzw. in beiden Peptidringen.

²¹⁾ H. Lackner, unveröffentlicht.

²²⁾ Für die aus acht Aminosäureresten bestehende Sequenz der Ribonuclease, die in der kleinsten durch Disulfidbrücke geschlossenen „Schleife“ vorliegt, sind 15 Konformationen erlaubt: G. Nemethy und H. A. Scheraga, *Biopolymers* 3, 155 (1965).

Außer einer derartigen Präformierung des Peptidringes erfordert die Cyclisierung einer Actinomycinsäure zum Actinomycin: 1. Aktivierung der Carboxygruppen in Gegenwart der zu veresternden Hydroxyle und 2. geringes Volumen der aktivierten Gruppe, damit sie mit dem durch Nachbargruppen abgeschirmten Threoninhydroxyl reagieren kann.

Beide Bedingungen hat bisher nur Acetylchlorid/*N*-Acetyl-imidazol (Molverhältnis 1.1–1.5) in Tetrahydrofuran befriedigend erfüllt. Mit diesem Reagenz (im folgenden AAI), dessen wirksame Komponente wahrscheinlich *N,N*-Diacetyl-imidazoliumchlorid ist, gelang — als erste Actinomycinpartialsynthese aus einer Actinomycinsäure — die Cyclisierung „nativer“ Actinomycin C₁-säure (**12b**) zu Actinomycin C₁ (**D**)^{1,7)}.

Zwischenprodukt ist offenbar ein „gemischtes Anhydrid“ aus Essigsäure und Actinomycinsäure. Mit der Cyclisierung können u. a. konkurrieren: 1. Acetylierung des Threoninhydroxyls, 2. Veresterung des *N*-Methyl-L-valinrestes mit dem Threoninhydroxyl der benachbarten Peptidkette oder dem eines anderen Actinomycinsäuremoleküls, 3. Umwandlung der Carboxyle in Azolidgruppen, die zu voluminös sind, um mit dem abgeschirmten Threoninhydroxyl zu reagieren, 4. Racemisierung der C-terminalen Aminosäure im „gemischten Anhydrid“.

Zu berücksichtigen ist ferner, daß das entstandene Actinomycin durch AAI verändert werden kann. Aus Actinomycin C₃ erhielten wir unter Cyclisierungsbedingungen zu 3–4% eine mit Äthylacetat nicht von Aluminiumoxid IV eluierbare Fraktion und in geringer Menge zwei an Cellulose abtrennbare Fraktionen, darunter eine mit λ_{\max} 482, 452 m μ (Methanol).

Unter gleichen Bedingungen wie „native“ Actinomycin C₁-säure haben wir unser synthetisches **12b** mit AAI umgesetzt und das an Aluminiumoxid adsorbierte Reaktionsprodukt durch Elution mit Äthylacetat, Aceton und Methanol in drei Fraktionen zerlegt. Das aus der Äthylacetatfraktion durch Chromatographie an Cellulose abgetrennte, zu 28% angefallene, kristallisierte Actinomycin C₁ (**D**) (**14a**) wurde durch Vergleich mit einem nativen Präparat identifiziert (Tab. 3). Damit war die durch Abbau ermittelte Konstitution von **14a**²³⁾ durch Synthese bestätigt.

Bei gleicher Umsetzung und Aufarbeitung lieferte **12a** zu 19% kristallisiertes, durch Vergleich mit einem nativen Präparat identifiziertes Actinomycin C₃ (**14b**), das bereits über *Bis-seco*-actinomycin C₃ synthetisiert worden war²⁾.

Die $[\alpha]_D$ -Werte der beiden synthetischen Actinomycine stimmen innerhalb der Fehlergrenze mit denen der nativen überein; bemerkenswert, weil bei einzelnen Syntheseschritten mit partieller Racemisierung zu rechnen ist (s. unten).

Aus dem Actinomycinsäuregemisch **12m/12n** erhielten wir zu 21% ein kristallisiertes Präparat mit den Eigenschaften von Actinomycin C₂ (**14c**)^{24,25)}; seiner Herkunft nach ein chromatographisch bisher nicht trennbares Gemisch aus Actinomycin C₂ (**14c**) und seinem Stellungsisomeren **14d**. Damit war zum ersten Mal ein *aniso*-Actinomycin-Paar synthetisiert.

²³⁾ H. Brockmann, P. Boldt und H.-S. Petras, *Naturwissenschaften* **47**, 62 (1960).

²⁴⁾ H. Brockmann und H.-S. Petras, *Naturwissenschaften* **48**, 218 (1961).

²⁵⁾ H. Brockmann und P. Boldt, *Naturwissenschaften* **50**, 19 (1963).

Zur Cyclisierung von 12c–12l

Ebenso wie **12a**, **12b** und **12m/12n** haben wir die acht Actinomycinsäuren **12c**, **12d**, **12e**, **12f**, **12g**, **12h**, **12j**, **12k**, Actinocinyl-bis-pentapeptid **12i** und Actinocinyl-bis-hexapeptid **12l** mit AAI umgesetzt und das Reaktionsprodukt chromatographisch in drei Fraktionen zerlegt. Da alle an Aluminiumoxid IV adsorbierten Actinomycine, sofern sie kein Oxoprolin oder Hydroxyprolin enthalten, mit Äthylacetat eluierbar sind, war sicher, daß auch die aus **12c**–**12l** zu erwartenden Actinomycine und actinomycinähnlichen Chromopeptide in der Äthylacetatfraktion des AAI-Produktes sind. Trotzdem wurden bei allen Ansätzen außer der Äthylacetatfraktion auch die Aceton- und Methanolfraction auf Hemmwirkung gegen *B. subtilis* geprüft. Antibiotisch wirksam waren nur die Äthylacetatfraktionen aus **12d**, **12e**, **12f**, **12g** und **12k**. Die daraus isolierten Actinomycine werden im nächsten Abschnitt beschrieben.

Um zu sehen, ob die biologische Inaktivität der anderen AAI-Produkte auf Ausbleiben der Cyclisierung oder darauf beruht, daß die entstandenen Actinomycine antibiotisch unwirksam sind, haben wir die Äthylacetatfraktion und bei einigen AAI-Produkten auch die Aceton- und Methanolfraction chromatographisch auf Komponenten hin untersucht, die in R_F -Wert, Absorptions- sowie IR-Spektrum den Actinomycinen gleichen, wie diese leicht kristallisieren und eine etwa 2.5mal größere spezif. Drehung zeigen als die zugehörige Actinomycinsäure; mit negativem Ergebnis, d. h. bei **12c**, **12h**, **12i**, **12j** und **12l** war zweifacher Ringschluß nicht oder nur in geringem Ausmaß gelungen.

Wie das Verhalten von **12c** und **12j** zeigt, ist die Cyclisierung von **12b** stereospezifisch und unterbleibt, wenn eines der Aminosäurepaare in [1]- oder [2]-Stellung umgekehrt konfiguriert ist. Dementsprechend erhielten wir aus einem Gemisch $[[\alpha]_D^{20} = -171 \pm 4^\circ$ ($c = 0.2$ in Methanol)] mit 10% **12b**, 50% **12c** und 40% der beiden übrigen Isomeren (D-Val in α -, L-Val in β -Peptidkette bzw. umgekehrt) in mehreren Ansätzen ausschließlich Actinomycin C₁ (D) (**14a**), und zwar dem **12b**-Gehalt des Gemisches entsprechend zu 2.5%.

Die neuen Actinomycine

12d — von Actinomycin C₃-säure (**12a**) in der Stellung der seitenständigen Methylgruppe von Aminosäure [2] unterschieden und deshalb um zwei Chiralitätszentren ärmer — gab ein AAI-Produkt, aus dessen Äthylacetatfraktion wir kristallisiertes Actinomycin-(L-Thr-D-Leu-L-Pro-Sar-L-MeVal) (**14e**) (Tab. 3) isolierten. Die Ausb. war mit 30% ebenso groß wie bei der Cyclisierung von **12b** zu Actinomycin C₁ (**14a**).

12d hat eine größere spezif. Drehung als **12a** (Tab. 2). Analog dazu ist der $[\alpha]_D$ -Wert des neuen Actinomycins erheblich höher als der von Actinomycin C₃ (**14b**) (Tab. 3). Im Ringchromatogramm (LS I) liegt die **14e**-Zone mit $R_{C_1} = 1.6$ zwischen der des Actinomycins C₃ (**14b**) ($R_{C_1} = 2.0$) und der Zone des Actinomycins C₂ (**14c**) ($R_{C_1} = 1.45$). Gemessen an der *B. subtilis* hemmenden Grenzkonzentration des Verdünnungstestes ist die antibiotische Wirksamkeit von **14e** etwa viermal kleiner als die von Actinomycin C₃.

Das aus **12k** nur zu 5% angefallene, kristallisierte Actinomycin-(L-Ser-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal) (**14g**)¹¹⁾ – wie **12k** durch relativ hohe spezif. Drehung ausgezeichnet – wandert im Ringchromatogramm (LS IV und V) langsamer als **14a** ($R_{C_1} = 0.6$). $\epsilon_{239, m\mu}$ (Methanol) liegt $\sim 10\%$ höher als bei den anderen Actinomycinen, nicht dagegen $\epsilon_{443, m\mu}$. Die antibiotische Wirksamkeit gegen *B. subtilis* ist fünfmal kleiner als die von Actinomycin C₃.

Tab. 3. Synthetisierte Actinomycine **14**

Actinomycin	Schmp. (Zers.)	$[\alpha]_D^{20}$ (c) in Methanol	ϵ_{max} in Methanol	R_{C_1} -Werte ^{a)}	Bakteriostat. ^{b)} Wirksamkeit
C ₃ (14b) aus 12a	239–241°	$-319 \pm 10^\circ$ (0.20)	25 300 (443) 34 100 (240)	1.9 ^{d)} 2.0 ^{e)}	1.0, 1.0 ^{c)}
aus 12f	239–242°	$-326 \pm 10^\circ$ (0.31)	24 700 (443) 33 400 (240)	2.0 ^{e)}	1.0
nativ	238–241°	$-321 \pm 10^\circ$ (0.20)	24 500 (443) 33 300 (240)	2.0 ^{e)}	1.0, 1.0 ^{c)}
C ₁ (14a) aus 12b	244–246°	$-328 \pm 10^\circ$ (0.15)	25 400 (443) 34 000 (240)	1.0 ^{e), g)}	1.2, 0.9 ^{c)}
aus 12b/12c	244–248°	$-318 \pm 10^\circ$ (0.16)	24 300 (443) 31 000 (240)	1.0 ^{e)}	1.9
aus 12g	243–247°	$-334 \pm 10^\circ$ (0.26)	24 500 (443) 33 000 (240)	1.0 ^{g)}	2.0
nativ	246–247°	$-328 \pm 10^\circ$ (0.22)	25 000 (443) 34 000 (241)	1.0	1.0, 1.0 ^{c)}
C ₂ (14c/14d) aus 12m/12n	244–246°	$-284 \pm 20^\circ$ (0.09) ⁱ⁾	24 100 (443) 31 000 (240)	1.4 ^{d)} 1.45 ^{e)}	1.0
nativ	244–246°	$-325 \pm 10^\circ$ (0.20)	25 300 (443) 33 400 (240)	1.4 ^{e)}	1.0
-(L-Thr-D-Leu-L-Pro-Sar-L-MeVal) (14e)	234–237°	$-449 \pm 15^\circ$ (0.30)	25 200 (443) 33 800 (240)	1.6 ^{e), d)}	0.25
-(L-Thr-D-Ala-L-Pro-Sar-L-MeVal) (14f)	240–246°	$-327 \pm 10^\circ$ (0.21)	22 500 (443) 32 200 (240)	0.22 ^{f)}	0.01
-(L-Ser-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal) (14g)	269–273°	$-435 \pm 15^\circ$ (0.25)	24 950 (450) 23 900 (430) 36 600 (239)	0.6 ^{g)} 0.6 ^{h)}	0.2
Krist. Cyclisierungs- produkt aus 12e	220–230°	$-91 \pm 3^\circ$ (0.25)	23 200 (447) 34 500 (238)	0.5 ^{f)}	–

a) In allen Lösungsmittelsystemen R_F -Wert von Actinomycin C₁ = 1.0.

b) Verdünnungstest gegen *B. subtilis*, bezogen auf Actinomycin C₃ = 1.0, dessen wirksame Grenzkonzentration je nach Wachstum des Stammes 1: 6–25 × 10⁶ betrug.

c) Gegen *Staph. aureus*.

d) LS III (vgl. Versuchsteil).

e) LS I.

f) LS VII.

g) LS V.

h) LS IV.

i) Sehr kleiner Ansatz. Actinomycin C₂ aus dem Cyclisierungsansatz eines Gemisches von Actinomycin C₁, C₂- und C₃-säure, $[\alpha]_D^{20}$: $-323 \pm 10^\circ$ (c = 0.23 in Methanol).

Das aus **12e** zu 6% entstandene Actinomycin-(L-Thr-D-Ala-L-Pro-Sar-L-MeVal) (**14f**) (Tab. 3) kristallisierte weniger leicht als die anderen Actinomycine, war gegen *B. subtilis* etwa hundertmal weniger wirksam als Actinomycin C₃ und lief im Ring-Papierchromatogramm (LS VII) erwartungsgemäß sehr langsam ($R_{C_1} = 0.22$). Dank

der kleineren Alkylreste löst es sich in Wasser leichter als **14a**. Neben **14f** erhielten wir aus **12e** ein kristallisiertes, biologisch unwirksames Cyclisierungsprodukt, das nach Analysenzahlen und spezif. Drehung kein Actinomycin ist.

12f, ein Gemisch aus vier an den *N*-Methyl-valinresten stereoisomeren Actinomycin- C_3 -säuren, wurde mit AAI umgesetzt, um zu sehen, ob sich die vier zu erwartenden stereoisomeren Actinomycine C_3 chromatographisch trennen lassen. Das war von Interesse, weil wir bei der Cyclisierung eines *Bis-seco*-actinomycin C_3 -Präparates mit weitgehend racemisierten *N*-Methyl-L-valinresten neben Actinomycin C_3 (**14b**) in ähnlicher Ausbeute ein von diesem chromatographisch trennbares, antibiotisch gleich wirksames, kristallisiertes Actinomycin mit um 100° kleinerer spezif. Drehung gefunden hatten und offen geblieben war, ob es einheitlich oder ein Gemisch an Aminosäure [5] stereoisomerer Actinomycine ist ²⁾.

Diese Frage hat sich jedoch durch Umsetzen des Stereoisomerengemisches **12f** mit AAI nicht beantworten lassen, weil die Cyclisierung hier stereospezifischer ist als bei den Aminosäure [5]-Stereoisomeren von *Bis-seco*-actinomycin C_3 . Denn sie unterbleibt praktisch, wenn Aminosäure [5] *D*-konfiguriert ist, erkenntlich daran, daß die Äthylacetatfraktion des AAI-Produktes von **12f** bei Chromatographie an Cellulose nur optisch reines Actinomycin C_3 (**14b**) (Tab. 3) liefert. Und zwar überraschend zu 18%, d. h. in fast gleicher Ausbeute wie bei der Cyclisierung von reinem **12a** (19%), während dem 25proz. **12a**-Gehalt des Isomerengemisches **12f** nach nur etwa 5% an **14b** anfallen sollten.

Die unerwartet hohe **14b**-Ausbeute ist nur verständlich, wenn man annimmt, daß 1. das aus dem **12a** des Stereoisomerengemisches **12f** vermutlich intermediär entstehende Essigsäure-**12a**-Anhydrid relativ rasch zu **14b** cyclisiert, 2. die gemischten Anhydride der übrigen drei **12f**-Stereoisomeren statt zu cyclisieren schneller an Aminosäure [5] racemisiert werden, so daß dabei entstandenes und laufend nachgeliefertes Essigsäure-**12a**-Anhydrid weiteres **14b** liefern kann, 3. bei der Umsetzung von AAI mit optisch reinem **12a** dank hoher Racemisierungsrate die Cyclisierung vorwiegend von einem Gemisch der vier an Aminosäure [5] stereoisomeren Essigsäureactinomycinsäure-anhydride ausgeht.

Trifft dies zu und ist die Racemisierung schneller als die Cyclisierung, so sollte aus einer Actinomycin C_3 -säure mit *N*-Methyl-*D*-valin als Aminosäure [5] ebensoviel Actinomycin C_3 (**14b**) entstehen wie aus Actinomycin C_3 -säure (**12a**). Zur Bestätigung verwendeten wir statt des Actinomycin C_3 -säure-Stereoisomeren das entsprechende Actinomycin C_1 -säure-Stereoisomere (**12g**) und erhielten dabei tatsächlich als einziges kristallisiertes Produkt zu 26% optisch reines Actinomycin C_1 (**14a**) (Tab. 3), d. h. in nahezu gleicher Ausbeute wie bei der Cyclisierung von **12b** (28%).

Zusammenfassend ergibt sich: Eine nicht „native“ Actinomycinsäure läßt sich mit AAI nur dann in nennenswerter Ausbeute zum Actinomycin cyclisieren, wenn 1. Unterschiede gegenüber „nativen“ Actinomycinsäuren auf den Alkylrest von Aminosäure [1], [2] oder [5]²⁶⁾ beschränkt sind und 2. die Peptidketten die natürliche Konfi-

²⁶⁾ Synthese von Actinomycin mit *N*-Methyl-L-alanin als Aminosäure [5]. W. Schramm, Dissertat., Univ. Göttingen 1967.

gurationssequenz LDLL oder deren Spiegelbild DLDD¹³⁾ haben. Eine zur Cyclisierung notwendige, den Ring präformierende Konformation der Peptidketten ist offenbar nur bei bestimmten Strukturen und konfigurativen Anordnungen der Alkylreste²⁷⁾ soweit begünstigt, daß bei der Umsetzung mit AAI die Cyclisierung mit den oben genannten Nebenreaktionen konkurrieren kann; d. h. durch Synthese über Actinomycinsäuren läßt sich der Peptidanteil der Actinomycine innerhalb engerer Grenzen abwandeln als der Chromophor^{12,28)}.

Diesem Nachteil steht der Vorteil gegenüber, daß bei stereospezifischer Cyclisierung²⁹⁾, die durch partielle Racemisierung als Nebenprodukte entstehenden Stereoisomeren der gesuchten Actinomycinsäuren vom letzten Syntheseschritt ausgeschlossen werden; eine Erklärung für die optische Reinheit unserer synthetischen Actinomycine C₁ und C₃.

Eine weitergehende Abwandlung der Peptidringe ist offenbar über die Bis-*seco*-actinomycine zu erreichen^{30, 31)}, weil hier der Ring durch eine leichter zu knüpfende Peptidbindung geschlossen wird und die daran beteiligten Gruppen beweglicher und weniger abgeschirmt sind.

Bei **12b** und **12d** ist der ca. 30proz. Actinomycinausbeute nach die Vororientierung der Peptidketten offenbar optimal. Erleichtert werden könnte sie hier wie bei anderen Actinomycinsäuren durch eine Wasserstoffbrücke zwischen N und CO von Aminosäure [2] bzw. [4].

Daß die Actinomycinausbeute bei **12e** viel geringer ist als bei **12b** und **12d**, könnte durch den kleineren Alkylrest von Aminosäure [2] bedingt sein, der die Beweglichkeit der Peptidkette erleichtert und dadurch ihre Vororientierung erschwert; und die nur 5proz. Ausbeute an Actinomycin-(L-Ser-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal) (**14g**) dadurch, daß das primäre Serinhydroxyl in **12k** weniger abgeschirmt ist als das sekundäre Threoninhydroxyl und seine Acetylierung daher stärker als bei **12b** oder **12d** mit der Cyclisierung konkurrieren kann.

Konstitution und biologische Wirksamkeit der Actinomycine

Actinomycine hemmen das Wachstum von Impftumoren³²⁾, können bei Lymphogranulomatose retardierend wirken³³⁾ und haben sich bei Wilms-Tumoren^{34,35)} und

27) Daß von den vier optisch aktiven Aminosäuren der Actinomycinpeptidringe Aminosäure [2] D-Konfiguration hat, ist vielleicht auch bei der Biogenese Voraussetzung für die zum Ringschluß erforderliche Peptidkonformation.

28) Ersatz der Chromophor-Methylgruppen durch Methoxyl- oder Äthylgruppen: *H. Brockmann* und *F. Seela*, unveröffentlicht.

29) Stereospezifische Cyclisierung, allerdings nicht so ausgeprägt wie bei den Actinomycinsäuren, wurde auch bei Hexapeptiden mit vier optisch aktiven Aminosäuren beobachtet: *H. Brockmann* und *K. Zellerhoff*, *Tetrahedron Letters* [London] **1965**, 2291.

30) Bildung eines stereoisomeren Actinomycins C₃, vgl. l. c. 2).

31) Ringerweiterung bei *seco*-Actinomycinen: *H. D. Berndt*, Dissertat., Univ. Göttingen 1961.

32) *Ch. Hackmann*, *Z. Krebsforsch.* **58**, 607 (1952); **60**, 250 (1954); *Strahlentherapie* **90**, 296 (1953); *Med. Klin.* **49**, 1539 (1954).

33) *G. Schulte*, *Z. Krebsforsch.* **58**, 500 (1952); *Strahlentherapie* **94**, 491 (1954).

34) *S. Farber*, *Cancer Chemother. Rep.* Nr. **13**, 159 (1961); *J. Medical Association* **198**, 826 (1966).

35) *C. T. C. Tan*, *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* **22**, 1015 (1962).

trophoblastischen Tumoren³⁶⁾ als therapeutisch brauchbar erwiesen. Seit die Konstitution der Actinomycine bekannt ist³⁷⁾, hat unser Arbeitskreis daher untersucht, ob sich krebswirksame Actinomycine, Actinomycinderivate oder actinomycinähnliche Chromopeptide gewinnen lassen, die weniger toxisch sind als die bisher untersuchten nativen Actinomycine.

Bemühungen, durch strukturelle Abwandlung des Actinomycin-Chromophors (Substitution in der Aminogruppe³⁸⁾, Bromierung³⁹⁾, Nitrierung, Hydroxylierung und Aminierung an C-7⁴⁰⁾, Ersatz der beiden Methylgruppen an C-4 und C-6 durch Wasserstoff¹²⁾, Äthyl oder Methoxyl²⁸⁾ zu cancerostatischen Derivaten mit günstigerem therapeutischem Index zu kommen, waren bisher erfolglos. An den drei neuen Actinomycinen **14e**, **14f** und **14g** sowie an den Actinomycinen bzw. actinomycinähnlichen Chromopeptiden, die wir aus **12c**, **12f**, **12g**, **12h**, **12i**, **12j** und **12l** zu gewinnen hofften, sollte geprüft werden, wie weit die biologische Wirksamkeit von der Struktur der Peptidringe abhängt.

Ob und wie man durch strukturelle Abwandlungen der Actinomycine zu Cancerostatica mit größerem therapeutischem Index kommen kann, ist klar geworden, seit man weiß, daß die Actinomycine mit Desoxyribonucleinsäuren (DNS) Komplexe bilden⁴¹⁾ und die dadurch bedingte Hemmung der DNS-abhängigen RNS-Synthese mit anschließender Hemmung der Proteinsynthese gemeinsame Ursache der anti-biotischen, cancerostatischen und toxischen Wirkung ist⁴²⁾.

W. Müller^{43,44)} hat bei Komplexierung verschiedener Desoxyribonucleinsäuren mit Actinomycinen, Actinomycinderivaten, strukturell abgewandelten Actinomycinen und Phenoxazonen gefunden, daß die Komplexstabilität der antibiotischen Wirksamkeit parallel geht, jedoch die Hemmung der DNS-abhängigen RNS-Synthese und damit die antibiotische bzw. cancerostatische Wirksamkeit nicht allein von der Stabilität des DNS-Komplexes, sondern entscheidend auch von dessen Lebensdauer abhängt. Er hat ein Kalottenmodell des Komplexes entwickelt, das alle bisher gefundenen Beziehungen zwischen Actinomycinstruktur und Stabilität bzw. Lebensdauer des Komplexes befriedigend deutet und verständlich macht, daß bereits geringfügige Abwandlungen am Chromophor oder Peptidteil der Actinomycine die biologische Wirksamkeit verändern oder aufheben. Zugleich läßt es die Grenzen erkennen, innerhalb derer Strukturabwandlungen ohne Verlust der biologischen Wirksamkeit möglich sein sollten und erlaubt damit Voraussagen über Stabilität und Lebensdauer von DNS-Komplexen neuer strukturvarianter Actinomycine.

36) *G. J. Ross, L. L. Stolbach und R. Hertz*, *Cancer Res.* **22**, 1015 (1962).

37) *H. Brockmann, G. Bohnsack, B. Franck, H. Gröne, H. Muxfeldt und C. Süling*, *Naturwissenschaften* **68**, 70 (1956).

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

39) *H. Brockmann, J. Ammann und W. Müller*, *Tetrahedron Letters* [London] **1966**, 3595.

40) *H. Brockmann, W. Müller und H. Peterssen-Borstel*, *Tetrahedron Letters* [London] **1966**, 3531.

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

42) *E. Harbers und W. Müller*, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **7**, 107 (1962).

43) *W. Müller*, Habilitationsschrift, Univ. Göttingen 1967.

44) *W. Müller und D. M. Crothers*, *J. Mol. Biol.* **1968**, im Druck.

Damit wird das Problem Konstitution und antibiotische Wirksamkeit bei Actinomycinen, Actinomycinderivaten und actinomycinähnlichen Chromopeptiden zur Frage, wie Stabilitätskonstante und Lebensdauer ihres DNS-Komplexes von der Struktur des Chromophors sowie der Konstitution und Konfiguration der beiden Peptidringe abhängen⁴⁵⁾. Und den therapeutischen Index der Krebswirksamkeit erhöhen, bedeutet nunmehr, die Beladung der aktiven DNS⁴⁶⁾ der Tumorzelle gegenüber der in der Normalzelle größer werden zu lassen als bei Applikation nativer Actinomycine.

Dafür gibt es folgende Möglichkeiten: 1. Synthese strukturell abgewandelter und dennoch carcinostatisch wirksamer Actinomycine, die selektiver in den Tumor gehen als native Actinomycine. 2. Darstellung biologisch inaktiver Actinomycinderivate, die in der Tumorzelle enzymatisch in Actinomycine übergeführt werden, wobei Selektivität durch bevorzugte Aufnahme in den Tumor oder (und) schnellere enzymatische Spaltung bedingt sein müßte. 3. Darstellung biologisch inaktiver Actinomycinderivate, die bei Belichtung in Actinomycine übergehen³⁸⁾ und dadurch bei lichtzugänglichen Tumoren selektiv zur Wirkung gebracht werden.

Frau M. Köppler sind wir für unermüdlige und geschickte Mitarbeit zu Dank verpflichtet.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und den Farbenfabriken Bayer AG, Werk Elberfeld, danken wir für die Förderung unserer Arbeit.

Beschreibung der Versuche⁴⁷⁾

Lösungsmittelsysteme für die Chromatographie^{a)}: LS I: Butanol/Dibutyläther/10proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat^{b)} (2 : 3 : 5). — LS II: (1 : 1 : 2). — LS III: (3 : 7 : 10). — LS IV: (5 : 6 : 11).

LS V: Butylacetat/10proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat (1 : 1).

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

LS VII: Butanol/Butylacetat/Dibutyläther/10proz. wäbr. Natrium-*m*-kresotinat (1 : 6 : 1 : 8).

LS VIII: (1 : 5 : 2 : 8).

^{a)} Cellulosepulver (Nr. 123) und Chromatographiepapier (2043 b) von Fa. Schleicher & Schüll, Dassel.

^{b)} Alle Kresotinatlösungen mit *m*-Kresotinsäure gesättigt.

A. Allgemeines Verfahren zur Darstellung der Actinomycinsäure und Actinomycine

Formyl-dipeptid-benzylester (4a–4e): Zu 25 mMol *Formylaminosäure* und 25 mMol *Aminosäure-benzylester-hydrochlorid* in 80 ccm Methylenchlorid gab man 25 mMol *Triäthylamin* sowie bei 0° 26.5 mMol *Dicyclohexylcarbodiimid* in wenig Methylenchlorid und rührte 2 Stdn. bei 0° sowie 12 Stdn. bei 20°. Nach Abfiltrieren des Dicyclohexylharnstoffs wurde mit *n* HCl, *n* NaHCO₃ und Wasser gewaschen, der i. Vak. erhaltene Eindampfrückstand in wenig Aceton gelöst und 1 Stde. später bei 0° restlicher Dicyclohexylharnstoff entfernt. Nach Wegdampfen des Acetons kristallisierten **4a–4e** — wenn nicht anders vermerkt — aus Äthylacetat/Petroläther als farblose Kristalle. Ausb. 70–80% (**4c** 50%). Einmal umkristallisiert.

Formyl-dipeptide (5a–5e): 20 mMol **4a–4e** in 100 ccm Methanol wurden mit Pd/A-Kohle aushydriert und das nach Filtrieren und Eindampfen i. Vak. hinterbliebene **5a–5e**, wenn nötig, in wenig Aceton vorgelöst, aus Äthylacetat/Petroläther kristallisiert und einmal umkristallisiert. Ausb. 90–95% (**5c** 70%).

⁴⁵⁾ Vorausgesetzt, etwaige Permeabilitätsunterschiede sind zu vernachlässigen.

⁴⁶⁾ Beladung bedeutet hier Komplex mit Actinomycin oder actinomycinähnlichem Chromopeptid von hinreichender Stabilität und Lebensdauer.

⁴⁷⁾ Schmp. wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind korrigiert.

Formyl-tripeptid-benzylester (6a–6e): Zu 15 mMol **5a–5e** und 15 mMol *Aminosäure-benzylester-hydrochlorid* in 60 ccm Methylenchlorid gab man 15 mMol *Triäthylamin* und bei 0° 16 mMol in wenig Methylenchlorid gelöstes *Dicyclohexylcarbodiimid*. Weitere Behandlung wie bei **4a–4e**. Der nicht kristallisierende Eindampfrückstand der Acetonlösung wurde – wenn unten nicht anders vermerkt – an einer mit Benzol eingeschlammten 2.5 × 20 cm-Säule aus saurem Kieselgel⁴⁸⁾ chromatographiert. Nebenprodukte ließen sich durch Nachwaschen mit Benzol oder Benzol/Chloroform (9:1) entfernen. Chloroform (oder Äthylacetat) eluierte **6a–6e**, nach Waschen mit Wasser, Filtrieren und Verdampfen des Lösungsmittels farblose Harze. Ausb. 55–70%.

Formyl-tripeptide (7a–7e): 5proz. methanol. Lösungen von **6a–6e** wurden mit Pd/A-Kohle aushydriert. Nach Entfernen von Katalysator und Lösungsmittel (i. Vak.) hinterblieben **7a–7e** in prakt. quantitat. Ausb. als farblose, z. T. aus Äthylacetat kristallisierbare Pulver.

Formyl-tetrapeptid-benzylester (8a–8i): 9 mMol **7a–7e** und 9 mMol *Aminosäure-benzylester-hydrochlorid* in 60 ccm Methylenchlorid versetzte man mit 9 mMol *Triäthylamin* und bei 0° mit 9.5 mMol *Dicyclohexylcarbodiimid* in wenig Methylenchlorid. Weitere Behandlung wie bei **4a–4e**. – Der Eindampfrückstand der Acetonlösung wurde, wenn nicht anders angegeben, an einer mit Benzol/Chloroform (z. B. 4:1) eingeschlammten 2.5 × 20 cm-Säule aus saurem Kieselgel chromatographiert. Nachwaschen mit demselben Benzol/Chloroform-Gemisch entfernte Nebenprodukte, mit Chloroform (oder Äthylacetat) gelangten **8a–8i** ins Filtrat; nach Waschen mit Wasser, Filtrieren und Verdampfen der Lösungsmittel weiße, amorphe Pulver. Ausb. 50–80%.

Tetrapeptid-benzylester-hydrochloride (9a–9i): Zur Entformylierung versetzte man 8 mMol **8a–8i** in 10–12 ccm Benzylalkohol mit 0.6 g *HCl* in 6 ccm Benzylalkohol, hielt 28 Stdn. bei 37° und verteilte anschließend über 3 Stufen zwischen Äther (oder Äthylacetat) und Wasser. Die filtrierten, wäbr. Peptidlösungen wurden bei 40° i. Vak. eingedampft und die schaumigen Rückstände (**9a–9i**) nach mehrmaligem Abdampfen mit Wasser und Aceton i. Vak. über KOH getrocknet. Ausb. ca. 90%.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-aminosäuren (10a^d, 10b sowie 10c): 21 mMol *2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoessäure* wurden mit 20 ccm *Thionylchlorid* 10 Min. unter Rückfluß gekocht und der über KOH getrocknete Verdampfungsrückstand (i. Vak.) in 30 ccm Benzol gelöst. Nach Zugabe von 30 ccm Äther versetzte man bei 0° mit 21 mMol *Aminosäure* in 42 ccm 0.5*n* *NaOH*, tropfte unter Rühren (*Vibromischer*) innerhalb 30 Min. 21 ccm *n* *NaOH* ein und rührte, gegebenenfalls unter Neutralisation mit weiterer *n* *NaOH*, noch 3 Stdn. bei 0°. Die abgetrennten, mit Äthylacetat gewaschenen und dann mit 2*n* *HCl* angesäuerten wäbr. Phasen wurden mit Äthylacetat extrahiert und die mit Wasser gewaschenen Extrakte i. Vak. eingedampft. **10a**, **10b**, **10c** kristallisierten aus Aceton/Benzol/Cyclohexan. Ausb. 50–90%. Zur Analyse wurde umkristallisiert.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-penta (bzw. hexa)-peptid-benzylester (11a–11i): Eine Lösung von 2.7 mMol **10a**, **10b**, **10c** oder **10e** und 2.7 mMol *Triäthylamin* in 10 ccm Nitromethan wurde bei 20° 7 Min. mit 2.7 mMol zerriebenem *N-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3')*¹⁸⁾ gerührt, sodann mit 2.7 mMol in 15 ccm Nitromethan mit *Triäthylamin* neutralisiertem **9a–9i** versetzt und weitere 12 Stdn. bei 20° gerührt. Die bei 40° i. Vak. erhaltenen, in Chloroform gelösten und mit *n* *HCl* und Wasser gewaschenen Eindampfrückstände chromatographierte man aus Benzol an 2 × 15 cm-Aluminiumoxid-II-säulen, wobei Benzol einen Vorlauf abtrennte. Die mit Chloroform (oder Äthylacetat) eluierten Hauptfraktionen ergaben nach Waschen mit Wasser, Filtrieren und Verdampfen der Lösungsmittel **11a–11i** als gelbliche Pulver. Ausb. 50–85%.

⁴⁸⁾ Neutrales Kieselgel (Fa. Gebrüder Herrmann, Köln) in 0.1*n* *HCl* aufgeschlammmt, abgesaugt und bei 110° bis zur Fließfähigkeit getrocknet.

Actinomycinsäuren (12a–12n): Lösungen von 1.5 mMol **11a–111** in 40 ccm Methanol wurden mit Pd/A-Kohle (5% Pd) aushydriert (5 Mol H_2) und nach Filtrieren sowie Einengen auf 20 ccm mit 40 ccm 0.07 *m* Phosphatpuffer, pH 7.2, versetzt. Unter Rühren gab man portionsweise 1.5 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* in 10 ccm Puffer hinzu, hielt dabei mit *n* NaOH stets bei pH 7.2 und rührte weitere 12 Stdn. bei 20°. Die mit viel Wasser verdünnten und mit 2*n* HCl angesäuerten Reaktionslösungen wurden mit Chloroform/Butanol (2:1) extrahiert, die Extrakte zweimal mit angesäuertem (HCl) Wasser gewaschen, i. Vak. eingedampft und die Rückstände an 4 × 50 cm-Cellulosesäulen (LS VI) chromatographiert. Nach Zerschneiden der Säulen eluierte man die langsam wandernden Hauptfraktionen mit Methanol und Wasser, entzog sie den mit Wasser verdünnten, angesäuerten Eluaten mit Chloroform/Butanol (2:1) und adsorbierte die Eindampfrückstände der organischen Phasen aus Chloroform an 2 × 15 cm-Säulen aus saurem Kieselgel. Nachwaschen mit Chloroform und Chloroform/Aceton (4:1) entfernte die Kresotinsäure; Methanol und Wasser eluierten die *Actinomycinsäuren*, die den eingeengten, mit Wasser verdünnten, angesäuerten Eluaten mit Chloroform entzogen wurden und nach Waschen mit Wasser, Filtrieren und Verdampfen der Lösungsmittel als rote Lacke hinterblieben. Durch Lösen in sehr wenig Methanol und Zugabe von 60–80 ccm Äthylacetat erhielt man bei langsamem (40°) Einengen **12a–12n** als gelbrote Pulver. Zur Analyse auf gleiche Weise umgefällt. Zusatz von Petroläther fällte die Reste aus den Mutterlaugen. Ausb. 53–90%.

Cyclisierung von Actinomycinsäuren zu Actinomycinen (14a–14g): Zu 24.5 g *Imidazol* („Fluka“, reinst) in 300 ccm wasserfreiem Tetrahydrofuran gab man unter Rühren bei 20° 12.8 ccm *Acetylchlorid*, rührte 1 Stde. bei 55° und saugte rasch vom weißen Niederschlag ab. Das warme Filtrat wurde unter Rühren mit weiteren 19.2 ccm *Acetylchlorid* versetzt, noch 1 Stde. bei 55° gerührt und anschließend vom hellgelben Niederschlag in einen auf 60° vorgewärmten Meßzylinder dekantiert.

Eine Mischung aus 170 ccm der warmen *Reagenzlösung* und 0.36 mMol in 30 ccm warmem absol. Tetrahydrofuran gelöster *Actinomycinsäure* hielt man 2 Stdn. bei 55°, dampfte i. Vak. ein und wusch den in Chloroform aufgenommenen Rückstand mit *n* HCl, Wasser und gegebenenfalls *n* NaHCO₃. Nach Verdampfen des Chloroforms wurde das Rohprodukt aus Benzol an einer 2 × 8 cm-Aluminiumoxid-IV-säule adsorbiert, mit Benzol gewaschen und durch Elution mit Äthylacetat, Aceton und Methanol in drei Fraktionen zerlegt. Den das Actinomycin enthaltenden Eindampfrückstand der Äthylacetatfraktion chromatographierte man an einer 4 × 60 cm-Cellulosesäule (LS VI) und eluierte die Hauptzone mit dem R_F -Wert des betreffenden Actinomycins nach Zerschneiden der Säule mit Methanol und Wasser. Der Chloroformextrakt des mit viel 0.2*n* NaHCO₃ verdünnten Eluates wurde mit *n* NaHCO₃, *n* HCl und Wasser gewaschen, filtriert und i. Vak. eingedampft. Das zurückbleibende, rote *Actinomycin (14a–14g)* kristallisierte meist aus Äthylacetat/Cyclohexan (geringer Methanolzusatz). Zur Analyse wurde zweimal umkristallisiert. Ausb. in Teil B.

Weitere, nicht kristallisierende Zonen der Cellulosesäule wurden ähnlich aufgearbeitet und die Eindampfrückstände der Chloroformlösungen, ebenso wie die der Aceton- und Methanolfraktionen von der Aluminiumoxidsäule, auf bakteriostatische Wirksamkeit geprüft.

B. Spezielle Angaben

4a–6a s. l. c.²⁾

Formyl-D-valyl-L-prolin-benzylester (4b): 3.65 g *Formyl-D-valin*, 6.1 g *L-Prolin-benzylesterhydrochlorid*, 3.45 ccm *Triäthylamin* und 4.5 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (DCC) in 80 ccm Me-

thylenchlorid gaben zu 68% **4b**, farblose Kristalle mit Schmp. 110°, $[\alpha]_D^{20}$: $+10 \pm 0.3^\circ$ ($c = 4.2$ in absol. Äthanol).

$C_{18}H_{24}N_2O_4$ (332.4) Ber. C 65.04 H 7.28 N 8.43 Gef. *) C 65.26 H 7.53 N 8.62

*) Getrocknet 6 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

Formyl-L-valyl-L-prolin-benzylester (4c): Aus 5.8 g *Formyl-L-valin*, 9.65 g *L-Prolin-benzylester-hydrochlorid*, 5.52 ccm *Triäthylamin* und 8.65 g *DCC* in 120 ccm Methylenchlorid erhielt man nach Chromatographie des nicht kristallisierenden Rohproduktes aus Benzol an einer 4×30 cm-Säule aus saurem Kieselgel (Benzol eluierte Nebenprodukte, Chloroform die Hauptmenge) zu 50% harziges **4c**. $[\alpha]_D^{25}$: $-98 \pm 3^\circ$ ($c = 2.2$ in absol. Äthanol).

$C_{18}H_{24}N_2O_4$ (332.4) Ber. C 65.04 H 7.28 N 8.43 Gef. *) C 64.39 H 7.33 N 8.51

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 100° i. Hochvak.

Formyl-D-leucyl-L-prolin-benzylester (4d): 5.92 g *Formyl-D-leucin*, 8.95 g *L-Prolin-benzylester-hydrochlorid*, 5.13 ccm *Triäthylamin* und 8.1 g *DCC* in 120 ccm Methylenchlorid gaben nach Chromatographie des amorphen Rohproduktes aus Benzol an einer 4×30 cm-Säule aus saurem Kieselgel (Chloroform eluierte den Rest der Hauptfraktion) zu 80% amorphes, gleich weiterverarbeitetes **4d**. Zur Analyse wurden 3 g nochmals an einer 3×30 cm-Säule gereinigt, wobei Benzol einen Vorlauf und Chloroform die Hauptfraktion eluierte; nach Waschen mit Wasser, Filtrieren und Eindampfen farbloses Harz. $[\alpha]_D^{20}$: $-13.5 \pm 0.5^\circ$ ($c = 0.9$ in Methanol).

$C_{19}H_{26}N_2O_4$ (346.4) Ber. C 65.87 H 7.57 N 8.09 Gef. *) C 65.56 H 7.64 N 8.26

*) Getrocknet 10 Stdn. bei 70° i. Hochvak.

Formyl-D-alanyl-L-prolin-benzylester (4e): 3.74 g *Formyl-D-alanin* ($[\alpha]_D^{20}$: $+34.5 \pm 1^\circ$ ($c = 1.5$ in absol. Äthanol)), 7.66 g *L-Prolin-benzylester-hydrochlorid*, 4.39 ccm *Triäthylamin* und 6.9 g *DCC* in 80 ccm Methylenchlorid gaben zu 80% **4e**. Farblose Kristalle mit Schmp. 54°, $[\alpha]_D^{20}$: $-5.8 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1.0$ in Methanol).

$C_{16}H_{20}N_2O_4$ (304.3) Ber. C 63.16 H 6.63 N 9.21 Gef. *) C 63.20 H 6.81 N 9.03

*) Getrocknet 10 Stdn. bei 70° i. Hochvak.

Formyl-D-valyl-L-prolin (5b): Aus 5.3 g **4b** in 50 ccm Methanol erhielt man 95% **5b**. Farblose Kristalle mit Schmp. 77–80°, $[\alpha]_D^{25}$: $+18 \pm 0.5^\circ$ ($c = 4.1$ in absol. Äthanol).

$C_{11}H_{18}N_2O_4$ (242.3) Ber. C 54.53 H 7.49 N 11.56

Gef. *) C 54.94 H 7.79 N 11.63 Mol.-Gew. 244 **)

*) Getrocknet 6 Stdn. bei 70° i. Hochvak.

**) Potentiometrische Titration mit 0.1*n* NaOH in Methanol/Wasser (1:1).

Formyl-L-valyl-L-prolin (5c): 6.7 g **4c** in 70 ccm Methanol gaben zu 70% **5c**. Aus Aceton oder Aceton/Äthylacetat/Cyclohexan farblose Kristalle mit Schmp. 156–159°, $[\alpha]_D^{25}$: $-121 \pm 3^\circ$ ($c = 1.6$ in absol. Äthanol).

$C_{11}H_{18}N_2O_4$ (242.3) Ber. C 54.53 H 7.49 N 11.56

Gef. *) C 54.93 H 7.69 N 11.70 Mol.-Gew. 243 **)

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

**) Potentiometrische Titration mit 0.1*n* NaOH in Methanol/Wasser (1:1).

Formyl-D-leucyl-L-prolin (5d): 11 g **4d** in 100 ccm Methanol lieferten nach Hydrierung zu 96% **5d**. Farblose Kristalle mit Schmp. 115–123°, $[\alpha]_D^{20}$: $-45 \pm 1.5^\circ$ ($c = 0.9$ in Methanol).

$C_{12}H_{20}N_2O_4$ (256.3) Ber. C 56.25 H 7.87 N 10.92 Gef. *) C 56.89 H 8.18 N 10.60

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

Formyl-D-alanyl-L-prolin (5e): Aus 7.5 g **4e** in 80 ccm Methanol entstanden zu 90% **5e**. Farblose Kristalle mit Schmp. 57°, $[\alpha]_D^{20}$: $-25 \pm 1^\circ$ ($c = 0.9$ in Methanol).

$C_9H_{14}N_2O_4$ (214.2) Ber. C 50.47 H 6.59 N 13.08 Gef.*) C 49.85 H 6.38 N 12.97

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

Formyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin-benzylester (6b): Aus 3.7 g **5b**, 3.4 g *Sarkosin-benzylesterhydrochlorid*, 2.15 ccm *Triäthylamin* und 3.4 g *DCC* in 75 ccm Methylenchlorid erhielt man nach Chromatographie an saurem Kieselgel (das Benzol in diesem Fall 10% Chloroform enthaltend) zu 65% amorphes **6b**. $[\alpha]_D^{20}$: $-18 \pm 1^\circ$ ($c = 3.6$ in absol. Äthanol).

$C_{21}H_{29}N_3O_5$ (403.5) Ber. C 62.52 H 7.25 N 10.42 Gef.*) C 62.70 H 7.49 N 10.32

Ber. Mol Val 1.00 Pro 1.00 Sar 1.00

Gef.⁴⁹⁾ Mol Val 0.98 Pro 0.99 Sar 0.94

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

Formyl-L-valyl-L-prolyl-sarkosin-benzylester (6c): Aus 4.52 g **5c**, 4.03 g *Sarkosin-benzylesterhydrochlorid*, 2.57 ccm *Triäthylamin* und 4.0 g *DCC* in 80 ccm Methylenchlorid erhielt man nach Chromatographie an saurem Kieselgel wie bei **6b** zu 70% amorphes **6c**. $[\alpha]_D^{21}$: $-120 \pm 3^\circ$ ($c = 1.9$ in absol. Äthanol).

$C_{21}H_{29}N_3O_5$ (403.5) Ber. C 62.52 H 7.25 N 10.42 Gef.*) C 63.16 H 7.56 N 10.49

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

Formyl-D-leucyl-L-prolyl-sarkosin-benzylester (6d): 5.0 g **5d**, 4.2 g *Sarkosin-benzylesterhydrochlorid*, 2.72 ccm *Triäthylamin* und 4.3 g *DCC* in 80 ccm Methylenchlorid gaben nach Chromatographie an saurem Kieselgel (Säule 4×25 cm) zu 55% amorphes **6d**. $[\alpha]_D^{20}$: $-45 \pm 1^\circ$ ($c = 1.5$ in Methanol).

$C_{22}H_{31}N_3O_5$ (417.5) Ber. C 63.27 H 7.48 N 10.07 Gef.*) C 63.12 H 7.49 N 10.05

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

Formyl-D-alanyl-L-prolyl-sarkosin-benzylester (6e): Aus 4.4 g **5e**, 4.4 g *Sarkosin-benzylesterhydrochlorid*, 2.83 ccm *Triäthylamin* und 4.4 g *DCC* in 80 ccm Methylenchlorid erhielt man nach Chromatographie an saurem Kieselgel (Säule 3.8×25 cm, Benzol/Chloroform (3:1), Hauptfraktion mit Äthylacetat eluiert) zu 55% amorphes **6e**. $[\alpha]_D^{20}$: $-35 \pm 1^\circ$ ($c = 1.0$ in Methanol).

$C_{19}H_{25}N_3O_5$ (375.4) Ber. C 60.79 H 6.71 N 11.20 Gef.*) C 60.30 H 6.83 N 11.47

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 80° i. Hochvak.

Formyl-D-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosin (7a): Aus 3.0 g **6a**²⁾ in 50 ccm Methanol erhielt man nach Hydrierung zu 98% amorphes **7a**. $[\alpha]_D^{20}$: $-25 \pm 1^\circ$ ($c = 1.6$ in Methanol).

$C_{15}H_{25}N_3O_5$ (327.4) Ber. C 55.04 H 7.70 N 12.84

Gef.*) C 55.63 H 7.92 N 12.62 Mol.-Gew. 336**)

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

***) Potentiometrische Titration mit 0.1*n* NaOH in Methanol/Wasser (1:1).

Formyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosin (7b): Aus 4.0 g **6b** in 50 ccm Methanol erhielt man nach Hydrieren zunächst fast quantitativ amorphes, später zu 86% aus Äthylacetat kristallisierendes **7b**. Farblose Kristalle, Schmp. 150–155°. $[\alpha]_D^{20}$: $+0.6 \bullet 0.1^\circ$ ($c = 1.9$ in absol. Äthanol).

$C_{14}H_{23}N_3O_5$ (313.4) Ber. C 53.66 H 7.39 N 13.41

Gef.*) C 54.16 H 7.54 N 13.55 Mol.-Gew. 318**)

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

***) Potentiometrische Titration mit 0.1*n* NaOH in Methanol/Wasser (1:1).

⁴⁹⁾ Aminosäure-Analyse nach *H. Brockmann* und *J. H. Manegold*, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **343**, 86 (1965).

Formyl-L-valyl-L-prolyl-sarkosin (7c): 4.8 g **6c** in 50 ccm Methanol gaben nach Hydrieren zu 97% amorphes **7c**. $[\alpha]_D^{25}$: $-128 \pm 3^\circ$ ($c = 1.6$ in absol. Äthanol).

$C_{14}H_{23}N_3O_5$ (313.4) Ber. C 53.66 H 7.39 N 13.41 Gef.*) C 53.69 H 7.47 N 13.20

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

Formyl-D-leucyl-L-prolyl-sarkosin (7d): 3.6 g **6d** in 50 ccm Methanol gaben nach Hydrierung zu 97% amorphes **7d**. $[\alpha]_D^{25}$: $-35 \pm 1^\circ$ ($c = 1.1$ in Methanol).

$C_{15}H_{25}N_3O_5$ (327.4) Ber. C 55.04 H 7.70 N 12.84 Gef.*) C 54.91 H 7.85 N 12.50

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

Formyl-D-alanyl-L-prolyl-sarkosin (7e): Aus 2.96 g **6e** in 50 ccm Methanol entstand nach Hydrierung zu 98% amorphes **7e**. $[\alpha]_D^{25}$: $-23 \pm 0.5^\circ$ ($c = 1.0$ in Methanol).

$C_{12}H_{19}N_3O_5$ (285.3) Ber. C 50.51 H 6.71 N 14.73 Gef.*) C 50.40 H 6.95 N 14.20

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

Formyl-D-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-benzylester (8a): Aus 2.05 g **7a**, 1.6 g *N-Methyl-L-valin-benzylester-hydrochlorid*, 0.88 ccm *Triäthylamin* und 1.4 g *DCC* in 50 ccm Methylenchlorid erhielt man nach Chromatographie des Reaktionsproduktes an saurem Kieselgel (Benzol, 10% Chloroform enthaltend) zu 65% amorphes **8a**. $[\alpha]_D^{25}$: $-68 \pm 2^\circ$ ($c = 0.55$ in Methanol).

$C_{28}H_{42}N_4O_6$ (530.7) Ber. C 63.38 H 7.98 N 10.56 Gef.*) C 63.53 H 7.97 N 10.97

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

Formyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-benzylester (8b): Aus 2.8 g **7b**, 2.3 g *N-Methyl-L-valin-benzylester-hydrochlorid*, 1.26 ccm *Triäthylamin* und 2.0 g *DCC* in 60 ccm Methylenchlorid erhielt man nach Chromatographie des Reaktionsproduktes an saurem Kieselgel (Benzol/Chloroform (9:1), Hauptfraktion mit Chloroform, Reste mit Äthylacetat eluiert) zu 58% amorphes **8b**. $[\alpha]_D^{25}$: $-77 \pm 2^\circ$ ($c = 0.7$ in Methanol).

$C_{27}H_{40}N_4O_6$ (516.7) Ber. C 62.77 H 7.81 N 10.84 Gef.*) C 62.50 H 7.96 N 10.88

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

Formyl-L-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-benzylester (8c): Aus 3.34 g **7c**, 2.74 g *N-Methyl-L-valin-benzylester-hydrochlorid*, 1.47 ccm *Triäthylamin* und 2.3 g *DCC* in 70 ccm Methylenchlorid erhielt man nach Chromatographie des Reaktionsproduktes an saurem Kieselgel (3 \times 25 cm-Säule, Benzol/Chloroform (9:1), Hauptfraktion mit Chloroform eluiert) zu 58% amorphes **8c**. $[\alpha]_D^{25}$: $-149 \pm 4^\circ$ ($c = 1.5$ in Methanol).

$C_{27}H_{40}N_4O_6$ (516.7) Ber. C 62.77 H 7.81 N 10.84 Gef.*) C 62.96 H 8.00 N 10.88

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 95° i. Hochvak.

Formyl-D-leucyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-benzylester (8d): Aus 2.62 g **7d**, 2.06 g *N-Methyl-L-valin-benzylester-hydrochlorid*, 1.12 ccm *Triäthylamin* und 1.75 g *DCC* in 70 ccm Methylenchlorid wurden nach Chromatographie des Reaktionsproduktes an saurem Kieselgel (4 \times 16 cm-Säule, Benzol/Chloroform (9:1), Hauptfraktion mit Chloroform eluiert) zu 65% amorphes **8d** erhalten. $[\alpha]_D^{25}$: $-86 \pm 2^\circ$ ($c = 1.0$ in Methanol).

$C_{28}H_{42}N_4O_6$ (530.7) Ber. C 63.38 H 7.98 N 10.56 Gef.*) C 62.66 H 8.09 N 10.47

*) Getrocknet 18 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

Formyl-D-alanyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-benzylester (8e): Aus 2.07 g **7e**, 1.87 g *N-Methyl-L-valin-benzylester-hydrochlorid*, 1.01 ccm *Triäthylamin* und 1.6 g *DCC* in 50 ccm Methylenchlorid erhielt man nach Chromatographie des Reaktionsproduktes an saurem

Kieselgel (4×13 cm-Säule, Benzol/Chloroform (3:1); die Hauptmenge mit Äthylacetat eluiert) zu 65% amorphes **8e**. $[\alpha]_D^{20}$: $-92 \pm 2^\circ$ ($c = 1.0$ in Methanol).

$C_{25}H_{36}N_4O_6$ (488.6) Ber. C 61.46 H 7.43 N 11.47 Gef.*) C 61.20 H 7.60 N 11.53

*) Getrocknet 60 Stdn. bei 100° i. Hochvak.

Formyl-D-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-DL-valin-benzylester (8f): 1.85 g **7a**, 1.46 g *N-Methyl-DL-valin-benzylester-hydrochlorid*, 0.78 ccm *Triäthylamin* und 1.23 g *DCC* in 50 ccm Methylenechlorid gaben nach Chromatographie des Reaktionsproduktes an saurem Kieselgel (Benzol mit 10% Chloroform) zu 50% amorphes **8f**. $[\alpha]_D^{20}$: $-21 \pm 1^\circ$ ($c = 1.0$ in Methanol).

$C_{28}H_{42}N_4O_6$ (530.7) Ber. C 63.38 H 7.98 N 10.56 Gef.*) C 62.69 H 8.09 N 10.92

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

Formyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-D-valin-benzylester (8g): Aus 0.77 g **7b**, 0.63 g *N-Methyl-D-valin-benzylester-hydrochlorid*, 0.35 ccm *Triäthylamin* und 0.53 g *DCC* erhielt man nach Chromatographie des Reaktionsproduktes an saurem Kieselgel (3×9 cm-Säule, Benzol/Chloroform (4:1); Hauptfraktion mit Äthylacetat eluiert) zu 80% amorphes **8g**. $[\alpha]_D^{20}$: $+48 \pm 2^\circ$ ($c = 0.5$ in Methanol).

$C_{27}H_{40}N_4O_6$ (516.7) Ber. C 62.77 H 7.81 N 10.84 Gef.*) C 62.93 H 7.85 N 10.60

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 80° i. Hochvak.

Formyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-sarkosin-benzylester (8h): Aus 4.0 g **7b**, 2.8 g *Sarkosin-benzylester-hydrochlorid*, 1.79 ccm *Triäthylamin* und 2.8 g *DCC* in 100 ccm Methylenechlorid erhielt man nach Chromatographie des Reaktionsproduktes an saurem Kieselgel (4×20 cm-Säule, Benzol/Chloroform (4:1); Hauptfraktion mit Äthylacetat eluiert) zu 50% amorphes **8h**. $[\alpha]_D^{20}$: $-9.9 \pm 0.5^\circ$ ($c = 2.4$ in Methanol).

$C_{24}H_{34}N_4O_6$ (474.6) Ber. C 60.73 H 7.22 N 11.81 Gef.*) C 60.87 H 7.53 N 12.03

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

Formyl-D-valyl-L-prolyl-sarkosyl-L-prolin-benzylester (8i): 2.19 g **7b**, 1.7 g *L-Prolin-benzylester-hydrochlorid*, 0.97 ccm *Triäthylamin* und 1.55 g *DCC* in 70 ccm Methylenechlorid gaben nach Chromatographie des Reaktionsproduktes an saurem Kieselgel (3×17 cm-Säule, Benzol/Chloroform (4:1); Hauptfraktion mit Äthylacetat eluiert) zu 57% amorphes **8i**. $[\alpha]_D^{20}$: $-71 \pm 2^\circ$ ($c = 1.1$ in Methanol).

$C_{26}H_{36}N_4O_6$ (500.6) Ber. C 62.38 H 7.25 N 11.20 Gef.*) C 61.83 H 7.31 N 11.19

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 80° i. Hochvak.

D-allo-Isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-benzylester-hydrochlorid (9a): 3.4 g **8a**, mit 0.44 g *HCl* in 12 ccm Benzylalkohol entformyliert, gaben zu 85% amorphes **9a**. $[\alpha]_D^{20}$: $-143 \pm 3^\circ$ ($c = 1.9$ in Wasser).

$C_{27}H_{43}N_4O_5[Cl]$ (539.1) Ber. C 60.14 H 8.04 Cl 6.58 N 10.40

Gef.*) C 59.61 H 8.30 Cl 6.86 N 10.47

Ber. Mol Ile 1.00 Pro 1.00 Sar 1.00 MeVal 1.00

Gef.⁴⁹⁾ Mol Ile 1.00 Pro 1.06 Sar 0.93 MeVal 0.90

*) Getrocknet 7 Stdn. bei 85° i. Hochvak.

D-Valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-benzylester-hydrochlorid (9b): Durch Entformylierung von 2.1 g **8b** mit 0.3 g *HCl* in 8 ccm Benzylalkohol erhielt man zu 90% amorphes **9b**. $[\alpha]_D^{20}$: $-126 \pm 4^\circ$ ($c = 1.5$ in Methanol).

$C_{26}H_{41}N_4O_5[Cl]$ (525.1) Ber. C 59.47 H 7.87 Cl 6.75 N 10.67

Gef.*) C 59.11 H 7.91 Cl 6.96 N 10.50 Äquiv.-Gew. 511 **)

Ber. Mol Val 1.00 Pro 1.00 Sar 1.00 MeVal 1.00

Gef.⁴⁹⁾ Mol Val 1.02 Pro 0.99 Sar 0.98 MeVal 0.96

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

***) Potentiometrische Titration mit $0.1N$ NaOH in Wasser.

L-Valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-benzylester-hydrochlorid (**9c**): Entformylierung von 2.97 g **8c** mit 0.45 g *HCl* in 12 ccm Benzylalkohol gab zu 93% amorphes **9c**. $[\alpha]_D^{25}$: $-110 \pm 3^\circ$ ($c = 0.61$ in Methanol).

$C_{26}H_{41}N_4O_5]Cl$ (525.1) Ber. C 59.47 H 7.87 Cl 6.75 N 10.67

Gef. *) C 59.24 H 8.31 Cl 6.80 N 10.55 Äquiv.-Gew. 509 **)

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

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

D-Leucyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-benzylester-hydrochlorid (**9d**): Durch Entformylierung von 2.35 g **8d** mit 0.31 g *HCl* in 8 ccm Benzylalkohol erhielt man zu 95% amorphes **9d**. $[\alpha]_D^{20}$: $-106 \pm 2^\circ$ ($c = 1.1$ in Methanol).

$C_{27}H_{43}N_4O_5]Cl$ (539.1) Ber. C 60.14 H 8.04 Cl 6.58 N 10.40

Gef. *) C 59.86 H 8.29 Cl 6.66 N 10.39

*) Getrocknet 18 Stdn. bei 80° i. Hochvak.

D-Alanyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-L-valin-benzylester-hydrochlorid (**9e**): Entformylierung von 2.26 g **8e** mit 0.32 g *HCl* in 8 ccm Benzylalkohol gab zu 97% amorphes **9e**. $[\alpha]_D^{25}$: $-116 \pm 2^\circ$ ($c = 1.1$ in Methanol).

$C_{24}H_{37}N_4O_5]Cl$ (497.0) Ber. C 58.01 H 7.51 Cl 7.13 N 11.28

Gef. *) C 57.70 H 7.65 Cl 6.98 N 11.19

*) Getrocknet 15 Stdn. bei 80° i. Hochvak.

D-allo-Isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-DL-valin-benzylester-hydrochlorid (**9f**): 1.0 g **8f**, mit 0.15 g *HCl* in 4 ccm Benzylalkohol entformyliert, gab zu 96% amorphes **9f**. $[\alpha]_D^{20}$: $-65 \pm 2^\circ$ ($c = 1.1$ in Methanol).

$C_{27}H_{43}N_4O_5]Cl$ (539.1) Ber. C 60.14 H 8.04 Cl 6.58 N 10.40

Gef. *) C 59.89 H 8.09 Cl 6.74 N 10.63

*) Getrocknet 15 Stdn. bei 80° i. Hochvak.

D-Valyl-L-prolyl-sarkosyl-N-methyl-D-valin-benzylester-hydrochlorid (**9g**): Die Entformylierung von 1.05 g **8g** mit 0.16 g *HCl* in 4 ccm Benzylalkohol gab zu 94% amorphes **9g**. $[\alpha]_D^{20}$: $-9.5 \pm 0.5^\circ$ ($c = 0.7$ in Methanol).

$C_{26}H_{41}N_4O_5]Cl$ (525.1) Ber. C 59.47 H 7.87 Cl 6.75 N 10.67

Gef. *) C 59.53 H 8.00 Cl 7.02 N 10.42

*) Getrocknet 16 Stdn. bei 110° i. Hochvak.

D-Valyl-L-prolyl-sarkosyl-sarkosin-benzylester-hydrochlorid (**9h**): 5.6 g **8h**, mit 1.0 g *HCl* in 17 ccm Benzylalkohol entformyliert, gaben zu 90% amorphes **9h**. $[\alpha]_D^{15}$: $-62 \pm 2^\circ$ ($c = 2.3$ in Methanol).

$C_{23}H_{35}N_4O_5]Cl$ (483.0) Ber. C 57.19 H 7.31 N 7.34

Gef. *) C 56.60 H 7.49 N 7.65 Äquiv.-Gew. 467 **)

Ber. Mol Val 1.00 Pro 1.00 Sar 2.00

Gef. 49) Mol Val 0.97 Pro 0.95 Sar 1.89

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

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

D-Valyl-L-prolyl-sarkosyl-L-prolin-benzylester-hydrochlorid (**9i**): Aus 1.96 g **8i** und 0.3 g *HCl* in 8 ccm Benzylalkohol erhielt man zu 94% amorphes **9i**. $[\alpha]_D^{20}$: $-112 \pm 2^\circ$ ($c = 1.0$ in Methanol).

$C_{25}H_{37}N_4O_5]Cl$ (509.0) Ber. C 58.99 H 7.33 Cl 6.96 N 11.01

Gef. *) C 58.46 H 7.36 Cl 6.91 N 11.07

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*D*-threonin (**10b**): 6.0 g 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure und 2.4 g *D*-Threonin gaben zu 50% **10b**. Blaßgelbe, lichtempfindliche Kristalle mit Schmp. 173–175° und $[\alpha]_D^{25}$: $+57.6 \pm 2^\circ$ ($c = 1.8$ in absol. Äthanol).

$C_{19}H_{20}N_2O_7$ (388.3) Ber. C 58.75 H 5.20 N 7.21

Gef. *) C 58.83 H 5.01 N 7.28 Mol.-Gew. 383 **)

*) Fein zerrieben und 8 Stdn. bei 120° i. Hochvak. getrocknet.

**) Potentiometrische Titration mit 0.1 *n* NaOH in Methanol/Wasser (1:1).

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-serin (**10c**): 6 g 2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoesäure, 15 ccm Thionylchlorid und 2.13 g *L*-Serin gaben zu 80% gelbliches, nach 14 Tagen bei 5° aus Aceton/Benzol/Cyclohexan kristallisierendes **10c** mit Schmp. 139–141° *). $[\alpha]_D^{25}$: $-24 \pm 1^\circ$ ($c = 1.8$ in absol. Äthanol). Zur Analyse wurde wie oben umkristallisiert.

$C_{18}H_{18}N_2O_7$ (374.3) Ber. C 57.76 H 4.85 N 7.49

Gef. *) C 57.80 H 4.76 N 7.52 Mol.-Gew. 379 **)

*) Produkt schmilzt zuerst bei 70° i. Hochvak. Nach erneuter Kristallisation fein zerrieben und 12 Stdn. bei 100° weitergetrocknet.

**) Potentiometrische Titration mit 0.1 *n* NaOH in Methanol/Wasser (1:1).

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-glycin-methylester (**10d**): Aus 1.94 g **10a**⁴⁾, 0.69 ccm Triäthylamin, 1.27 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3') und 0.63 g mit 0.69 ccm Triäthylamin neutralisiertem Glycin-methylester-hydrochlorid in insgesamt 40 ccm Nitromethan erhielt man, wie oben für **11a**–**11i** beschrieben (2.5 × 20 cm-Aluminium-oxidsäule), zu 58% blaßgelbes, aus Äthylacetat/Cyclohexan umkristallisiertes **10d** mit Schmp. 158–160°. $[\alpha]_D^{25}$: $-40 \pm 1.5^\circ$ ($c = 1.4$ in absol. Äthanol).

$C_{22}H_{25}N_3O_8$ (459.4) Ber. C 57.51 H 5.49 N 9.15 Gef. *) C 57.99 H 5.48 N 9.20

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

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-glycin (**10e**): 2.4 g **10d** in 25 ccm Aceton wurden mit 5.75 ccm *n* NaOH 1 Stde. auf 40° erwärmt, danach mit 30 ccm Wasser verdünnt und mit Äthylacetat durchgeschüttelt. Der mit *n* HCl angesäuerten wäbr. Phase entzog man das Verseifungsprodukt mit Äthylacetat, wusch den Extrakt mit Wasser, filtrierte und kristallisierte den Eindampfrückstand aus Nitromethan. Ausb. 83% **10e**, gelbliche Kristalle mit Schmp. 134–137° und $[\alpha]_D^{25}$: $-32 \pm 1.5^\circ$ ($c = 1.8$ in absol. Äthanol).

$C_{21}H_{23}N_3O_8$ (445.4) Ber. C 56.62 H 5.20 N 9.44

Gef. *) C 56.89 H 4.95 N 9.20 Mol.-Gew. 458 **)

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

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

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-allo-isoleucyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-benzylester (**11a**): Durch Umsetzen von 1.85 g **10a**⁴⁾, 0.66 ccm Triäthylamin und 1.22 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3')¹⁸⁾ mit 2.6 g **9a** (durch 0.68 ccm Triäthylamin neutralisiert) in insgesamt 40 ccm Nitromethan erhielt man zu 53% gelbliches, amorphes **11a**. $[\alpha]_D^{25}$: $-53 \pm 2^\circ$ ($c = 2.9$ in Methanol).

$C_{46}H_{60}N_6O_{11}$ (873.0) Ber. C 63.28 H 6.93 N 9.63 Gef. *) C 63.77 H 7.04 N 9.88

Ber. Mol Thr 1.00 alle 1.00 Pro 1.00 Sar 1.00 MeVal 1.00

Gef.⁴⁹⁾ Mol Thr⁵⁰⁾ 0.71 alle 1.02 Pro 1.00 Sar 1.01 MeVal 0.82

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

⁵⁰⁾ Ein Teil des Threonins wird bei der zur Aminosäurebestimmung notwendigen Totalhydrolyse zerstört.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-benzylester (**11b**): Aus 1.5 g **10a**⁴⁾, 0.37 ccm Triäthylamin, 0.70 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3') und 1.41 g mit 0.38 ccm Triäthylamin neutralisiertem **9b** in insges. 30 ccm Nitromethan erhielt man zu 68% gelbliches, amorphes **11b**. $[\alpha]_D^{25}$: $-53 \pm 2^\circ$ ($c = 0.75$ in Methanol).

$C_{45}H_{58}N_6O_{11}$ (859.0) Ber. C 62.92 H 6.81 N 9.78 Gef. *) C 63.12 H 6.93 N 9.43
Ber. Mol Thr 1.00 Val 1.00 Pro 1.00 Sar 1.00 MeVal 1.00
Gef.⁴⁹⁾ Mol Thr 0.73⁵⁰⁾ Val 1.01 Pro 0.99 Sar 0.98 MeVal 0.89

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

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*L*-valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-benzylester (**11c**): 1.94 g **10a**⁴⁾, 0.69 ccm Triäthylamin, 1.28 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3') und 2.61 g **9c** (mit 0.71 ccm Triäthylamin neutralisiert) in insgesamt 40 ccm Nitromethan gaben zu 55% gelbliches, amorphes **11c** mit $[\alpha]_D^{25}$: $-101 \pm 3^\circ$ ($c = 0.81$ in Methanol).

$C_{45}H_{58}N_6O_{11}$ (859.0) Ber. C 62.92 H 6.81 N 9.78 Gef. *) C 63.12 H 6.80 N 10.01

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

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-leucyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-benzylester (**11d**): 1.46 g **10a**⁴⁾, 0.53 ccm Triäthylamin, 0.97 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3') und 2.03 g **9d** (mit 0.55 ccm Triäthylamin neutralisiert) in insgesamt 40 ccm Nitromethan gaben nach Chromatographie des Reaktionsproduktes an einer 3 × 10 cm-Aluminiumoxid-II-säule zu 70% blaßgelbes, amorphes **11d**. $[\alpha]_D^{25}$: $-50 \pm 1.5^\circ$ ($c = 1.1$ in Methanol).

$C_{46}H_{60}N_6O_{11}$ (873.0) Ber. C 63.28 H 6.93 N 9.63 Gef. *) C 62.96 H 7.02 N 9.64

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

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-alanyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-benzylester (**11e**): 1.6 g **10a**⁴⁾, 0.57 ccm Triäthylamin, 1.06 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3') und 2.06 g **9e** (mit 0.59 ccm Triäthylamin neutralisiert) in insgesamt 40 ccm Nitromethan gaben nach Chromatographie an einer 3 × 10 cm-Aluminiumoxid-II-säule zu 68% gelbliches, amorphes **11e**. $[\alpha]_D^{25}$: $-55 \pm 1.5^\circ$ ($c = 0.9$ in Methanol).

$C_{43}H_{54}N_6O_{11}$ (830.9) Ber. C 62.15 H 6.70 N 10.01 Gef. *) C 62.15 H 6.68 N 10.09

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

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-allo-isoleucyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*D*-L-valin-benzylester (**11f**): 0.7 g **10a**⁴⁾, 0.25 ccm Triäthylamin, 0.46 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3') und 0.97 g **9f** (mit 0.26 ccm Triäthylamin neutralisiert) in insgesamt 20 ccm Nitromethan gaben zu 50% gelbliches, amorphes **11f**. $[\alpha]_D^{25}$: $-17 \pm 1^\circ$ ($c = 1.2$ in Methanol).

$C_{46}H_{60}N_6O_{11}$ (873.0) Ber. C 63.28 H 6.93 N 9.63 Gef. *) C 63.06 H 7.09 N 9.96

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

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*D*-valin-benzylester (**11g**): 0.69 g **10a**⁴⁾, 0.25 ccm Triäthylamin, 0.45 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3') und 0.94 g **9g** (mit 0.26 ccm Triäthylamin neutralisiert) in 20 ccm Nitromethan gaben nach Chromatographie des Reaktionsproduktes an einer 2.5 × 12 cm-Aluminiumoxid-II-säule (mit Benzol nachgewaschen; Hauptfraktion nur teilweise mit Äthylacetat, größtenteils erst mit Methanol eluiert) zu 78% gelbliches, amorphes **11g**. $[\alpha]_D^{25}$: $+21 \pm 0.5^\circ$ ($c = 0.6$ in Methanol).

$C_{45}H_{58}N_6O_{11}$ (859.0) Ber. C 62.92 H 6.81 N 9.78 Gef. *) C 62.52 H 6.96 N 9.86

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

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-sarkosinbenzylester (**11h**): 3.22 g **10a**⁴⁾, 1.15 ccm Triäthylamin, 2.1 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3') und 4.02 g **9h** (mit 1.18 ccm Triäthylamin neutralisiert) in insgesamt 60 ccm Nitromethan gaben zu 60% gelbliches, amorphes **11h**. $[\alpha]_D^{25}$: $-12.4 \pm 0.6^\circ$ ($c = 2.3$ in Methanol).

C₄₂H₅₂N₆O₁₁ (817.0) Ber. C 61.73 H 6.42 N 10.29 Gef.*) C 62.00 H 6.60 N 10.37
 Ber. Mol Thr 1.00 Val 1.00 Pro 1.00 Sar 2.00
 Gef.⁴⁹⁾ Mol Thr 0.80⁵⁰⁾ Val 0.98 Pro 0.99 Sar 1.87

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

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-*D*-valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*L*-prolinbenzylester (**11i**): Aus 1.28 g **10a**⁴⁾, 0.46 ccm Triäthylamin, 0.75 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3') und 1.68 g **9i** (mit 0.47 ccm Triäthylamin neutralisiert) in insgesamt 40 ccm Nitromethan erhielt man nach Chromatographie des Reaktionsproduktes an einer 2.5 × 10 cm-Aluminiumoxid-II-säule zu 55% blaßgelbes **11i** mit $[\alpha]_D^{25}$: $-45 \pm 1^\circ$ ($c = 1.1$ in Methanol).

C₄₄H₅₄N₆O₁₁ (843.0) Ber. C 62.69 H 6.46 N 9.97 Gef.*) C 62.33 H 6.46 N 9.98

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 80° i. Hochvak.

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*D*-threonyl-*D*-valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-benzylester (**11j**): Aus 1.4 g **10b**, 0.50 ccm Triäthylamin, 0.92 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3') und 1.95 g **9b** (mit 0.52 ccm Triäthylamin neutralisiert) in insgesamt 40 ccm Nitromethan erhielt man nach Chromatographie des Reaktionsproduktes an einer 2.5 × 15 cm-Aluminiumoxid-II-säule zu 70% blaßgelbes, amorphes **11j**. $[\alpha]_D^{25}$: $-48 \pm 1.5^\circ$ ($c = 1.7$ in Methanol).

C₄₅H₅₈N₆O₁₁ (859.0) Ber. C 62.92 H 6.81 N 9.78 Gef.*) C 62.89 H 6.95 N 10.14

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

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-seryl-*D*-valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-benzylester (**11k**): Aus 1.95 g **10c**, 0.72 ccm Triäthylamin, 1.34 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3') und 2.75 g **9b** (mit 0.74 ccm Triäthylamin neutralisiert) erhielt man zu 66% blaßgelbes, amorphes **11k** mit $[\alpha]_D^{25}$: $-47 \pm 1.5^\circ$ ($c = 0.7$ in Methanol).

C₄₄H₅₆N₆O₁₁ (845.0) Ber. C 62.54 H 6.70 N 9.97 Gef.*) C 62.67 H 6.70 N 9.90

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

N-[2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl]-*L*-threonyl-glycyl-*D*-valyl-*L*-prolyl-sarkosyl-*N*-methyl-*L*-valin-benzylester (**11l**): 1.93 g **10e**, 0.60 ccm Triäthylamin, 1.1 g *N*-Äthyl-5-phenyl-isoxazolium-sulfonat-(3') und 2.3 g **9b** (mit 0.62 ccm Triäthylamin neutralisiert) in insgesamt 40 ccm Nitromethan gaben nach Chromatographie des Reaktionsproduktes an einer 2.5 × 20 cm-Aluminiumoxid-II-säule zu 85% blaßgelbes **11l** mit $[\alpha]_D^{25}$: $-62 \pm 1.5^\circ$ ($c = 0.42$ in Methanol).

C₄₇H₆₁N₇O₁₂ (916.0) Ber. C 61.62 H 6.74 N 10.71 Gef.*) C 61.39 H 6.69 N 10.69

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

Actinomycinsäure-(*L*-Thr-*D*-alle-*L*-Pro-Sar-*L*-MeVal-OH) (Actinomycin C₃-säure) (**12a**): Aus 1.72 g **11a** in 40 ccm Methanol erhielt man nach Hydrierung und Oxydation mit 2 g Kaliumhexacyanoferrat(III) zu 85% gelbrotes, bei 180–195° (Zers.) schmelzendes **12a**.

C₆₄H₉₄N₁₂O₁₈ (1319.5) Ber. C 58.25 H 7.18 N 12.74

Gef.*) C 58.00 H 7.43 N 12.67 Mol.-Gew. 1306**)

Ber. Mol Thr 2.0 alle 2.0 Pro 2.0 Sar 2.0 MeVal 2.0

Gef.⁴⁹⁾ Mol Thr 1.4⁵⁰⁾ alle 1.9 Pro 2.1 Sar 2.0 MeVal 1.9

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

***) Potentiometrische Titration mit 0,05*n* NaOH in Methanol/Wasser (1:1).

Actinomycinsäure-(L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal-OH) (*Actinomycin C₁-säure*) (**12b**): 1.27 g in 40 ccm Methanol hydriertes **11b** gaben nach Oxydation mit 1.5 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* zu 80% gelbrotes, bei 182–195° (Zers.) schmelzendes **12b**.

$C_{62}H_{90}N_{12}O_{18}$ (1291.5) Ber. C 57.66 H 6.97 N 13.01
 Gef.*) C 57.99 H 7.21 N 12.62 Mol.-Gew. 1280**)
 Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Pro 2.0 Sar 2.0 MeVal 2.0
 Gef.⁴⁹⁾ Mol Thr 1.6⁵⁰⁾ Val 2.0 Pro 1.9 Sar 2.0 MeVal 1.9

*) Getrocknet 10 Stdn. bei 100° i. Hochvak.

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

Actinomycinsäure-(L-Thr-L-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal-OH) (**12c**): 1.69 g **11c** gaben nach Hydrierung in 30 ccm Methanol und Oxydation mit 1.6 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* zu 91% gelbrotes, bei 182–188° (Zers.) schmelzendes **12c**.

$C_{62}H_{90}N_{12}O_{18}$ (1291.5) Ber. C 57.66 H 6.97 N 13.01
 Gef.*) C 57.17 H 7.03 N 13.02 Mol.-Gew. 1311**)

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 110° i. Hochvak.

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

Actinomycinsäure-(L-Thr-D-Leu-L-Pro-Sar-L-MeVal-OH) (**12d**): Aus 1.51 g **11d** in 40 ccm Methanol erhielt man nach Hydrierung und Oxydation mit 1.73 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* zu 75% gelbrotes, bei 182–189° (Zers.) schmelzendes **12d**.

$C_{64}H_{94}N_{12}O_{18}$ (1319.5) Ber. C 58.25 H 7.18 N 12.74
 Gef.*) C 57.79 H 7.36 N 12.82 Mol.-Gew. 1327**)

*) Getrocknet 16 Stdn. bei 100° i. Hochvak.

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

Actinomycinsäure-(L-Thr-D-Ala-L-Pro-Sar-L-MeVal-OH) (**12e**): 1.70 g **11e** in 40 ccm Methanol gaben nach Hydrierung und Oxydation mit 2.1 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* zu 86% gelbrotes, bei 192–198° (Zers.) schmelzendes **12e**.

$C_{58}H_{82}N_{12}O_{18}$ (1235.4) Ber. C 56.31 H 6.69 N 13.61
 Gef.*) C 56.14 H 6.93 N 13.65 Mol.-Gew. 1248**)

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 100° i. Hochvak.

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

Actinomycinsäure-(L-Thr-D-alle-L-Pro-Sar-DL-MeVal-OH) (**12f**): 0.65 g **11f** in 40 ccm Methanol gaben nach Hydrierung und Oxydation mit 0.76 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* zu 80% gelbrotes, bei 180–186° (Zers.) schmelzendes **12f**.

$C_{64}H_{94}N_{12}O_{18}$ (1319.5) Ber. C 58.25 H 7.18 N 12.74
 Gef.*) C 57.89 H 7.48 N 12.76 Mol.-Gew. 1347**)

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 100° i. Hochvak.

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

Actinomycinsäure-(L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-D-MeVal-OH) (**12g**): Aus 1.2 g **11g** in 30 ccm Methanol erhielt man nach Hydrierung und Oxydation mit 1.4 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* zu 75% gelbrotes, bei 182–188° (Zers.) schmelzendes **12g**.

$C_{62}H_{90}N_{12}O_{18}$ (1291.5) Ber. C 57.66 H 6.97 N 13.01
 Gef.*) C 57.71 H 7.08 N 13.08 Mol.-Gew. 1285**)

*) Getrocknet 10 Stdn. bei 100° i. Hochvak.

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

Actinomycinsäure-(L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-Sar-OH) (**12h**): Aus 2.43 g **11h** in 50 ccm Methanol erhielt man nach Hydrierung und Oxydation mit 3.0 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* zu 65% gelbrotes, bei 180–188° (Zers.) schmelzendes **12h**.

$C_{56}H_{78}N_{12}O_{18}$ (1207.4) Ber. C 55.61 H 6.51 N 13.90
 Gef.*) C 55.45 H 6.70 N 13.83 Mol.-Gew. 1226 **)
 Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Pro 2.0 Sar 4.0
 Gef.⁴⁹⁾ Mol Thr 1.6⁵⁰⁾ Val 1.9 Pro 1.9 Sar 3.9

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

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

Actinocinyl-bis-[L-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-Pro-OH] (**12i**): 1.33 g **11i** in 50 ccm Methanol gaben nach Hydrierung und Oxydation mit 1.6 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* zu 83% gelbrotes, bei 196–201° (Zers.) schmelzendes **12i**.

$C_{60}H_{82}N_{12}O_{18}$ (1259.4) Ber. C 57.24 H 6.57 N 13.35
 Gef.*) C 56.74 H 6.70 N 13.33 Mol.-Gew. 1264 **)
 Ber. Mol Pro 4.0 Gef.⁴⁹⁾ Mol Pro 3.6

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 100° i. Hochvak.

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

Actinomycinsäure-(D-Thr-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal-OH) (**12j**): Aus 2.18 g **11j** in 50 ccm Methanol entstanden nach Hydrierung und Oxydation mit 2.58 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* zu 53% gelbrotes, bei 181–190° (Zers.) schmelzendes **12j**.

$C_{62}H_{90}N_{12}O_{18}$ (1291.5) Ber. C 57.66 H 6.97 N 13.01
 Gef.*) C 57.68 H 7.21 N 12.84 Mol.-Gew. 1310 **)

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 100° i. Hochvak.

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

Actinomycinsäure-(L-Ser-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal-OH) (**12k**): Aus 1.9 g **11k** in 50 ccm Methanol erhielt man nach Hydrierung und Oxydation mit 2.3 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* zu 80% gelbrotes, bei 195–200° (Zers.) schmelzendes **12k**.

$C_{60}H_{86}N_{12}O_{18}$ (1263.5) Ber. C 57.03 H 6.86 N 13.33
 Gef.*) C 57.29 H 6.99 N 13.04 Mol.-Gew. 1267 **)
 Ber. Mol Ser 2.0 Val 2.0 Pro 2.0 Sar 2.0 MeVal 2.0
 Gef.⁴⁹⁾ Mol Ser 1.3⁵¹⁾ Val 1.8 Pro 1.8 Sar 1.8 MeVal 1.7

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 90° i. Hochvak.

***) Potentiometrische Titration mit 0.1*n* NaOH in Methanol/Wasser (1:1).

Actinocinyl-bis-[L-Thr-Gly-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal-OH] (**12l**): 2.14 g **11l** in 60 ccm Methanol ergaben nach Hydrierung und Oxydation mit 2.55 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* zu 82% gelbrotes, bei 180–188° (Zers.) schmelzendes **12l**.

$C_{66}H_{96}N_{14}O_{20}$ (1405.6) Ber. C 56.39 H 6.88 N 13.95
 Gef.*) C 56.33 H 7.12 N 13.90 Mol.-Gew. 1420 **)

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 110° i. Hochvak.

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

Actinomycinsäure-(L-Thr- $\frac{D-Val}{D-alle}$ (bzw. $\frac{D-alle}{D-Val}$)-L-Pro-Sar-L-MeVal-OH) (**12m/12n**):

Durch Hydrierung von 0.66 g **11a** und 0.65 g **11b** in 50 ccm Methanol und Oxydation des Gemisches mit 1.58 g *Kaliumhexacyanoferrat(III)* erhielt man 0.87 g rohes **12a/12b/12m/12n**-Gemisch. Dieses gab — aufgearbeitet wie **12a** — nach Chromatographie an einer 4.5 × 80 cm-Cellulosesäule (LS VI, Laufzeit 8 Tage) und Isolierung der mittleren Zone mit dem R_F -Wert von Actinomycin C₂-säure (**12m**) 138 mg gelbrotes, bei 181–189° (Zers.) schmelzendes **12m/12n**.

⁵¹⁾ Ein Teil des Serins wird bei der zur Aminosäurebestimmung notwendigen Totalhydrolyse zerstört.

$C_{63}H_{92}N_{12}O_{18}$ (1305.5) Ber. C 57.96 H 7.10 N 12.87

Gef.*) C 57.71 H 7.36 N 12.74 Mol.-Gew. 1302**)

*) Getrocknet 12 Stdn. bei 110° i. Hochvak.

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

Actinomycin C₃ (**14b**)

a) Aus **12a**: 460 mg (0.35 mMol) **12a**, cyclisiert, wie oben beschrieben, gaben nach Chromatographie an Cellulose (LS I) zu 19% krist. **14b** mit Schmp. 239–241° (Zers.).

$C_{64}H_{90}N_{12}O_{16}$ (1283.5) Ber. C 59.89 H 7.07 N 13.09 Gef.*) C 59.66 H 7.33 N 13.05

*) Getrocknet 24 Stdn. bei 115° i. Hochvak.

b) Aus **12f**: Zwei Ansätze mit je 235 mg **12f** und 80 ccm *Reagenzlösung* wurden, wie oben beschrieben, aufgearbeitet. Aus den Äthylacetatfraktionen (136 und 122 mg) erhielt man nach Chromatographie an Cellulose (LS I) und Kristallisation der bakteriostatisch wirksamen Hauptzonen aus Äthylacetat/Cyclohexan 43 bzw. 40 mg (ca. 18%) **14b** als rote Kristalle mit Schmp. 239–242° (Zers.).

$C_{64}H_{90}N_{12}O_{16}$ (1283.5) Ber. C 59.89 H 7.07 N 13.09 Gef.*) C 59.24 H 7.14 N 12.99

*) Getrocknet 20 Stdn. bei 115° i. Hochvak.

Actinomycin C₁ (**14a**)

a) Aus **12b**: 470 mg **12b**, wie beschrieben cyclisiert und aufgearbeitet (Cellulosesäule LS II), gaben nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthylacetat/Cyclohexan 28% **14a**, rote Nadeln mit Schmp. 244–246° (Zers.).

$C_{62}H_{86}N_{12}O_{16}$ (1255.5) Ber. C 59.31 H 6.91 N 13.39 Gef.*) C 58.95 H 7.15 N 13.20

Ber. Mol Thr 2.0 Val 2.0 Pro 2.0 Sar 2.0 MeVal 2.0

Gef.⁴⁹) Mol Thr 1.3⁵⁰) Val 1.9 Pro 2.0 Sar 2.0 MeVal 2.0

*) Getrocknet 24 Stdn. bei 110° i. Hochvak.

b) Aus **12b/12c**: Aus 1.5 g **12b/12c** (10% **12b**) erhielt man nach Cyclisierung, Auftrennung der Äthylacetatfraktionen an Cellulose (LS II oder V) und Aufarbeitung der bakteriostatisch wirksamen Zone (*R_F*-Wert von Actinomycin C₁), wie vorn beschrieben, zu 2.5% **14a**, rote Nadeln mit Schmp. 244–248° (Zers.).

Gef. C 59.17 H 6.95 N 13.20

*) Getrocknet 24 Stdn. bei 115° i. Hochvak.

c) Aus **12g**: 446 mg **12g**, wie oben beschrieben cyclisiert, gaben nach Chromatographie an Cellulose (LS II) zu 26% **14a**, rote Bipyramiden mit Schmp. 243–247° (Zers.).

Gef.*) C 58.85 H 6.82 N 13.51

*) Getrocknet 24 Stdn. bei 115° i. Hochvak.

Actinomycin C₂ (**14c/14d**): 65 mg **12m/12n** gaben nach Cyclisierung mit 25 ccm *Reagenzlösung* und Chromatographie an Cellulose (LS I) zu 21% **14c/14d**, rote Nadeln mit Schmp. 243–245° (Zers.).

$C_{63}H_{88}N_{12}O_{16}$ (1269.5) Ber. C 59.61 H 6.99 N 13.24 Gef.*) C 59.17 H 7.18 N 13.02

*) Getrocknet 28 Stdn. bei 110° i. Hochvak.

Actinomycin-(L-Thr-D-Leu-L-Pro-Sar-L-MeVal) (**14e**): 471 mg **12d**, wie oben cyclisiert und aufgearbeitet (4 × 50 cm-Cellulosesäule: LS I), gaben zu 30% **14e**, rote Nadeln mit Schmp. 234–237° (Zers.).

$C_{64}H_{90}N_{12}O_{16}$ (1283.5) Ber. C 59.89 H 7.07 N 13.09 Gef.*) C 59.70 H 7.11 N 13.01

*) Getrocknet 24 Stdn. bei 115° i. Hochvak.

Actinomycin-(L-Thr-D-Ala-L-Pro-Sar-L-MeVal) (**14f**): 900 mg **12e** cyclisierte man, wie oben beschrieben, und zerlegte das Rohprodukt an Aluminiumoxid-IV. Äthylacetatfraktion (230 mg) und Acetonfraktion (220 mg) ließen sich an zwei 3.5×40 cm-Cellulosesäulen (LS VII) in je vier Hauptzonen mit jeweils identischen R_F -Werten trennen, deren Inhaltsstoffe nach üblicher Aufarbeitung aus Äthylacetat/Cyclohexan gefällt wurden: Zonen 1–4 (von oben): 130 mg, 39 mg, 68 mg und 72 mg. Die bakterio­statisch wirksamen Zonen 1 gaben nach Kristallisation aus Äthylacetat/Methanol/Cyclohexan **14f**, rote Kristalle mit Schmp. 240 bis 246° (Zers.). Ausb. 6%.

$C_{58}H_{78}N_{12}O_{16}$ (1199.3) Ber. C 58.00 H 6.56 N 14.02 Gef.*¹⁾ C 57.99 H 6.49 N 13.93

Aus den Zonen 3 erhielt man nach zweimaliger Kristallisation (Äthylacetat/Methanol/Cyclohexan) 15 mg rote Kristalle mit Schmp. 220–230° (Zers.).

Gef.*²⁾ C 46.21 H 5.32 N 13.00 O 25.6 Rest: Cl**)

*¹⁾ Getrocknet 24 Stdn. bei 100° i. Hochvak.

**²⁾ Infolge Substanzmangel nicht genau bestimmt.

Actinomycin-(L-Ser-D-Val-L-Pro-Sar-L-MeVal) (**14g**): 1.4 g **12k** wurden in 3 Ansätzen, wie oben beschrieben, cyclisiert und die von Aluminiumoxid-IV erhaltenen Äthylacetatfraktionen gemeinsam an einer 4×80 cm-Cellulosesäule (LS V) aufgetrennt. Aus der bakterio­statisch wirksamen Fraktion (R_{C_1} -Wert: vgl. Tab. 3) erhielt man nach üblicher Aufarbeitung und Kristallisation aus Äthylacetat/Methanol/Cyclohexan bei 269–273° (Zers.) schmelzendes **14g**. Ausb. 5%. Zur Analyse aus Äthylacetat/Cyclohexan umkristallisiert.

$C_{60}H_{82}N_{12}O_{16}$ (1227.5) Ber. C 58.71 H 6.73 N 13.71 Gef.*¹⁾ C 58.61 H 6.94 N 13.52

*¹⁾ Getrocknet 32 Stdn. bei 110° i. Hochvak.

Versuche zur Cyclisierung von **12c**, **12h**, **12i**, **12j** und **12l**

12c: 2 Ansätze von je 470 mg **12c** wurden, wie oben beschrieben, cyclisiert und aufgearbeitet. Nennenswerte bakterio­statische Wirksamkeit⁵²⁾ zeigten weder die drei Fraktionen der Aluminiumoxid-IV-säule (Äthylacetat-Eluat meist <10%) noch die zahlreichen der Cellulosesäulen (LS V für Äthylacetat-, LS VII für Methanol-Eluat), ebenso entstanden keine größeren, kristallisierenden Anteile.

12h: Cyclisierungsversuche mit 1.03 g **12h** ergaben zu 28% hydrogencarbonat-lösliche Anteile und ein neutrales, in Äthylacetat schwerlösliches und daher aus Chloroform/Benzol (1:2) an Aluminiumoxid-IV adsorbiertes Rohprodukt. Die mit Chloroform (20–25%), Aceton und Methanol eluierten Fraktionen waren ebenso wie die Zonen der an Cellulose (LS II) aufgetrennten Chloroformfraktion antibiotisch unwirksam⁵²⁾. Keine kristallisierenden Hauptzonen.

12i: 403 mg **12i** — wie oben angegeben cyclisiert und aufgearbeitet — ergaben neben 40% hydrogencarbonat-löslichen Anteilen (laut Papierchromatogramm (LS VI) Ausgangssubstanz) keine von Aluminiumoxid-IV mit Äthylacetat oder Aceton eluierbaren Fraktionen, sondern nur eine aus mehreren Komponenten bestehende, antibiotisch unwirksame Methanolfraktion.

12j: Aus 810 mg **12j** erhielt man nach Trennung des Rohproduktes an Aluminiumoxid-IV neben den unwirksamen, nicht einheitlichen Aceton- (7 Komponenten) und Methanolfraktionen eine Äthylacetatfraktion (10–25%), die an Cellulose (LS V) eine antibiotisch unwirksame, nicht kristallisierende größere und u. a. sehr schwach wirksame, kleine Zonen ergab, deren Aufarbeitung nicht lohnte.

12l: 435 mg **12l** gaben, wie beschrieben cyclisiert, eine kleine, antibiotisch unwirksame Äthylacetatfraktion (8%, 4–6 Komponenten), eine sehr schwach wirksame Acetonfraktion (<3%) und eine unwirksame, uneinheitliche Methanolfraktion.

⁵²⁾ Plättchenteste gegen *Bac. subtilis* oder *Staph. aureus*.