

Hydrierende Acetylierung von Actinomycinen

Von Prof. Dr. H. BROCKMANN und Dr. B. FRANCK

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen

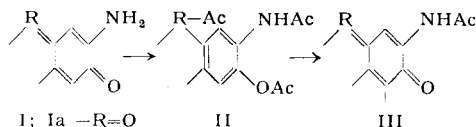
Die reduzierende Acetylierung der Actinomycine mit Zinkstaub-Acetanhydrid (unter Zusatz von Pyridin bzw. Perchlorsäure) liefert hellgelbe, kristallisierte Verbindungen, über deren Acetyl-Gehalt widersprechende Angaben vorliegen^{1, 2, 3}). Nachdem sichergestellt ist, daß sich die Actinomycine I₁, C₂ und C₃⁴) mit Acetanhydrid unter Zusatz von Pyridin bzw. Natriumacetat nicht acetylieren lassen⁵), haben wir die reduzierende Acetylierung der Actinomycine erneut untersucht. Dabei wurde statt Zinkstaub mit Platin aktivierter Wasserstoff verwendet, von dem die Actinomycine unter Bildung einer quantitativ zum Ausgangsmaterial dehydrierbaren Dihydro-Verbindung 1 Mol²) aufnehmen.

Bei dieser hydrierenden Acetylierung (Hydrierung in Acetanhydrid, Entfernung des Katalysators und Acetylierung mit Acetanhydrid-Pyridin unter Wasserstoff) entsteht aus Actinomycin C₃ eine hellgelbe, gegen *Staphylococcus aureus* unwirksame Verbindung ($[\alpha]_D^{20}$: -26°, c = 0,25 in Benzol), die auf die Actinomycin C₃-Formel C₆₄H₉₀O₁₆N₁₂⁶) bezogen drei Acetyl-Reste enthält. Zwei davon werden bereits bei Raumtemperatur durch Methanol verseift, wobei unter Rückoxydation der zunächst gebildeten Dihydro-Verbindung ein rotes, kristallisiertes, antibiotisch unwirksames Mono-acetat vom Fp 249°C ($[\alpha]_D^{20}$: -14°, c = 0,25 in Methanol) entsteht, das ebenso wie Actinomycin C₃ mit Zinn(II)-chlorid und Titan(III)-chlorid keine Farbreaktion gibt. Bei kurzem Erwärmen mit 10proz. Salzsäure auf 60°C wird es zu Actinomycin C₃ verseift, ein Beweis, daß bei der hydrierenden Acetylierung des Actinomycins keine tiefgreifende Veränderung eintritt.

Noch einfacher läßt sich das Mono-acetat gewinnen, wenn man Actinomycin C₃ in Acetanhydrid bis zur Aufnahme von 1 Mol Wasserstoff hydriert und dann die Reaktionslösung, ohne sie mit Pyridin zu behandeln, direkt an der Luft rückoxydiert.

Die Befunde zeigen: 1.) Im Chromophor des Actinomycins C₃ liegt kein normaler Chinon-Ring (Ia) vor; vielmehr deutet die ungewöhnlich leichte Abspaltung von zwei Acetyl-Gruppen aus dem Triacetat darauf hin, daß -R in Formel I kein Sauerstoff ist. 2.) Im Actinomycin C₃ ist eine Gruppe vorhanden, die erst nach Übergang des chinoiden Ringes in einen benzoiden acetylierbar wird. Daß diese Gruppe nur die bereits früher im Chromophor der Actinomycine nachgewiesene Amino-Gruppe⁵) sein kann, ergibt sich aus folgendem: 1.) Actinomycin-C₃-monoacetat zeigt im Gegensatz zum Actinomycin C₃ mit konz. Salzsäure keine Halochromie. 2.) Das Monoacetat läßt sich in Eisessig mit Perchlorsäure nicht wie die Actinomycine als einsäurige Base⁷) titrieren. 3.) Im IR-Spektrum des Monoacetates fehlt die bei 6,30 μ liegende, für primäre Amino-Gruppen charakteristische NH-Deformationsbande der Actinomycine⁸). 4.) Die Absorptionsspektren des Actinomycin C₃-monoacetates und Desamino-actinomycin C₃-mono-acetates⁵) sind identisch.

Ist die Amino-Gruppe dem chinoiden Sauerstoffatom des Chromophors benachbart (I), (wodurch sie den Charakter einer Säureamidamino-Gruppe annimmt), so wird verständlich, daß sie sich erst nach Übergang des chinoiden Ringes in einen benzoiden acetylieren läßt und bei milder Säureeinwirkung unter Bildung von Desamino-actinomycinen⁴) gegen eine in 70proz. Methanol titrierbare Oxy-Gruppe ausgetauscht wird⁸). Das Triacetat wäre dann nach II, das Monoacetat nach III zu formulieren.



I; Ia -R=O

II

III

Wenn sich die Amino-Gruppe des Actinomycins C₃ wie die eines Säureamids verhält, sollte man erwarten, daß die NH-Gruppe von III schwach sauer ist und sich dementsprechend wie die NH-Gruppe von Diacylamiden z. B. Phthalimid acetylieren läßt. Tatsächlich zeigt unser Monoacetat schwach sauren Charakter; es läßt sich im Gegensatz zu Actinomycin C₃ mit 2 n NaOH aus Äther ausschütteln und bildet mit Pyridin-Acetanhydrid ein rotes,

kristallisiertes Diacetat vom Fp 237°C ($[\alpha]_D^{20}$: -123°, c = 0,25 in Methanol), das gegen *St. aureus* in Verdünnungen oberhalb 1:50000 unwirksam ist.

Umsatz des Actinomycin C₃-monoacetates mit Methyljodid-Silberoxyd lieferte eine in derben, roten Prismen vom Fp 249°C ($[\alpha]_D^{20}$: +30°, c = 0,25 in Methanol) kristallisierende Verbindung, die das Wachstum von *St. aureus* bis zur Verdünnung 1:10000 hemmt. Ihre Analysenzahlen passen auf ein N-Methyl-N-acetyl-actinomycin C₃.

Bei der hydrierenden Acetylierung von Desamino-actinomycin C₃-monoacetat⁵) entstand ein hellgelbes, antibiotisch unwirksames Triacetat, das durch 0,1 n Ammoniak zu Desamino-actinomycin C₃ verseift wurde.

Eingegangen am 12. Dezember 1955 [Z 282]

Aufspaltung der Actinomycine zu Actinomycinsäuren

Von Prof. Dr. H. BROCKMANN und Dr. B. FRANCK

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen

Wie kürzlich gezeigt¹⁾, werden die Actinomycine durch 0,1 n methanolisches Alkali bei 40°C unter Freisetzung saurer Gruppen verändert. Um Einblick in diese Reaktion zu gewinnen, haben wir Proben von 100 mg Actinomycin C₃²⁾ 0,5, 2, 4, 6, 11 und 21 h mit 0,1 n methanolischem Alkali (10% Wasser enthaltend) bei 40°C hydrolysiert und die verbrauchte Alkalimenge durch potentiometrische Titration in 70proz. Methanol ermittelt. Nach jeder Titration wurde die angesäuerte Reaktionslösung mit Chloroform extrahiert und der Rückstand des Chloroform-Auszuges nach Ermittlung der spezif. Drehung einer quantitativen Ring-Papierchromatographie (n-Butanol-n-Dibutyläther (3:2)/10proz. wäbr. Natrium-m-kresotinat-Lösung) unterworfen. Dabei fanden wir, daß der Alkaliverbrauch innerhalb der ersten 4 h schnell auf 2 Äquival. anstieg, dann sehr träge wurde, und nach 21 h 2,7 Äquival. erreichte ($[\alpha]_D^{20}$ des Reaktionsproduktes: -69°, c = 0,25, in Methanol).

Nach 4 h Hydrolyse fand sich im Papierchromatogramm kein Actinomycin C₃ mehr und ebensowenig ließen sich im Hydrolysat Aminosäuren oder Ammoniak nachweisen. Das gelbe Reaktionsprodukt ($[\alpha]_D^{20}$: -103°, c = 0,25, in Methanol) bildete im Ringchromatogramm (n-Butanol-n-Dibutyläther (3:2)/10proz. wäbr. Natrium-m-kresotinat-Lösung) zwei dicht beieinander liegende Zonen (R_f-Werte kleiner als die des Actinomycins C₃) und eine langsamer wandernde, die alle die gleiche Farbe zeigten wie Actinomycin-Zonen. Bei präparativen Versuchen an Cellulose-Säulen (n-Butanol-n-Dibutyläther 4:1/Boratspuffer vom p_H 8,2) ließen sich die beiden schnell laufenden Spaltprodukte zwar nicht voneinander, wohl aber von dem langsamer wandernden abtrennen, dessen Menge etwa 80% des Ausgangsmaterials betrug. Dieses Hauptprodukt war antibiotisch unwirksam und bildete im Ringchromatogramm mit drei verschiedenen Phasenpaaren eine einheitliche Zone. Es enthält, wie seine potentiometrische Titration in 70proz. Methanol zeigte, zwei saure Gruppen, deren p_{Ka}-Werte denen von Carboxy-Gruppen entsprechen und die sich mit Methyljodid-Silberoxyd unter Bildung eines gelben Dimethylesters methylieren lassen. Dem Natriumsalz der Säure fehlt die für Actinomycine charakteristische Bande bei 5,7 μ¹) (Ester- bzw. Lacton-carbonyl-Bande). Wir bezeichnen dieses Spaltprodukt als Actinomycin-C₃-säure. Ebenso wie die Actinomycine enthält Actinomycin-C₃-säure laut potentiometrischer Titration (Perchlorsäure-Eisessig) nur eine schwach basische Gruppe, zeigt mit konz. Salzsäure Halochromie, gibt mit Zinn(II)-chlorid keine Grünfärbung und stimmt in der Lage seiner Absorptionsmaxima mit Actinomycin C₃ überein. Während Actinomycin gegen Perjodsäure in Eisessig bei 30°C beständig ist, entsteht aus Actinomycin-C₃-säure unter diesen Bedingungen ein gelbes Oxydationsprodukt, in dessen Totalhydrolysat kein Threonin nachweisbar ist.

Aus diesen Befunden ergibt sich: 1.) Bei milder Alkalieinwirkung bleibt der Chromophor der Actinomycine offenbar intakt. 2.) Der Alkaliverbrauch beruht nicht, wie früher angenommen¹⁾, auf Abspaltung esterartig gebundener Säurereste. 3.) Bei der Alkalihydrolyse entstehen keine Amino-Gruppen, d. h. die beiden freiwerdenden Carboxyle sind im Actinomycin mit Oxy-Gruppen verknüpft. 4.) Von diesen Verknüpfungen sind entgegen unserer früheren Vermutung¹⁾ nicht mehr als zwei im Actinomycin C₃ vorhanden. Daß es sich um Lactongruppen handelt, hat die methylierende Acetylierung³⁾ der Actinomycinsäure gezeigt, denn

¹⁾ H. Brockmann u. B. Franck, Chem. Ber. 87, 1767 [1954].

²⁾ H. Brockmann u. H. Gröne, ebenda 87, 1036 [1954].

³⁾ W. Graßmann, H. Hörmann u. H. Endres, Chem. Ber. 86, 1477 [1953].

¹⁾ S. A. Waksman u. M. Tishler, J. biol. Chemistry 142, 519 [1942].

²⁾ H. Brockmann, N. Grubhofer, W. Kass u. H. Kalbe, Chem. Ber. 84, 260 [1951].

³⁾ A. W. Johnson, A. R. Todd u. L. C. Vining, J. chem. Soc. [London] 1952, 2672.

⁴⁾ H. Brockmann u. H. Gröne, Chem. Ber. 87, 1036 [1954].

⁵⁾ H. Brockmann u. B. Franck, Chem. Ber. 87, 1767 [1954]; B. Franck, unveröffentl.

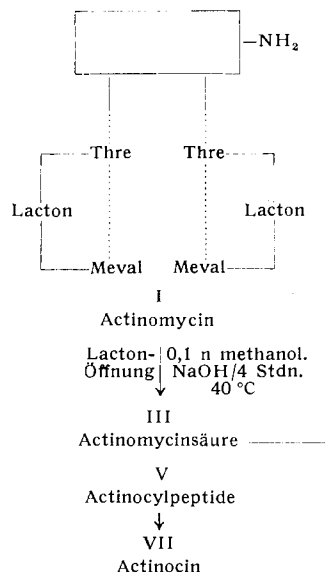
⁶⁾ H. Brockmann u. B. Franck, diese Ztschr. 68, 70 [1956].

⁷⁾ H. Brockmann u. E. Meyer, Chem. Ber. 86, 1514 [1953].

⁸⁾ Vgl. auch A. Butenandt, U. Schiedt u. E. Biekert, Liebigs Ann. Chem. 588, 108 [1954].

dabei erhielten wir eine in gelben Blättchen kristallisierende Verbindung, deren Analysenzahlen gut auf die Formel $C_{64}H_{90}O_{18}N_2$ ($(OCH_3)_2(CO \cdot CH_3)_2$) passen. Der Übergang von Actinomycin C_3 in Actinomycin- C_3 -säure besteht demnach in einer Aufspaltung von zwei Lacton-Ringen. Die dabei frei werdenden Oxy-Gruppen gehören zweifellos den beiden Threonin-Molekeln⁴⁾ des Actinomycins C_3 an.

Setzt man die Actinomycin- C_3 -säure nach Turner und Schmerzler⁵⁾ mit Acetanhydrid-Pyridin um, so fehlt im Hydrolysat des Reaktionsproduktes N-Methyl-valin. Die beiden Carboxy-Gruppen der Actinomycin- C_3 -Säure gehören also den beiden im Actinomycin C_3 nachgewiesenen⁴⁾ N-Methyl-valin-Molekeln an, die demnach das Ende von zwei am Chromophor hängenden Peptidketten bilden. Da beim Hydrazinabbau des Actinomycins C_3 mehr als 1 Mol N-Methyl-valyl-sarkosin-anhydrid entsteht⁶⁾, muß die dem N-Methyl-valin benachbarte Aminosäure in beiden Peptidketten Sarkosin sein. Auf Grund unserer Befunde läßt sich für Actinomycin C_3 die Teilformel I aufstellen.



Das an der Cellulose-Säule von Actinomycin- C_3 -säure leicht abtrennbare Gemisch der beiden oben erwähnten Nebenprodukte enthält, bezogen auf das Mol.-Gew. 1300 eine Methoxy-Gruppe und zeigt nach Umsetzung mit Acetanhydrid-Pyridin⁵⁾ und anschließender Hydrolyse im Papierchromatogramm noch N-Methylvalin. Durch weitere Hydrolyse mit 0,1 n Alkali gehen die beiden Nebenprodukte in Actinomycin- C_3 -säure über. Nach unseren bisherigen Ergebnissen sind die beiden im Ringchromatogramm trennbaren Nebenprodukte Actinomycin- C_3 -säure-halbest, von denen nach I zwei zu erwarten sind. Ihre Entstehung ist nicht überraschend, da bei Einwirkung von alkoholischem Alkali auf Lactone⁷⁾ und Ester⁸⁾ zunächst schnell Umesterung der Carboxy-Gruppe stattfindet und erst anschließend in einer langsamer verlaufenden Reaktion die Ester-Gruppe verseift wird.

Die bisherigen Ergebnisse unseres Arbeitskreises bei saurer und alkalischer Hydrolyse der Actinomycine sind in dem vorstehenden Schema wiedergegeben.

Eingegangen am 12. Dezember 1955 [Z 283]

Konstitution und Synthese des Actinomycin-Chromophors

Von Prof. Dr. H. BROCKMANN und Dr. H. MUXFELDT
Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen

Bei energischer Säurehydrolyse des Actinomycins C wurden als kristallisierte Abbauprodukte Desamino-actinoacyl-threonin^{9,10)}, Actinocinin^{9,10)}, 3-Oxy-1,8-dimethyl-phenoxazon-(2)¹¹⁾ und 2,5-Dioxy-toluchinon¹¹⁾ gefaßt. Actinocinin ist, wie durch Synthese

⁴⁾ H. Brockmann u. G. Bohnsack, Naturwissenschaften 40, 223 [1953].

⁵⁾ R. A. Turner u. G. Schmerzler, J. Amer. chem. Soc. 76, 950 [1954].

⁶⁾ G. Bohnsack, Dissertation Göttingen 1955; H. Brockmann, G. Bohnsack u. C. Salling, diese Ztschr. 68, 66 [1956].

⁷⁾ T. L. Gresham, J. E. Jansen, F. W. Shaver, J. T. Gregory u. W. L. Bears, J. Amer. chem. Soc. 70, 1004 [1948].

⁸⁾ M. Reiner u. H. R. Downes, J. Amer. chem. Soc. 43, 945 [1921]; E. Fischer, Ber. dtsh. chem. Ges. 53, 1634 [1920].

⁹⁾ H. Gröne, Dissertation, Göttingen 1954.

¹⁰⁾ H. Brockmann u. H. Gröne, diese Ztschr. 68, 66 [1956].

¹¹⁾ H. Brockmann u. H. Muxfeldt, diese Ztschr. 68, 67 [1956].

bewiesen¹²⁾, 3-Oxy-1,8-dimethyl-phenoxazon-(2)-carbonsäure-(5) und Desamino-actinoacyl-threonin besteht offenbar aus 3-Oxy-1,8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4,5) (I), an deren einer Carboxy-Gruppe Säureamid-artig gebunden eine Threonin-Molekel hängt.

Die Absorptionskurven von Desamino-actinoacyl-threonin⁹⁾ und Actinocinin⁹⁾ sind denen der Desamino-actinomycine¹³⁾ ähnlich, und ähnlich ist auch bei allen diesen Verbindungen die charakteristische Änderung des Absorptionsspektrums, die eintritt, wenn die Oxy-Gruppe ihres chinoiden Ringes acetyliert wird. Gemeinsam ist ihnen ferner die intensive, grüne Farbreaktion mit Zinn(II)-chlorid^{9,13)}. Nichts spricht daher gegen die Annahme, daß der Chromophor der Desamino-actinomycine die im Desamino-actinoacyl-threonin enthaltene, von uns Desamino-actinoein genannte 3-Oxy-1,8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4,5) (I) ist, deren Carboxy-Gruppen die Säureamid-artige Verknüpfung mit dem Peptid-Teil der Desamino-actinomycine ermöglichen.

Wenn I der Chromophor der Desamino-actinomycine ist, müßte die 3-Amino-1,8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4,5) (Ia) — im folgenden Actinoein genannt — der Chromophor der Actinomycine sein, denn beim Übergang der Actinomycine in Desamino-actinomycine wird lediglich eine im chinoiden Ring des Actinomycin-chromophors stehende Amino-Gruppe gegen eine Oxy-Gruppe ausgetauscht¹³⁾.

II
Desamino-actinomycin

IV
Desamino-actinomycinsäure

VI
Desamino-actinoacylpeptide

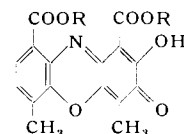
VIII
Desamino-actinoacylthreonin

IX
Desamino-actinocin

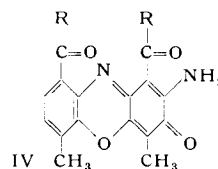
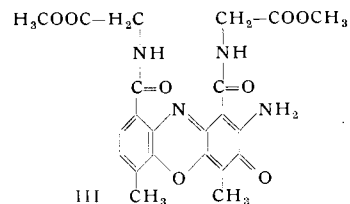
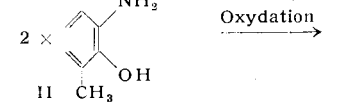
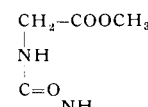
X
Actinocinin

XI
3-Oxy-1,8-dimethyl-phenoxazon-(2)

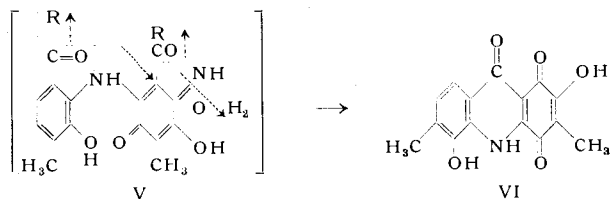
XII
2,5-Dioxy-toluchinon



I R=H
Ia R=H, OH=NH2
Ib R=CH3, OH=NH2
Ic R=CH3



Ba(OH)2



Um diese Annahme zu bestätigen, haben wir zunächst aus 2-Nitro-3-oxy-4-methyl-benzoesäure-methylester durch Reduktion mit Natriumdithionit die entsprechende Amino-Verbindung hergestellt und sie durch oxydative Kondensation in den in orange-farbenen Nadeln (Zers. oberhalb 200 °C) kristallisierenden 3-Amino-1,8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4,5)-dimethylester (Ib) übergeführt. Seine Absorptionskurve in Methanol ist der der Actinomycine ähnlich, doch fehlt der langwelligen Bande die für Actinomycine charakteristische Schulter. Durch Kochen mit 50 proz. Essigsäure läßt sich die Amino-Gruppe von Ib

¹²⁾ H. Brockmann u. H. Muxfeldt, diese Ztschr. 68, 67 [1956].

¹³⁾ H. Brockmann u. B. Franck, Chem. Ber. 87, 1767 [1954].