

Temperatur ca. $\frac{1}{2}$ h auf 130 °C, evakuiert kurz zur Entfernung der in der Schmelze noch vorhandenen Gasbläschen und röhrt 20 g Butandiol-(1.4) ein. Nunmehr gießt man die homogene Schmelze in vorbereitete Formen und führt die Polyaddition bei 100 °C zu Ende. Bereits nach 2 bis 3 min tritt eine Viscositätsverhöhung ein, die zu einem Gelieren der Schmelze führt. Nach etwa 20 min können die entstandenen Gießlinge entformt werden. Durch 24-stündiges Nachheizen bei 100 °C erhalten sie ihre endgültigen Eigenschaften.

Zugfestigkeit 300 kg/cm ²	Weiterreißfestigkeit 55 kg
Bruchdehnung 650 %	Stoßelastizität 50
Bleibende Dehnung 15 %	Shore Härte A 80

b) Hartvulkollan (Allophanat-Vernetzung)

Werden unter den unter a) angegebenen Reaktions- und Verarbeitungsbedingungen 1000 g Glykol-Adipinsäure-Polyester mit der OH-Zahl 56, 300 g Naphthalin-1,5-diisocyanat und 70 g Butandiol-(1.4) umgesetzt, so entsteht ein Material mit den folgenden Eigenschaften:

Zugfestigkeit 300 kg/cm ²	Weiterreißfestigkeit 70 kg
Bruchdehnung 450 %	Stoßelastizität 45
Bleibende Dehnung 35 %	Shore Härte A 93

c) Vulkollan (Kettenverlängerung über Harnstoff- und Vernetzung über Biuret-Gruppen).

In 1000 g Glykol-Adipinsäure-Polyester mit der OH-Zahl 56 werden nach dem Entwässern bei 130 °C/12 mm 200 g Toluol-2,4-diisocyanat eingerührt. Nach eingetretener Addition ist die Temperatur auf 142 °C angestiegen. Man hält die Schmelze noch $\frac{1}{2}$ h auf 130 °C, evakuiert kurz zur Entfernung der Luftblasen und führt dann 135 g geschmolzenes 4,4'-Diamino-3,3'-dichlor-diphenylmethan ein. Nun gießt man sofort in Formen aus. Schon nach wenigen Minuten beginnt die Verfestigung der Schmelze. Durch 24-stündiges Nachheizen der Formkörper auf 100 °C wird ein kautschukelastisches Material mit folgenden Eigenschaften erhalten:

Zugfestigkeit 234 kg/cm ²	Weiterreißfestigkeit 37 kg
Bruchdehnung 440 %	Stoßelastizität 31
Bleibende Dehnung 11 %	Shore Härte A 84

d) Vulkollan (über vorkondensierte u. lagerfähige Zwischenstufen)

1000 g eines Glykol-Adipinsäure-Polyesters mit der OH-Zahl 60 werden 1 h bei 100 °C/20 mm entwässert. Anschließend röhrt man 45 g cis-1,4-Dihydroxy-cyclohexan ein und läßt auf 100 °C abkühlen. Nach gutem Verrühren werden 125 g Benzol-1,4-diisocyanat hinzugefügt. Sind 125 °C erreicht, dann drückt man die Schmelze ab und heizt 15 h bei 100 °C nach. Das erhaltene lagerfähige Material läßt sich zu einem glatten Fell auswalzen. Nach dem Einwalzen von 9 g dimarem Toluol-2,4-diisocyanat (Desmodur TT) auf 100 g des lagerfähigen Materials wird nach dem Verpressen bei 150 °C ein kautschukelastisches Produkt erhalten.

Zugfestigkeit 315 kg/cm ²	Weiterreißfestigkeit 37 kg
Bruchdehnung 595 %	Stoßelastizität 46
Bleibende Dehnung 13 %	Shore Härte A 79

e) Vernetzung eines verlängerten Polyesters mit Peroxyden

Zu 1000 g eines Glykol-Adipinsäure-Polyesters mit der OH-Zahl 56 gibt man nach der Entwässerung bei 130 °C 20 g Butandiol-(1.4) und anschließend 181 g Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat. Man röhrt noch ca. 3 min nach und gießt dann das Reaktionsprodukt in Büchsen aus, in denen es 24 h bei 100 bis 110 °C nachgeheizt wird. Es wird so ein rohkautschukartiges Material erhalten, das bei 80 °C einen Dcf-Wert von 1500/29 aufweist.

Mit diesem Pre-elastomeren wird auf der Walze folgende Mischung hergestellt: 100 g Polyurethanmasse, 30 g Aktivruß, 8 g Diicumperoxyd 40-proz. Nach einer Vulkanisationsdauer von 25 min bei 150 °C unter der Presse wird ein „Vulkanisat“ mit den folgenden mechanischen Eigenschaften erhalten:

Zugfestigkeit 381 kg/cm ²	Weiterreißfestigkeit 26 kg
Bruchdehnung 475 %	Stoßelastizität 46
Bleibende Dehnung 6 %	Shore Härte A 65

f) Vernetzung eines verlängerten Polyesters mit Formaldehyd

500 g eines Tetramethylen-polyäthers mit der OH-Zahl 42 und 75 g N,N-Di-(β -hydroxy-äthyl)-3,5-dimethyl-anilin werden $\frac{1}{2}$ h bei 130 °C/18 mm entwässert. Sobald die Temperatur auf 90 °C gefallen ist, röhrt man 95 g eines Gemisches aus 70 g Toluol-2,4-diisocyanat und 30 g Toluol-2,6-diisocyanat ein. Man hält die Temperatur 1 h auf 90 °C. Die viscose Schmelze wird nach dem Ausgießen auf Bleche 12 h bei 100 °C nachgeheizt.

Nach dem Auswalzen zu einem glatten Fell werden in 200 g desselben 80 g Ruß, 2,5 g Paraformaldehyd und 0,4 g Zinkchlorid homogen eingearbeitet. Die Vernetzung und Formgebung geschieht bei 140 bis 150 °C in 30 min unter der Presse. Das erhaltene Material besitzt folgende mechanischen Eigenschaften:

Zugfestigkeit 211 kg/cm ²	Weiterreißfestigkeit 25 kg
Bruchdehnung 375 %	Stoßelastizität 42
Bleibende Dehnung 6 %	Shore Härte A 65

g) Vernetzung eines verlängerten Polyesters mit Schwefel

1 kg eines Glykol-Adipinsäure-Polyesters der OH-Zahl 56 wird bei 130 °C/12 mm entwässert. Bei dieser Temperatur werden 263 g Diphenylmethan-4,4'-diisocyanat in die Schmelze eingerührt. Man heizt etwa $\frac{1}{2}$ h auf 130 bis 140 °C nach, läßt dann auf 90 °C abkühlen und gibt unter gutem Rühren auf einmal 108 g N,N-Di-(β -hydroxy-äthyl)-3,5-dimethyl-anilin hinzu. Ohne weitere Zuführung von Wärme erfolgt ein Temperaturanstieg auf etwa 100 bis 130 °C bei gleichzeitiger Zunahme der Viscosität. Nach weiteren 10 min (solange die Schmelze noch rührbar ist) gießt man auf Bleche aus und heizt 24 h bei 100 °C nach. Es ist ein thermoplastisches, walzbare Fell entstanden.

In 100 g dieses Produktes werden eingewalzt: 1,5 g Schwefel, 1 g 2-Mercapto-benzothiazol, 3 g Bis-(2-mercaptopo-benzothiazyl)-disulfid, 0,5 g Zinkchlorid-Komplex des Bis-(2-mercaptopo-benzothiazyl)-disulfids, 30 g Ruß, 1 g Stearinsäure. Die Mischung wird bei 150 °C 30 min verpreßt und liefert ein Elastomeres mit folgenden Eigenschaften:

Zugfestigkeit 238 kg/cm ²	Weiterreißfestigkeit 18 kg
Bruchdehnung 640 %	Stoßelastizität 45
Bleibende Dehnung 36 %	Shore Härte A 65

Eingegangen am 1. September 1960 [A 84]

Die Actinomycine

Von Prof. Dr. HANS BROCKMANN

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen

Herrn Prof. Dr. Dr. E. h. U. Haberland zum 60. Geburtstag gewidmet

Es wird zusammenfassend über Arbeiten zur Konstitutionsaufklärung und Synthese der Actinomycine berichtet. Anschließend werden die strukturellen Unterschiede, die Biosynthese, die Nomenklatur und die Derivate der Actinomycine erörtert.

I. Einleitung

Unter den aus Erdproben isolierten, im Antibiotica-Test positiven Streptomycesen findet man nicht selten solche, die Nährmedium und Mycel gelb färben. In den meisten Fällen führt die gelbe Färbung ebenso wie die antibiotische Wirksamkeit von Actinomycinen her, gelben Chromopeptiden, deren Molekulargewicht um 1280 herum liegt. Da actinomycinbildende Streptomycesen weit verbreitet und Actinomycine leicht aus Kulturlösung oder Mycel zu gewinnen sind, nimmt es nicht wunder, daß ihr zuerst aufgefunder Ver-

treter, das Actinomycin A¹), zugleich das erste Antibioticum überhaupt gewesen ist, das man kristallisiert aus Mikroorganismen isoliert hat.

Da die Actinomycine wegen ihrer Giftigkeit als Antibiotica praktisch wertlos sind, hat man sie zunächst wenig beachtet. Medizinisches Interesse haben sie erst gewonnen, seit Chr. Hackmann²) im Tierversuch ihre tumorhemmende

¹⁾ S. A. Waksman u. H. B. Woodruff, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 15, 609 [1940].

²⁾ Chr. Hackmann, Z. Krebsforsch. 58, 607 [1952]; 60, 250 [1954]; Strahlentherapie 90, 296 [1953]; Med. Klin. 49, 1539 [1954].

Wirkung nachwies, G. Schulte³) eine günstige Wirkung bei Lymphogranulomatose (Hodgkinsche Krankheit) beobachtete und bei bestimmten menschlichen Tumoren eine cytostatische Wirkung nachgewiesen wurde. Auf einem kürzlich von der New York Academy of Sciences abgehaltenen Symposium „The Actinomycins and their Importance in the Treatment of Tumors in Animals and Man“ ist ausführlich über die bisherigen biologischen und klinischen Untersuchungen zur Tumorhemmung der Actinomycine berichtet worden^{4, 5}.

Einen ersten Einblick in die Konstitution der Actinomycine erhielt man erst neun Jahre nach ihrer Entdeckung durch Untersuchungen von A. R. Todd und Mitarbeitern⁶) sowie von H. Brockmann und N. Grubhofer⁷), die zeigten, daß die Actinomycine Chromopeptide sind. Bald darauf gelang unserem Arbeitskreis der Nachweis, daß die bis dahin untersuchten Actinomycinpräparate Gemische mehrerer Actinomycine gewesen waren und daß sich solche Gemische durch Gegenstromverteilung⁸) oder Verteilungchromatographie analytisch und präparativ in ihre Komponenten zerlegen lassen. Dadurch wurde es möglich, 1. Actinomycine durch R_F -Werte zu charakterisieren und identifizieren; 2. durch systematische Durchmusterung actinomycinbildender Stämme festzustellen, wieviele verschiedene Actinomycine es gibt und 3. alle Versuche zur Konstitutionsaufklärung mit einheitlichem Ausgangsmaterial durchzuführen.

Als erste einheitliche Vertreter wurden in unserem Institut die Actinomycine C₁, C₂, C₃⁹) und X₂¹⁰) isoliert. Hinzu kamen später die Actinomycine C_{2a}¹¹), X₀₉¹²), X_{0Y} und X_{1a}¹³). Durch Untersuchungen anderer Autoren (vgl. Abschnitt V) hat sich die Zahl der kristallisiert isolierten Actinomycine inzwischen auf 19 erhöht; weitere wurden bisher nur amorph erhalten. Zählt man von ihnen nur die leidlich gut charakterisierten, so sind bis jetzt mindestens 27 Actinomycine bekannt. Nur fünf von ihnen (C₁, C₂, C₃, X₀₉ und X₂) finden sich in größerer Menge in „natürlichen“ Actinomycin-Gemischen¹¹).

Nachdem einheitliche Actinomycine zur Verfügung standen, haben wir uns zunächst bemüht, die Konstitution eines Vertreters vollständig aufzuklären; 1956 konnten wir für Actinomycin C₃ eine Konstitutionsformel vorschlagen¹⁵), die inzwischen in allen Einzelheiten bestätigt^{16, 17}) und kürzlich auch durch Synthese gesichert¹⁸) werden konnte. Die Anwendung der beim Actinomycin C₃ bewährten Abbauverfahren auf andere Actinomycine hat deren Struktur soweit klargestellt, daß sich heute annähernd überschén läßt, in welchem Rahmen die Zelle das Actinomycin-Molekül modifizieren kann.

Weitere Untersuchungen unseres Instituts galten der Frage, ob sich Actinomycinderivate gewinnen lassen, deren cytostatische

Wirksamkeit besser und deren Toxizität geringer ist als die der Actinomycine selber. Im folgenden ist das Wesentliche zusammengefaßt, was seit unserem ersten, in dieser Zeitschrift erschienenen Bericht¹⁹) auf dem Actinomycingebiet bekannt geworden ist.

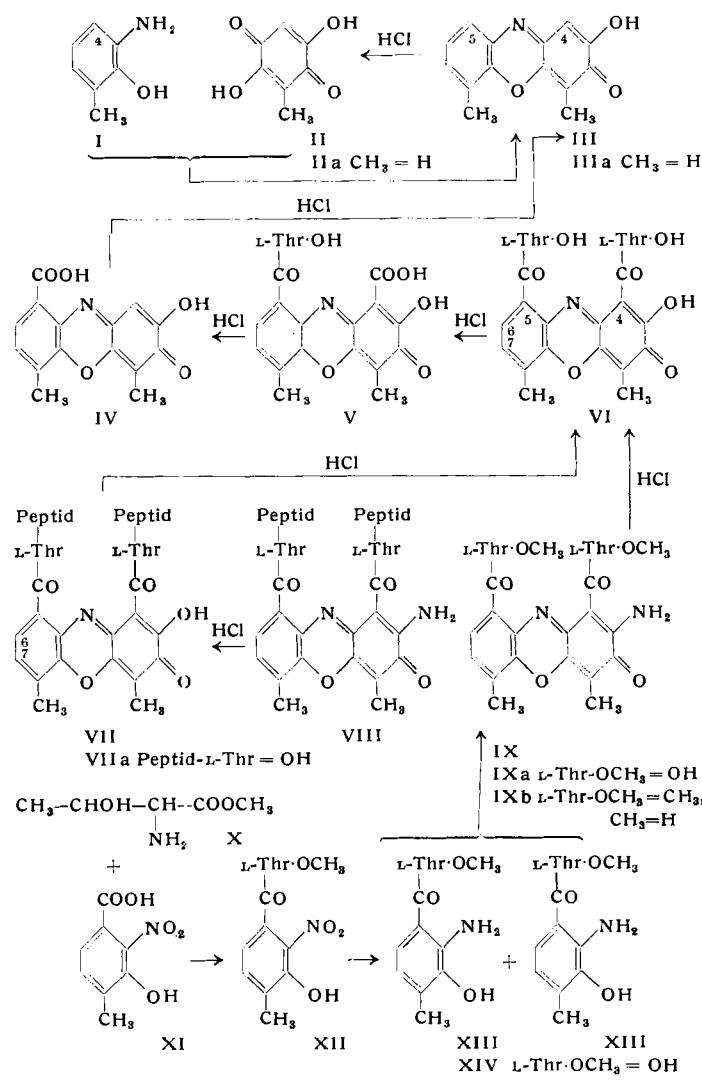
II. Die Konstitutionsaufklärung des Actinomycins C₃

Um die Konstitution des Actinomycins C₃ aufzuklären, waren seiner Chromopeptid-Natur entsprechend zwei ihrem Thema nach verschiedene Aufgaben zu lösen: 1. Die Aufklärung eines gelbroten Farbstoffes und 2. die Aufklärung eines aus sechs Aminosäuren und vier N-Methyl-aminoacids aufgebauten Peptidteils.

a) Aufklärung und Synthese des Chromophors²⁰)

Die Strukturaufklärung des für die gelbrote Farbe verantwortlichen Molekülteils, im folgenden Chromophor genannt, gelang durch hydrolytischen Abbau des Actinomycins C₃ mit Salzsäure oder Bromwasserstoffsäure verschiedener Konzentration. Die Konstitution der isolierten Abbauprodukte wurde bei fast allen durch Synthese bewiesen. Es sollen zuerst diejenigen besprochen werden, die sich bei Hydrolyse mit 10- oder 20-proz. Salzsäure bei 60 bis 80 °C bilden.

Unter diesen Bedingungen wird zunächst aus dem Chromophor unter Freisetzung von 1 Mol Ammoniak eine Aminogruppe abgespalten und durch eine Hydroxygruppe ersetzt. In fast quantitativer Ausbeute entsteht kristalli-



²⁰) H. Brockmann u. H. Muxfeldt, Angew. Chem. 68, 69 [1956]; Chem. Ber. 91, 1242 [1958].

siertes Desamino-actinomycin C₃²¹), das noch den intakten Peptidteil des Actinomycins C₃ enthält, aber keine antibiotische oder toxische Wirkung mehr zeigt. Vom Actinomycin C₃ unterscheidet es sich u. a. durch sein Absorptionsspektrum und besonders charakteristisch dadurch, daß es mit Zinn-II-chlorid zu einem tiefgrünen Semichinon reduziert wird.

Längere Hydrolyse des Actinomycins C₃ mit 20-proz. Salzsäure bei 80 °C baut den Peptidteil des zunächst entstandenen Desamino-actinomycins C₃ ab, wobei das Kernstück des Desamino-actinomycin-Chromophors allmählich herausgeschält und z. T. weiter aufgespalten wird. Das seinem Molekulargewicht nach kleinste Abbauprodukt, das aus solchen Hydrolysaten abzutrennen war, wurde als 2,5-Dihydroxy-toluchinon (II) identifiziert. Das nächst größere war eine rote, kristallisierte, sehr schwach basische Verbindung C₁₄H₁₁NO₃ mit zwei C-Methylgruppen und einer Acetylgruppe.

Die Identifizierung dieses Spaltproduktes hat den Schlüssel zur Aufklärung des Actinomycin C₃-Chromophors geliefert. Sie gelang auf Grund folgender Befunde und Überlegungen. Das rote Abbauprodukt gab mit Zinn(II)-chlorid ein blaues Semichinon und mit o-Phenyldiamin ein Phenazinderivat. Da es seinem Redoxpotential nach kein o-Chinon sein konnte, mußte seine Kondensation mit o-Phenyldiamin auf Anwesenheit einer Gruppierung beruhen, in der eine chinoide Carbonylgruppe einer Hydroxygruppe benachbart ist. Ferner konnte als sehr wahrscheinlich gelten, daß das 2,5-Dihydroxy-toluchinon (II) im Lauf der Salzsäurehydrolyse aus dem roten Abbauprodukt hervorgeht.

Da das rote Abbauprodukt zwei C-Methylgruppen enthält, mußte seine Stammverbindung die Formel C₁₂H₇NO₃ haben. Von dieser Stammverbindung war zu erwarten, daß sie mit Zinn(II)-chlorid und o-Phenyldiamin genau so reagiert wie das rote Abbauprodukt, bei Hydrolyse mit Salzsäure jedoch statt 2,5-Dihydroxytoluchinon (II) das 2,5-Dihydroxy-benzochinon (IIa) liefert. Damit lief die Konstitutionsaufklärung der Stammverbindung auf die Beantwortung folgender Fragen hinaus: Welche gelbroten, heterocyclischen Verbindungen der Formel C₁₂H₇NO₃ geben 1. mit o-Phenyldiamin ein Phenazinderivat, 2. mit Zinn-II-chlorid ein blaues Semichinon und 3. beim Erhitzen mit Salzsäure 2,5-Dihydroxy-benzochinon (IIa). Wie eine Durchmusterung heterocyclischer Verbindungen zeigte, entspricht diesen Anforderungen einzig und allein das schon lange bekannte 3-Hydroxy-phenoazon-(2) (IIIa), das damit als Stammverbindung des roten Abbauproduktes erkannt war. Dieses selbst mußte infolgedessen eines der acht isomeren C-Dimethyl-Derivate von IIIa sein; welches, ließ sich durch Synthese zeigen. Denn als man nacheinander die vier isomeren C-Monomethyl-Derivate des o-Aminophenols mit II kondensierte, zeigte sich, daß das aus 3-Amino-2-hydroxytoluol (I) und II entstandene, dessen Konstitution III auch noch auf anderem Wege gesichert werden konnte, mit dem roten Abbauprodukt identisch war.

Spektroskopisch und in seinen Farbreaktionen war das rote Abbauprodukt (III) dem Desamino-actinomycin C₃ sehr ähnlich, und da es nicht weiter abgebaut werden konnte, ohne diese Ähnlichkeit zu verlieren, durfte als sicher gelten, daß man in ihm das Kernstück des Desamino-actinomycin C₃-Chromophors in Händen hatte.

Die Frage, wie dieses Kernstück im Desamino-actinomycin C₃ mit dem Peptidteil verbunden ist und ob sich außer diesem bei der Säurehydrolyse des Actinomycins C₃ noch

andere Gruppen vom Kernstück des Chromophors ablösen, wurde durch Isolierung und Aufklärung von drei weiteren Hydrolyseprodukten des Actinomycins C₃ beantwortet. Das dem Molekulargewicht nach kleinste, Actinocinin genannt²²), war eine in Spektrum und Farbreaktionen dem roten Abbauprodukt III sehr ähnliche Monocarbonsäure, für die durch Synthese (Kondensation der 4-Carbonsäure von I mit II) die Konstitution IV bewiesen wurde.

Für das nächst größere, das Desamino-actinocinyl-threonin²³) ergab sich durch Abbau und Synthese²⁴) die Formel V, und auch das dritte²⁴) ließ sich durch eine Synthese aufklären. Ausgangsmaterial waren L-Threonin-methylester (X) und 2-Nitro-3-hydroxy-4-methylbenzoësäure (XI), die mit Hilfe von Dicyclohexyl-carbodiimid zu XII gekuppelt wurden. Katalytische Hydrierung reduzierte dessen Nitrogruppe und gab XIII, das bei Oxydation mit Kalium-hexacyanoferrat(III) das 3-Amino-phenoazon-Derivat IX lieferte²⁵). Kochen dieser Verbindung mit Salzsäure führte unter Verseifung der Estergruppe und Austausch der Amino- gegen eine Hydroxygruppe zur Verbindung VI, die mit dem Abbauprodukt identisch war.

Damit war gezeigt, daß im Desamino-actinomycin C₃ das Chromophor-Kernstück III über zwei an C-4 und C-5 stehende Carboxygruppen säureamidartig mit zwei L-Threoninresten des Peptidteils verknüpft ist. Waren im Desamino-actinomycin C₃ die C-Atome 6 und 7 des Phenoazon-Gerüstes mit Gruppen verbunden, die in den Abbauprodukten III, IV, V, VI nicht mehr vorhanden sind, so müßten diese Gruppen so beschaffen sein, daß sie 1. spektroskopisch nicht in Erscheinung treten und 2. bei der Säurehydrolyse durch Wasserstoff ersetzt werden. Da es keine Substituenten gibt, die beide Bedingungen erfüllen, durfte man sicher sein, daß Desamino-actinomycin C₃ an den C-Atomen 6 und 7 nicht substituiert ist, und ihm die Teilformel VII zuschreiben. Für Actinomycin C₃, das sich von Desamino-actinomycin C₃ nur dadurch unterscheidet, daß sein Chromophor an Stelle der Hydroxygruppe eine Aminogruppe enthält²¹), ergab sich damit die Teilformel VIII. Ihr zufolge ist die 3-Amino-1,8-dimethyl-phenoazon-dicarbonsäure-(4,5) (IXa), die man Actinocin genannt hat, der Chromophor des Actinomycins C₃. Die Synthese des Actinocins gelang durch oxidative Kondensation von zwei Molekülen 2-Amino-3-hydroxy-4-methylbenzoësäure (XIV). Den Chromophor VIIa des Desamino-actinomycins (VII) hat man als Desamino-actinocin bezeichnet und die Verbindung VI dementsprechend als Desamino-actinocinyl-bis-[L-threonin].

b) Despeptido-actinomycin

Eine merkwürdige Umlagerungsreaktion erleidet der Actinomycin-Chromophor bei der Hydrolyse mit Bariumhydroxyd. Sie führt in mäßiger Ausbeute zum roten, kristallisierten Despeptido-actinomycin²⁶) (Actinomycinol²⁷), für das durch Abbau^{28, 29}) und Synthese^{30, 31}) die Konstitution XVIII bewiesen wurde. Die Umlagerung be-

²¹) H. Brockmann u. H. Gröne, Chem. Ber. 91, 773 [1958].

²²) H. Brockmann u. R. Mecke, unveröffentl.

²³) H. Brockmann u. H. S. Petras, Naturwissenschaften 46, 400 [1959].

²⁴) G. Troemel, Diplomarbeit, Göttingen 1958.

²⁵) H. Brockmann u. N. Grubhofer, Naturwissenschaften 37, 494 [1950]; Chem. Ber. 86, 1407 [1953].

²⁶) A. W. Johnson, A. R. Todd u. L. C. Vining, J. chem. Soc. [London] 1952, 1672.

²⁷) H. Brockmann u. H. Muxfeldt, Angew. Chem. 67, 617 [1955]; Chem. Ber. 89, 1379 [1956].

²⁸) S. J. Aryal, E. Bullock, W. G. Hanger, W. C. Howell u. A. W. Johnson, J. chem. Soc. [London] 1957, 1592.

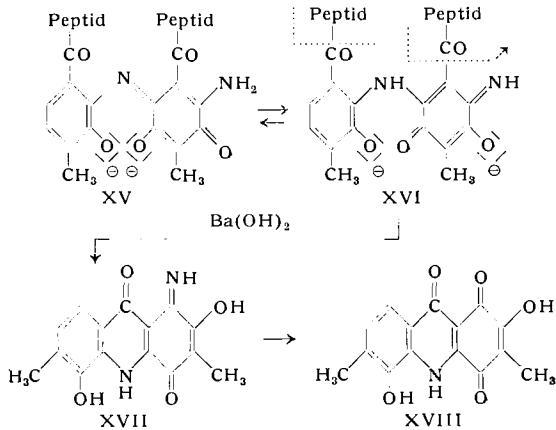
²⁹) W. G. Hanger, W. C. Howell u. A. W. Johnson, ebenda 1958, 496.

³⁰) H. Brockmann u. H. Muxfeldt, Angew. Chem. 67, 618 [1955];

Chem. Ber. 89, 1397 [1956].

²¹) H. Brockmann u. B. Franck, Chem. Ber. 87, 1767 [1954].

ginnit zweifellos mit einer Öffnung des heterocyclischen Ringes (VIII) unter Bildung von XV. Nachdem sich XV mit XVI ins Gleichgewicht gesetzt hat, kondensiert offenbar die Carboxygruppe des benzoiden Ringes — unter Abspaltung des Peptidrestes und der anderen Carboxygruppe — mit dem chinoiden Ring so, daß XVII entsteht. Aus XVII kann durch Verseifung der Iminogruppe das Despeptido-actinomycin (XVIII) hervorgehen. Die Möglichkeit, daß der Ringschluß im Sinne einer Dieckmann-Cyclisierung verläuft, ist von W. G. Hanger, W. C. Howell und A. W. Johnson³⁰⁾ diskutiert worden. Da Desaminoactinomycine kein Despeptido-actinomycin liefern, muß die Chromophor-Aminogruppe bei der Umlagerung eine Rolle spielen.



Obgleich Despeptido-actinomycin (XVIII) ein Umlagerungsprodukt des Chromophors ist, hat man es zu einer Zeit, als die Konstitution des Chromophors noch unbekannt war, für die Prüfung herangezogen, ob die verschiedenen Actinomycine verschiedene Chromophore enthalten. Aus dem Befund, daß die bisher untersuchten Actinomycine zum gleichen Despeptido-actinomycin abgebaut werden, darf man schließen, daß alle den gleichen Chromophor haben³²⁾.

c) Konstitution des Peptidteils

Bezogen auf das durch Redox-Titration³³⁾ ermittelte Molekulargewicht von 1285 ± 15 errechnete sich aus den Aminosäure-Analysen des Actinomycins C₃ ein Gehalt an zwei Molekülen L-Threonin, D-allo-Isoleucin, L-Prolin, Sarkosin und L-N-Methylvalin³⁴⁻³⁸⁾. Eine erste Aussage über die Struktur des Peptidteils erlaubte der Befund, daß Actinomycin C₃ ebenso wie die anderen Actinomycine zwei Lactongruppen, dagegen keine Carboxy-, Hydroxy-, Methylamino- oder aliphatische Amino-Gruppen enthält. Denn daraus ergab sich, daß jede der beiden Chromophor-Carboxygruppen mit einer Peptidkette verbunden sein muß, deren Carboxygruppe mit der Hydroxygruppe eines Threoninrestes verestert ist, und zwar entweder so, daß die Esterbindung die C-terminale Aminosäure mit dem Threonin der gleichen Kette verknüpft, oder so, daß diese Bindung zwischen der C-terminalen Aminosäure der einen Kette und dem Threonin der anderen liegt.

Dieses Ergebnis zusammen mit dem Befund, daß im Actinomycin C₃ die beiden Chromophor-Carboxygruppen mit Threonin verknüpft sind (Abbauprodukt VI) führte zunächst zu den Teilformeln XIX und XX, denen die Annahme zugrunde lag, daß die Peptidketten die gleiche Bausteinzahl haben.

³²⁾ H. Brockmann u. K. Vohwinkel, Chem. Ber. 89, 1373 [1956].

³³⁾ H. Brockmann u. K. Vohwinkel, Angew. Chem. 67, 618 [1955].

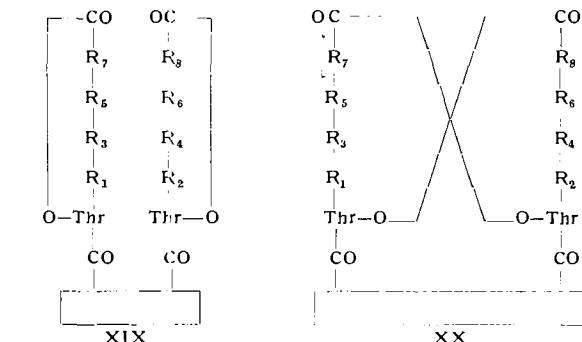
³⁴⁾ H. Brockmann, G. Bohnsack u. H. Gröne, Naturwissenschaften 40, 223 [1953].

³⁵⁾ H. Brockmann, H. Gröne u. J. Timm, ebenda 42, 125 [1955].

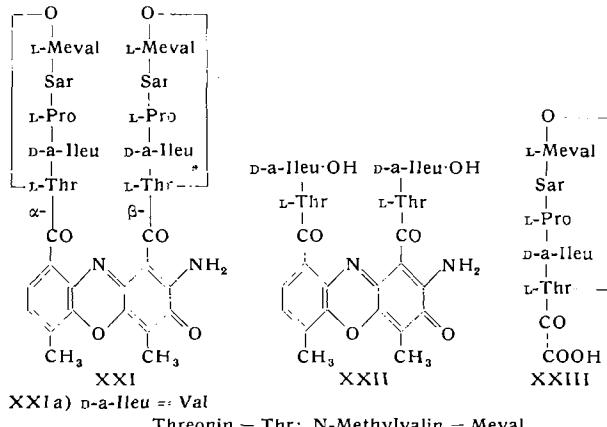
³⁶⁾ H. Brockmann u. J. H. Manegold, unveröffentl.

Verseifung der beiden Lactongruppen lieferte eine Di-carbonsäure, die noch alle Peptidbausteine des Actinomycins enthielt³⁷⁾. Als sie der Dakin-West-Reaktion unterworfen wurde, entstand ein Produkt, in dem man Threonin, allo-Isoleucin, Prolin und Sarkosin, aber kein N-Methylvalin nachweisen konnte, d. h. in beiden Peptidgruppen mußte der N-Methylvalin-Rest an der Lactonbindung beteiligt sein. Damit wurde XIX bzw. XX zur Teilformel XIXa bzw. XXa.

Daß beide N-Methylvalin-Reste über ihre N-Methylaminogruppe mit Sarkosin verbunden sind, zeigte die Hydrazinspaltung des Actinomycins C₃, denn sie gab mehr als ein Mol N-Methylvalyl-sarkosinanhydrid, das unter der Einwirkung des Hydrazins aus Sarkosyl-N-methylvalin oder einem Vorprodukt davon entsteht³⁸⁾. Damit wurde aus XIXa bzw. XXa die Teilformel XIXb bzw. XXb.



- a) R₇ · CO, R₈ · CO = Meval
- b) R₇ · CO, R₈ · CO = Meval; R₅, R₆ = Sar
- c) R₇ · CO, R₈ · CO = Meval; R₆, R₈ = Sar; R₁, R₂ = a-Ileu
- d) R₇ · CO, R₈ · CO = Meval; R₅, R₆ = Sar; R₁, R₂ = a-Ileu; R₃, R₄ = Prc



XXIa) d-a-Ileu = Val

Threonin = Thr; N-Methylvalin = Meval
Prolin = Pro; allo-Isoleucin = a-Ileu
Sarkosin = Sar

Welche Aminosäure den beiden Threoninresten benachbart ist, erfuhr man bei der in Abschnitt III erörterten Hydrolyse des Actinomycins C₃ mit konz. Salzsäure. Sie führte nämlich zu einem roten Abbauprodukt, das durch Synthese als Actinocinyl-bis-[L-threonyl-d-allo-isoleucin] (XXII) identifiziert wurde³⁹⁾ und erlaubte damit, XIXb bzw. XXb zur Teilformel XIXc bzw. XXc zu entwickeln. Beide ließen für die Stellung der Prolinreste noch zwei Möglichkeiten offen: 1. Ein Prolin-Rest in jeder Kette zwischen allo-Isoleucin und Sarkosin und 2. zwei miteinander verbundene Prolinreste in einer der beiden Ketten zwischen Sarkosin und L-allo-Isoleucin. Da man in Actinomycin-C₃-Hydrolysaten allo-Isoleucyl-prolyl-sarkosin nachweisen konnte⁴⁰⁾, entfiel die zweite Möglichkeit, und man kam damit zur Formel XIXd bzw. XXd.

³⁷⁾ H. Brockmann u. B. Franck, Angew. Chem. 68, 68 [1956].

³⁸⁾ H. Brockmann, H. G. Bohnsack u. C. H. Süling, ebenda 68, 66 [1956].

³⁹⁾ H. Brockmann u. P. Boldt, Naturwissenschaften 46, 262 [1959].

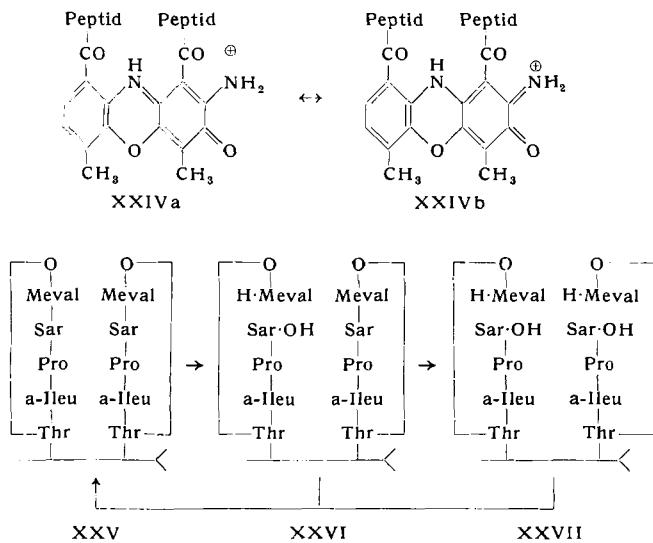
⁴⁰⁾ G. Bohnsack, Dissertation, Göttingen 1954.

Eine Entscheidung zwischen ihnen gelang erst in neuester Zeit durch oxydative Abbau des Actinomycins C₃ mit Wasserstoffperoxyd in Eisessig. Dabei wurde der Chromophor gespalten und u. a. eine Verbindung der Konstitution XXIII gefäßt⁴¹⁾. Da ein solches Abbauprodukt nur aus einem Actinomycin mit zwei getrennten Peptidlacton-Ringen hervorgehen kann, war nunmehr in allen Einzelheiten bewiesen, daß Actinomycin die Konstitution XXI hat.

III. Abbau der Actinomycine durch konz. Salzsäure

Konz. Salzsäure nimmt die in Wasser kaum löslichen Actinomycine unter Bildung roter Salze auf, deren Kation nach XXIVa, XXIVb formuliert werden kann. Diese Salzbildung ist offenbar dafür verantwortlich, daß der Abbau der Actinomycine in konz. Salzsäure anders verläuft als in 10- oder 20-proz. Salzsäure. Wie sich zuerst beim Actinomycin C₃ zeigte⁴²⁾, wird auch bei längerer Einwirkung von konz. Salzsäure (40 °C, 120 h) die Chromophor-Aminogruppe nicht wie in 20-proz. Säure gegen eine OH-Gruppe ausgetauscht (Bildung von Desamino-actinomycin, VIII → VII), sondern bleibt erhalten. Der erste Angriff erfolgt vielmehr im Peptidteil, wo vorzugsweise – zunächst in einem und dann in beiden Ringen – die Bindung zwischen Sarkosin und N-Methylvalin gelöst wird.

Die Abbauprodukte, die bei Öffnung eines Ringes entstehen, nennt man *seco-Actinomycine*⁴³⁾ (und kann durch ein zusätzliches α oder β angeben, ob der in Formel XXV linke oder rechte Ring geöffnet ist), die, in denen beide Ringe zwischen Sarkosin und N-Methylvalin geöffnet sind, *Bis-seco-actinomycine*⁴³⁾. Isoliert wurde aus Hydrolysaten des Actinomycins C₃ ein Abbauprodukt, in dem wahrscheinlich ein Gemisch aus α-seco-Actinomycin C₃ (XXVI) und β-seco-Actinomycin C₃ vorliegt, sowie das Bis-seco-actinomycin C₃ (XXVII)⁴⁴⁾.



Im weiteren Verlauf der Hydrolyse werden die Peptidketten von XXVII abgebaut, während die Esterbindungen in erheblichem Umfang erhalten bleiben. Dabei entsteht ein Gemisch von Actinocinyl-bis-peptiden, in denen die Hydroxygruppe der beiden Threonin-Reste noch mit N-Methylvalin verestert ist. Aus einem solchen Gemisch

⁴¹⁾ H. Brockmann u. P. Boldt, unveröffentl.

⁴²⁾ W. Sunderkötter, Dissertation, Göttingen 1958.

⁴³⁾ H. Brockmann, Sektionsvortrag, IUPAC-Symposium „The Chemistry of Natural Products“, Melbourne 1960.

⁴⁴⁾ H. Brockmann u. W. Sunderkötter, Naturwissenschaften 47, 229 [1960].

wurde, nachdem durch milde Alkalihydrolyse die N-Methylvalin-Reste abgespalten waren, das Abbauprodukt XXII und ferner Actinocinyl-bis-[L-threonin]⁴⁵⁾ isoliert, ein Ergebnis, das nicht nur für jede Peptidgruppe die Sequenz Threonin-allo-Isoleucin beweist, sondern unabhängig von allen anderen Befunden noch einmal die Formel IXa des Actinomycin-Chromophors bestätigt.

IV. Die Synthese des Actinomycins C₃

Die zum Actinomycin-Chromophor IXa führende oxydative Kondensation von 2 Molekülen XIV läßt sich auch mit Derivaten von XIVa durchführen, in denen dessen Carboxygruppe säureamidartig mit Aminosäuren oder Peptiden verknüpft ist, und hat so zu einer größeren Zahl von Actinocinyl-bis-[aminosäuren] sowie Actinocinyl-bis-[peptiden] geführt⁴⁵⁾. Für eine Synthese des Actinomycins C₃ boten sich damit u. a. folgende Wege an: 1. Aufbau des Actinocinyl-bis-[L-threonyl-d-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosyl-L-N-methylvalin] und anschließende Veresterung der beiden N-Methylvalin-Carboxygruppen mit den Hydroxygruppen der beiden Threoninreste im Sinne der Formel XXI. 2. Aufbau der „Vorstufe“ LII (vgl. Abschnitt IX) und anschließende oxydative Kondensation zum Actinomycin C₃, 3. Aufbau des Peptidlactonringes der Formel XXI und anschließende Kupplung mit Actinocinyl-dichlorid⁴⁶⁾. Bevor einer dieser Wege eingehender erprobt werden konnte, eröffnete sich durch die Auffindung der seco-Actinomycine⁴⁴⁾ ein neuer, der aussichtsreicher schien als die genannten und kürzlich die Totalsynthese des Actinomycins C₃ ermöglicht hat¹⁸⁾.

Wie Formel XXVI am Beispiel eines der beiden seco-Actinomycine C₃ zeigt, enthält deren Molekül das an seiner Aminogruppe durch den Chromophor acyierte Tetrapeptid L-Threonyl-d-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosin sowie einen L-N-Methylvalinrest mit veresterter Carboxy- und freier N-Methylaminogruppe, d. h. zwei Partner für eine Peptidsynthese (Kupplung der Sarkosin-Carboxygruppe mit der freien N-Methylaminogruppe des N-Methylvalin-Restes), von deren Gelingen die Rückbildung von Actinomycin C₃ (XXV) aus XXVI zu erwarten war. In der Tat gelang dieses Wiederschließen des durch konz. Salzsäure geöffneten Rings mit Dicyclohexyl-carbodiimid ebenso wie mit Chlorameisensäure-äthylester und Triäthylamin⁴⁷⁾; aus XXVI entstand in 30% Ausbeute Actinomycin C₃⁴⁸⁾. Die gleiche Cyclisierung gelang beim Bis-seco-Actinomycin C₃ (XXVII) und führte auch hier, allerdings in geringerer Ausbeute, wieder zurück zum Actinomycin C₃ (XXV)⁴⁸⁾.

Damit war eine Partialsynthese des Actinomycins C₃ geglückt, die den schwierigsten Schritt einer Totalsynthese, nämlich die Bildung von zwei Peptid-Lactonringen, einschließt. Und damit wurde die Totalsynthese des Actinomycins C₃ gleichbedeutend mit der Totalsynthese des Bis-seco-Actinomycins C₃ (XXVII). Diese gelang auf einem Wege, der durch die Formeln XXVIII–XXXIII erläutert wird¹⁸⁾.

Ausgangsprodukte waren die Verbindungen XXVIII und XXIX. XXVIII wurde ausgehend von 2-Nitro-3-hydroxy-4-methylbenzoësäure dargestellt, die man nach Benzylierung ihrer Hydroxygruppe und Überführung ins Chlorid als solches mit L-Threonin kuppierte. Zur Synthese des d-allo-Isoleucyl-L-prolyl-sarkosin-benzylesters (XXIX) wurde Formyl-d-allo-isoleucin unter Verwendung von Dicyclohexyl-carbodiimid mit L-Prolinbenzylester gekuppelt und aus dem Kupplungsprodukt (Formyl-d-allo-isoleucyl-L-prolinbenzylester) der Benzylrest durch Hydrierung

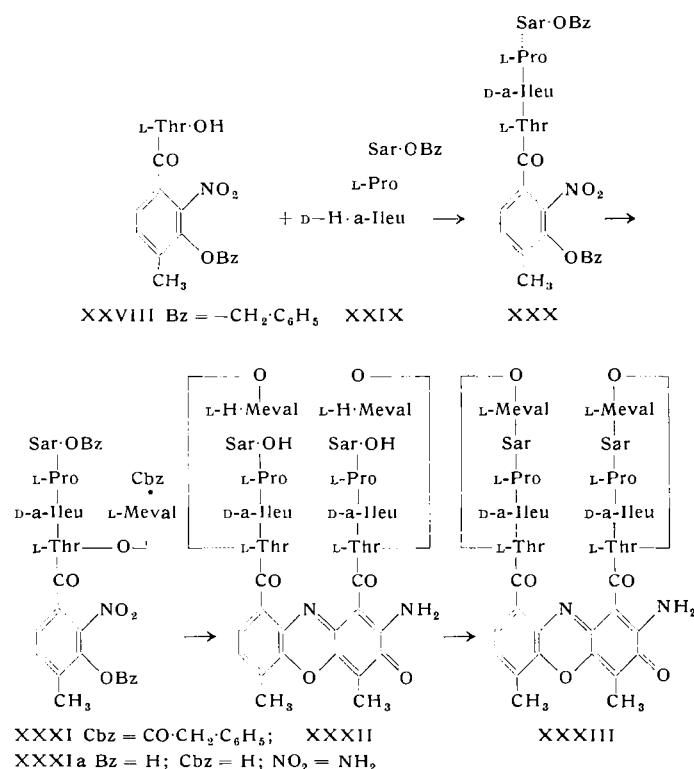
⁴⁵⁾ H. Brockmann u. Mitarbeiter, unveröffentl.

⁴⁶⁾ H. Lackner, Diplomarbeit, Göttingen 1958.

⁴⁷⁾ R. A. Boissonnas u. I. Schumann, Helv. chim. Acta 35, 2229 [1952].

⁴⁸⁾ H. Brockmann, W. Sunderkötter, K. W. Ohly u. P. Boldt, Naturwissenschaften 47, 230 [1960].

abgespalten. Das dabei entstandene Formyl-D-allo-isoleucyl-L-prolin gab mit Dicyclohexyl-carbodiimid und Sarkosinbenzylester den Formyl-D-allo-isoleucyl-L-prolyl-sarkosinbenzylester, aus dem durch Abspaltung des Formylrestes der Tripeptid-benzylester **XXIX** hervorging.



Die Verknüpfung der Carboxygruppe von **XXVIII** mit der Aminogruppe von **XXIX** gelang ebenfalls mit Dicyclohexyl-carbodiimid und führte zu **XXX**, in dem nun als schwierigster Schritt der ganzen Synthese die Hydroxygruppe des Threonins mit Carbobenzoxy-L-N-methylvalin verestert werden mußte, eine Reaktion, die sich mit den konventionellen Methoden nicht erzwingen ließ. Sie gelang erst mit dem von H. A. Staab⁴⁹⁾ als Veresterungsreagens empfohlenen Carbonyl-diimidazol. Das schließlich gewonnene **XXXI** lieferte bei katalytischer Hydrierung unter Reduktion der Nitrogruppe sowie Abspaltung des Benzylrestes und der beiden Carbobenzoxy-Gruppen die Verbindung **XXXIa**. Ihre Oxydation mit Kalium-hexacyanoferrat(III) führte zu einer Verbindung **XXXII**, die in allen Eigenschaften mit dem durch Abbau aus Actinomycin **C₃** erhaltenen Bis-seco-Actinomycin **C₃** übereinstimmte. Den besten Beweis für die Identität der synthetischen Verbindung mit dem aus Actinomycin **C₃** erhaltenen Bis-seco-Actinomycin **C₃** erbrachte ihre Umsetzung mit Chlorameisensäure-äthylester, bei der eine rote, kristallisierte Verbindung mit den chemischen, physikalischen und biologischen Eigenschaften des Actinomycins **C₃** (**XXXIII**) entstand. Lediglich die spezifische Drehung lag mit $-290 \pm 10^\circ$ (Methanol) etwas niedriger als die des natürlichen Actinomycins **C₃** ($[\alpha]_D^{25} = -320 \pm 10^\circ$, Methanol), was nicht überrascht, da bei jeder Stufe des Peptidaufbaus mit einer geringfügigen Racemisierung zu rechnen ist.

Mit dieser Totalsynthese des Actinomycins **C₃** ist ein Weg zur Synthese der anderen Actinomycine geöffnet. Denn den Peptidteil entsprechend zu variieren, wird keine besonderen Schwierigkeiten machen. Darüber hinaus wird es nun möglich sein, actinomycinähnliche Chromopeptide aufzubauen, unter denen vielleicht solche sind, deren cytostatische Wirksamkeit die der Actinomycine übertrifft.

⁴⁹⁾ H. A. Staab, Angew. Chem. 71, 194 [1959].

V. Die Actinomycine **C₁**, **C₂**, **X₂** und **X_{0β}**

a) Natürliche Actinomycin-Gemische

Mit den ersten chromatographisch einheitlichen Actinomycinen **C₁**, **C₂**, **C₃** und **X₂** hatte man zugleich auch die gefunden, deren Synthese von den Mikroorganismen offenbar bevorzugt wird. Denn mindestens eines von ihnen fand sich in den bisher untersuchten natürlichen Actinomycin-gemischen (mit Ausnahme der Z-Actinomycine) als Hauptkomponente. Ihren „Hauptactinomycinen“ nach lassen sich die Actinomycingemische in folgende drei Gruppen einteilen.

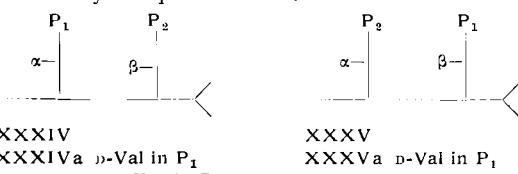
1. Actinomycingemische, die überwiegend aus Actinomycin **C₁** bestehen.
2. Actinomycingemische, die als Hauptkomponenten die Actinomycine **C₂** und **C₃** und in geringer Menge Actinomycin **C₁** enthalten.
3. Actinomycingemische, deren Hauptbestandteil Actinomycin **X₂** ist, das von wechselnden Mengen Actinomycin **C₁** und **X_{0β}** begleitet ist.

Außer den angeführten Actinomycinen enthalten die Gemische dieser drei Gruppen in sehr kleinen Mengen noch andere (Gruppe 2 z. B. Actinomycin **C_{2a}**; Gruppe 3 z. B. Actinomycin **X_{1a}**, **X_{0γ}** und **X₃**).

Zu diesen drei Gruppen kommt als vierte die der Actinomycine **Z₁**, **Z₂**, **Z₃**, **Z₄** und **Z₅**⁵⁰⁾, die bisher noch nicht genauer untersucht worden sind. *Streptomyces*-Stämme, die diese Actinomycine aufbauen, sind offenbar spärlicher verbreitet als die anderen Actinomycin-Produzenten.

b) Actinomycin **C₂** und **C₃**

Actinomycin **C₁**, in den Actinomycingemischen der Gruppe 2 neben **C₂** und **C₃**, und in denen der Gruppe 1 als Haupt-Actinomycin vorkommend, hat den gleichen Chromophor wie Actinomycin **C₃**³²⁾ und unterscheidet sich von diesem nur dadurch, daß es D-Valin an Stelle von D-allo-Isoleucin enthält³⁴⁾. Nachdem die Actinomycin-**C₃**-Formel **XXI** bekannt war, lag es daher nahe, Actinomycin **C₁** nach **XXIa** zu formulieren. Die Aminosäure-Sequenz dieser Formel wurde durch Abbaupersuche von E. Bullock und A. W. Johnson⁵¹⁾ sowie durch unseren Arbeitskreis⁵²⁾ bewiesen. Für die Anordnung der Lactongruppen (**XIX** oder **XX**) fehlt bis jetzt ein strenger Beweis, doch kann als so gut wie sicher gelten, daß sie die gleiche Stellung haben wie in **XXI** und Actinomycin **C₁** somit die Konstitution **XXIa** hat.



Im Gegensatz zu Actinomycin **C₁** (**XXIa**) und Actinomycin **C₃** (**XXI**), deren Peptidgruppen gleich sind, und die man daher als iso-Actinomycine²⁰⁾ bezeichnet hat, ist Actinomycin **C₂** ein aniso-Actinomycin mit zwei verschiedenen Peptidgruppen. Die eine ist so gebaut wie in **C₁** (**XXIa**), die andere so wie in **C₃** (**XXI**). Von jedem aniso-Actinomycin sind zwei Stellungsisomere **XXXIV** und **XXXV** möglich. Ob dem Actinomycin **C₂**, dessen Aminosäure-Sequenz bewiesen ist⁵²⁾, Formel **XXXIVa** oder **XXXVa** zukommt, ist noch unbekannt^{52a)} und könnte

⁵⁰⁾ R. Bossi, R. Hüttner, W. Keller-Schierlein, L. Neipp u. H. Zähner, Helv. chim. Acta 41, 1645 [1958].

⁵¹⁾ E. Bullock u. A. W. Johnson, J. chem. Soc. [London] 1957, 3280. Actinomycin **C₁** ist hier als Actinomycin D bezeichnet. Vgl. dazu Abschn. VI11 dieser Arbeit.

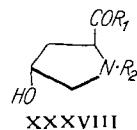
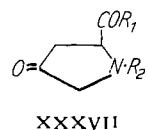
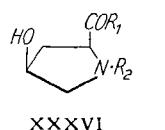
⁵²⁾ H. Brockmann, P. Boldt u. H. S. Petras, Naturwissenschaften 47, 62 [1960].

^{52a)} Anm. b. d. Korr. Inzwischen wurde festgestellt, daß Actinomycin **C₂** die Formel **XXXIVa** hat (H. Brockmann u. H.-S. Petras, unveröffentl.).

durch Abbau mit alkalischem Wasserstoffperoxyd entschieden werden, bei dem nach E. Bullock und A. W. Johnson⁵³⁾ die am benzoiden Ring des Chromophors stehende α -Peptidgruppe als 7-Methyl-benzoxazolonsäure-Derivat und die dem chinoiden Ring angehörende β -Gruppe als Oxalyl-peptid gefaßt werden kann.

c) Die Actinomycine X₂, X_{0β} und X_{0δ}

Actinomycin X₂ enthält ein Molekül L- γ -Oxoprolin (XXXVIIa)⁵⁴⁾ und läßt sich durch energische katalytische Hydrierung in Actinomycin C₁ (XXIa) überführen⁵⁵⁾. Es ist demnach ein Oxoderivat des Actinomycins C₁ (XXIa), in dem das γ -C-Atom eines Prolinrestes ein Oxo-Sauerstoffatom trägt. Da noch nicht bekannt ist, ob das Oxo-prolin ein Glied der α - oder β -Peptidkette ist, stehen für Actinomycin X₂ die Formeln XLa und XLb zur Diskussion.



R₁, R₂ = Peptidrest
a) R₁ = OH, R₂ = H R₁, R₂ = Peptidrest
b) R₁, R₂ = Peptidrest

Hydriert man Actinomycin X₂ unter milden Bedingungen, so wird der L- γ -Oxoprolinrest (XXXVIIb) nur bis zum L-allo-Hydroxy-prolinrest (XXXVI) reduziert und es entsteht Actinomycin X_{0δ}⁵⁵⁾, das in sehr geringen Mengen in Actinomycingemischen der Gruppe III vorkommen kann, bisher aber noch nicht kristallisiert daraus abgetrennt wurde. Sterisch anders verläuft die Reduktion mit Aluminium-isopropylat, das den L- γ -Oxoprolinrest (XXXVIIa) zum L-Hydroxy-prolinrest (XXXVIII) reduziert. Dabei entsteht ein Diastereomeres des Actinomycins X_{0δ}, das identisch ist mit dem aus Actinomycingemischen der Gruppe III isolierten Actinomycin X_{0β}¹²⁾. Auf Grund dieser Befunde stehen für Actinomycin X_{0β} die Formeln XLa, XLb und für Actinomycin X_{0δ} XLla und XLlb zur Diskussion.

d) Andere Actinomycine

Die anderen, bisher aus Actinomycingemischen der Gruppe 1, 2 und 3 in geringen Ausbeuten isolierten „Nebenactinomycine“⁵⁶⁾ sind noch nicht eingehender untersucht worden. Von den Actinomycinen II⁵⁶⁾ (vielleicht identisch mit Actinomycin F₈⁵⁷⁾), Actinomycin III⁵⁶⁾ (vielleicht identisch mit Actinomycin F₉⁵⁷⁾) und Actinomycin X_{1a}¹³⁾, deren Chromophor ebenfalls Actinomycin (IXa) ist, kennt man den Aminosäuregehalt. Nimmt man an, daß sie analog gebaut sind wie Actinomycin C₃ (XXI), so hätte Actinomycin II die Konstitution XLIII, Actinomycin III entweder Formel XLIVa oder XLIVb, und für Actinomycin X_{1a} kämen die Formeln XLVa und XLVb in Betracht.

VI. Die Actinomycine der dirigierten Biosynthese

Wie G. Schmidt-Kastner⁵⁸⁾ als erster gezeigt hat, kann man die Actinomycin-Synthese der Streptomyzeten durch bestimmte, der Kulturlösung zugesetzte Aminosäuren oder Peptide so dirigieren, daß neben den „normalen“ Actinomycinen neue entstehen. So konnten z. B. Stämme, die normalerweise die Actinomycine C₁, C₂ und C₃ produzieren,

⁵³⁾ E. Bullock u. A. W. Johnson, J. chem. Soc. [London] 1957, 1602.
⁵⁴⁾ H. Brockmann u. J. H. Manegold, Naturwissenschaften 45, 310 [1958].

⁵⁵⁾ H. Brockmann u. J. H. Manegold, Chem. Ber., im Druck.

⁵⁶⁾ A. W. Johnson u. A. Mauger, Biochem. J. 73, 535 [1959].

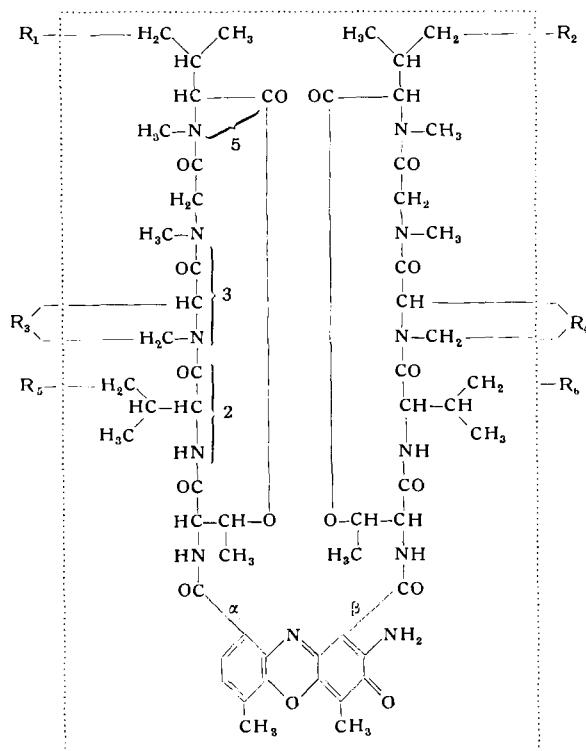
⁵⁷⁾ G. Schmidt-Kastner, Rep. New York Acad. Sci. 1960, im Druck.

⁵⁸⁾ G. Schmidt-Kastner, Naturwissenschaften 43, 131 [1956]; Medizin und Chemie, Abh. med. chem. Forschungsstätten Farbenfabriken Bayer AG, 5, 463 [1956].

durch Verabreichung von D,L-Isoleucin dazu gebracht werden, die bis dahin unbekannten Actinomycine E₁ und E₂ aufzubauen. Andere neue Actinomycine (F₁–F₈) entstanden, als die Kulturlösung Sarkosin enthielt. Näher untersucht⁵⁹⁾ wurden die Actinomycine E₁, E₂, F₁, F₂, F₃ und F₄, deren Chromophor der gleiche ist wie bei den anderen Actinomycinen. Man kennt ihren Aminosäuregehalt und die C-terminalen Aminosäuren ihrer Peptidketten, aber man hat noch keinen Beweis für ihre Aminosäure-Sequenz. Nimmt man an, daß bei der dirigierten Biosynthese die Tendenz besteht, die „neuen“ Actinomycine den normalerweise gebildeten strukturell möglichst ähnlich zu machen, so hätte Actinomycin E₂ die Konstitution XLVII und für E₁ wäre noch zwischen XLVIa und XLVIb zu entscheiden, d. h. durch das Angebot von D,L-Isoleucin werden die Peptidgruppen des Actinomycins C₃ dadurch modifiziert, daß entweder in einer (Actinomycin E₁) oder in beiden (Actinomycin E₂) N-Methyl-isoleucin an die Stelle von N-Methylvalin tritt. Bei den F-Actinomycinen würde das Prinzip der größten Strukturähnlichkeit für Actinomycin F₁ zu den Formeln XLVIIIa und XLVIIIb, für F₂ zu XLIXa–d, bei F₃ zu L und bei F₄ zu Lla und Llb führen; d. h. das angebotene Sarkosin tritt in einer oder in beiden Peptidgruppen an die Stelle von L-Prolin.

VII. Variationen der Actinomycin-Struktur

Formel XXXIX zeigt das allen bisher untersuchten Actinomycinen gemeinsame Grundgerüst sowie die Grenzen, in denen es variiert werden kann. Ort der Variation ist in jeder der beiden Peptidgruppen der Aminosäure-Rest 2, 3 oder 5. Art der Variation ist bei 2 und 5 eine C-Methylierung von C-4 (durch die Valin zum allo-Isoleucin und N-Methylvalin zu N-Methylisoleucin wird) und bei Rest 3



XXXIX. R₁, R₂, R₅, R₆ = H, CH₃
R₃, R₄ = -H -CH₂ -CH₂ -CH₂ -CH₂

-H -CH₂ -C-OH -C=H -C=O

S) P) Hp) aHp) Op)

Substituenten vgl. Tab. I

⁵⁹⁾ H. Brockmann, J. H. Manegold u. G. Schmidt-Kastner, unveröffentlicht.

entweder die Abwandlung des Proins zum Hydroxyprolin, allo-Hydroxyprolin, sowie γ -Oxoprolin, oder der Ersatz einer $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ -Gruppe des Proins durch Wasserstoff (durch die Proin zum Sarkosin wird).

Die Grenzen, innerhalb derer eine Peptidgruppe abgewandelt werden kann, sind also relativ eng. Daß dennoch die Existenz zahlreicher Actinomycine möglich ist, liegt an deren eigentümlicher Struktur. Denn diese gibt einer Zelle, die im Aufbau der Actinomycin-Peptidgruppen auf n Muster beschränkt ist, theoretisch die Möglichkeit zur Synthese von n^2 -Actinomycinen.

Actinomycin	Substituenten	
X ₂ (XL)	R ₁ , R ₂ , R ₃ , R ₆ = H.	a) R ₃ = P; R ₄ = Op. b) R ₃ = Op; R ₄ = P.
X _{0β} (XL I)	R ₁ , R ₂ , R ₅ , R ₆ = H.	a) R ₃ = P; R ₄ = Hp. b) R ₃ = Hp; R ₄ = P.
X _{0δ} (XL II)	R ₁ , R ₂ , R ₅ , R ₆ = H.	a) R ₃ = P; R ₄ = aHp b) R ₃ = aHp; R ₄ = P
II (XL III)	R ₁ , R ₂ , R ₅ , R ₆ = H.	R ₃ , R ₄ = S
III (XL IV)	R ₁ , R ₂ , R ₅ , R ₆ = H.	a) R ₃ = P; R ₄ = S. b) R ₃ = S; R ₄ = P
X _{1α} (XL V)	R ₁ , R ₂ , R ₅ , R ₆ = H.	a) R ₃ = S; R ₄ = Op. b) R ₃ = Op; R ₄ = S
E ₁ (XL VI)	R ₃ , R ₄ = P, R ₅ , R ₆ = CH ₃ .	a) R ₁ = H; R ₂ = CH ₃ b) R ₁ = CH ₃ ; R ₂ = H
E ₂ (XL VII)	R ₁ , R ₂ , R ₅ , R ₆ = CH ₃ ; R ₃ , R ₄ = P	
F ₁ (XL VIII)	R ₁ , R ₂ = H; R ₃ , R ₄ = S.	a) R ₃ = CH ₃ ; R ₄ = H b) R ₃ = H; R ₆ = CH ₃
F ₂ (XL IX)	R ₁ , H ₂ = H. a) R ₃ = P; R ₄ = S; R ₅ = H; R ₆ = CH ₃ b) R ₃ = P; R ₄ = S; R ₅ = CH ₃ ; R ₆ = H c) R ₃ = S; R ₄ = P; R ₅ = H; R ₆ = CH ₃ d) R ₃ = S; R ₄ = P; R ₅ = CH ₃ ; R ₆ = H	
F ₃ (L)	R ₁ , R ₂ = H; R ₃ , R ₄ = S; R ₅ , R ₆ = CH ₃	
F ₄ (L I)	R ₁ , R ₂ = H; R ₃ , R ₆ = CH ₃ . a) R ₃ = P; R ₄ = S. b) R ₃ = S; R ₄ = P	

Tabelle 1. Substituenten am Grundgerüst der Actinomycine (XXXIX)

VIII. Nomenklatur der Actinomycine

Die Nomenklatur der Actinomycine ist zur Zeit unübersichtlich; einmal weil für Actinomycine immer noch überholte Bezeichnungen verwendet werden, zur Hauptsache aber dadurch, daß bei einigen Actinomycinen von mikrobiologischer Seite für die bei der ersten Reindarstellung gewählten und von der Mehrzahl der Autoren übernommenen Bezeichnungen⁶⁰⁾ andere verwendet worden sind. Zur Übersicht sind die verschiedenen Bezeichnungen in Tabelle 1 zusammengestellt.

Erste Bezeichnung	Spätere Bezeichnungen ^{61), 62)}
Actinomycin C ₁ ⁶³⁾ (I ₁ ⁶⁴⁾ , X ₁ ⁶⁰⁾	AIV, BIV, D ₁ V, D, IV
Actinomycin C ₂ ⁶⁴⁾	VI
Actinomycin C ₃ ⁶⁴⁾	VII
Actinomycin X _{0β} ¹²⁾	A ₁ , B ₁
Actinomycin X ₂ ⁶⁴⁾	A ₅ , B ₅

Tabelle 2. Nomenklatur einiger Actinomycine

Eine rationale Nomenklatur muß die Struktur der verschiedenen Actinomycine zum Ausdruck bringen. In einfacher Weise kann das, wie wir vorgeschlagen haben^{12, 60)}, dadurch geschehen, daß man zusätzlich zum Namen Actinomycin, beginnend mit Threonin die Aminosäure-Sequenz angibt. Bei den gleichen Peptidketten enthaltenden iso-Actinomycinen genügt es, die Sequenz einer Kette anzugeben. Actinomycin C₁ wäre dann Actinomycin-Thr-Val-Pro-Sar-Meval und Actinomycin C₃ wäre Actinomycin-Thr-a-Ileu-Pro-Sar-Meval. Bei den aniso-Actinomycinen genügt es, übereinandergestellt die Aminosäurereste anzugeben, die in beiden Ketten verschieden sind; und zwar die in der α -Peptidgruppe (am benzoiden Ring des Chromophors IXa, vgl.

⁶⁰⁾ H. Brockmann, Fortschr. d. Chemie Organ. Naturstoffe XVIII. Springer-Verlag, Wien 1960, S. 11.

⁶¹⁾ G. G. Roussos u. L. C. Vining, J. chem. Soc. [London] 1956, 2469.

⁶²⁾ S. A. Waksman, E. Katz u. L. C. Vining, Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 602 [1958].

Formel XXI) stehende oben. Ist ihre Stellung nicht bekannt, so wird das Symbol des kleineren Aminosäurerestes über den des größeren geschrieben und durch eine Klammer angekennzeichnet, daß ihre Zuordnung zur α - bzw. β -Kette (vgl. Formeln XXXIV und XXXV) noch aussteht. Actinomycin C₂ wäre dann zur Zeit Actinomycin-Thr-[$\frac{\text{Val}}{\text{a-Ileu}}$]-Pro-Sar-Meval, und die Klammern könnten fallen, wenn sich herausstellt, daß Valin in der α -Kette und allo-Isoleucin in der β -Kette steht^{62a)}. Wenn in Zukunft an einer Stelle jeder Actinomycin-Publikation mit diesen rationellen Formeln die vom Autor verwendeten kurzen Symbole (vgl. Tabelle 2) erläutert werden, wäre dem Leser ein guter Dienst erwiesen.

IX. Zur Biosynthese der Actinomycine

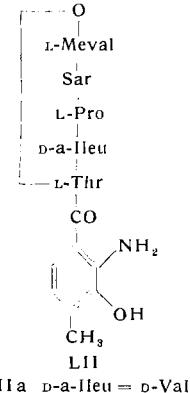
Der Befund, daß 2-Amino-3-hydroxy-4-methylbenzoësäure (XIV) sowie Peptide, deren Aminogruppe mit dieser Säure acyliert ist, in wäßriger Lösung bei p_{H} = 7,3 durch Luftsauerstoff in guter Ausbeute oxydativ zum Actinomycin-Chromophor (IXa) bzw. zu Actinocinyl-peptiden kondensiert werden, sowie die Tatsache, daß von den zehn Peptidbausteinen des Actinomycins C₁ und des Actinomycins C₃ je zwei gleich sind, hat uns 1956 zu der Hypothese¹⁵⁾ geführt, daß die Actinomycine in vivo durch oxidative Kondensation aus zwei Molekülen eines 2-Amino-3-hydroxy-4-methylbenzoyl-peptids aufgebaut werden. Actinomycin C₃ würde danach aus zwei Molekülen der Verbindung LII oder einer Vorstufe davon entstehen. Stände der Zelle außer LII noch ein zweites Vorprodukt LIIa zur Verfügung, das D-Valin statt D-allo-Isoleucin enthält, so hätte sie nach unserer Hypothese die Möglichkeit, Actinomycin C₁ (XXIa), Actinomycin C₃ (XXI) sowie Actinomycin C₂ und sein Stellungsisomeres aufzubauen.

Sind LII und LIIa in gleicher Menge vorhanden und ist bei allen vier Kombinationen, die diese Vorprodukte bei der oxydativen Kondensation eingehen können, die Reaktionsgeschwindigkeit gleich, so würden die beiden iso-Actinomycine (C₁ und C₃) sowie die beiden aniso-Actinomycine (C₂ und sein Stellungsisomeres) in gleicher Menge entstehen. Ist dagegen die Konzentration einer Vorstufe, z. B. die von LIIa, kleiner als die von LII, so würde Actinomycin C₃ Hauptprodukt sein, in geringerer Menge würden sich Actinomycin C₂ und sein Stellungsisomeres bilden und in noch kleinerer Menge Actinomycin C₁. Ähnliches gilt, wenn mehr als zwei Vorprodukte für die Actinomycin-Synthese zur Verfügung stehen. Nach dieser Überlegung ist zu erwarten, daß die in kleinstster Menge in einem Actinomycingemisch vorhandenen Komponenten iso-Actinomycine sind.

Wenn die Actinomycine aus Vorstufen wie LII entstehen, würde der wesentliche Teil der dirigierten Biosynthese darin bestehen, daß die verabreichte Aminosäure die Zelle veranlaßt, neben den normalen Vorstufen auch solche mit veränderter Aminosäure-Sequenz aufzubauen. Der einfachste Fall wäre der, daß die angebotene Aminosäure an Stelle einer normalerweise eingebauten tritt. Das gilt für Sarkosin, das im Actinomycin C₁⁶³⁾, C₂ und C₃ das Prolin verdrängen kann und auch für Hydroxy-prolin⁶³⁾ und Pipericolinsäure⁶³⁾. Aber nicht immer wird die angebotene Aminosäure als solche in die Peptidgruppe aufgenommen,

^{62a)} Anm. b. d. Korr.: Inzwischen wurde gefunden, daß Valin in der α -Kette und allo-Isoleucin in der β -Kette steht (H. Brockmann u. H.-S. Petras, unveröffentl.).

⁶³⁾ E. Katz u. W. A. Goss, Biochem. J. 73, 458 [1959].



denn wenn man der Kulturlösung D,L-Isoleucin zusetzt, wird in die Peptidkette N-Methylisoleucin (Actinomycin E₁ und E₂) eingebaut.

Verabreichung von D,L-Valin an *Streptomyces*-Stämme, die ohne diese Aminosäure neben viel Actinomycin C₃ und C₂ nur wenig C₁ produzieren, läßt die Synthese von Actinomycin C₁ ganz in den Vordergrund treten.⁵⁸⁾ Auch hier wird das im racemischen Gemisch vorhandene D-Valin nicht direkt in die Kette aufgenommen, wie man zunächst vermuten konnte. Vielmehr verwertet die Zelle zur Actinomycin C₁-Synthese nur das L-Valin, das unter Konfigurationswechsel ins Actinomycinmolekül eingebaut wird⁶⁴⁾. Bietet man den Stämmen D-Valin an, so wird ihre Actinomycin C₁-Produktion gehemmt⁶⁴⁾.

Beim Aufbau des Chromophors fungieren Kynurenin, 2-Amino-3-hydroxy-benzoësäure sowie 4-, 5- oder 6-Methyltryptophan nicht als Vorstufen⁶⁵⁾, wohl aber Tryptophan⁶⁵⁾. In Nährlösungen, die D,L-Tryptophan-7a-¹⁴C enthielten, produzierten die *Streptomyces*-Stämme ¹⁴C-haltiges Actinomycin⁶⁶⁾.

Durch Verabreichung von ¹⁴CH₃-L-Methionin ließ sich zeigen, daß die N-Methylgruppen des Sarkosins und N-Methylvalins sowie die C-Methylgruppen des Chromophors (IXa) aus Methionin stammen⁶⁶⁾.

X. Derivate der Actinomycine

Die antibiotische, cytostatische und toxische Wirksamkeit der bisher untersuchten Actinomycine ist graduell verschieden. Merkliche Unterschiede im therapeutischen Index der Tumorhemmung wurden jedoch nicht beobachtet. Dieses Ergebnis legt die Frage nahe, ob es Derivate der Actinomycine gibt, bei denen dieser Index günstiger ist als bei den Actinomycinen selbst.

Dank der Chromopeptid-Struktur der Actinomycine gibt es zwei Typen von Derivaten, solche in denen der Chromophor und solche in denen der Peptidteil modifiziert ist. Von beiden sind Vertreter bekannt.

a) Abwandlungen des Peptidteils

Ansatzpunkte zur Veränderung des Peptidteils boten zunächst nur die Prolin-Hydroxygruppen im Actinomycin X₀₃ (XL) und Actinomycin X₀₈ (XLII), sowie die Oxo-prolin-Ketogruppe des Actinomycins X₂ (XL). Eine Umwandlung des Oxoprolin-Restes ist — abgesehen von seiner Reduktion — bisher nicht gelungen. Dagegen konnte man aus Actinomycin X₀₃ und X₀₈ durch Veresterung ihrer Prolin-Hydroxygruppe mit Monocarbonsäuren, Dicarbonsäuren, Aminosäuren und Phosphorsäure Derivate gewinnen⁶⁷⁾, von denen manche in Fett und manche in Wasser besser löslich sind als das Ausgangsmaterial. Bei keinem übertrifft die antibiotische oder cytostatische Wirksamkeit die der Actinomycine. Über den therapeutischen Index im Tumorversuch ist noch nichts bekannt und ebenso bleibt zu prüfen, ob sich ihre größere Löslichkeit in Fett oder Wasser medizinisch ausnutzen läßt.

b) Abwandlung des Chromophors

Katalytische Hydrierung oder Zinkstaub-Eisessig reduziert die gelbroten Actinomycine zu hellgelben Dihydroverbindungen LIIIa, deren Diacetat LIII im Gegensatz zu LIIIa durch Luftsauerstoff nicht mehr dehydriert wird. Die O-Acetylgruppe der Diacetate LIIIa kann sehr leicht

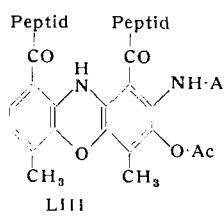
⁶⁴⁾ E. Katz, J. biol. Chemistry 235, 1090 [1960].

⁶⁵⁾ A. Sivak, Franca Nobili u. E. Katz, Bact. Proc. 1960, 149.

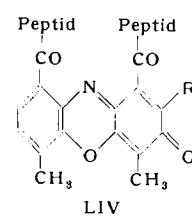
⁶⁶⁾ E. Katz, Rep. New York Acad. Sci., im Druck.

⁶⁷⁾ H. Brockmann u. Mitarbb., unveröffentl.

verseift werden. Dabei entsteht unter Dehydrierung durch Luft ein N-Acetyl-actinomycin (LIVa)⁶⁸⁾. Auf dem Umweg über die Dihydroverbindungen LIIIa gelingt so die Acetylierung und ganz allgemein die Acylierung der Chromophor-Aminogruppe. Das ist deswegen von Interesse, weil diese Gruppe in den Actinomycinen gegen Acylierungsmittel indifferent ist.



LIIIa Ac = H



- a) R = -Cl
- b) R = -NH-CH₃
- c) R = -NH-CH₂-CH₂-OH
- d) R = -N(CH₂)₂
- e) R = -NH-CH₂-CH₂-N(C₂H₅)₂
- f) R = -NH-N(CH=CH₂)₂
- g) R = -NH-NH₂
- h) R = -NH-N=N
- i) R = -NH-COCH₃

N-Acetyl-actinomycine lassen sich zu N-Diacetyl-actinomycinen acylieren und zu N-Methyl-N-acetyl-actinomycinen methylieren⁶⁹⁾, deren biologische Wirksamkeit gering ist.

Bemerkenswert ist, daß das von A. Butenandt, U. Schiedt und E. Biekert untersuchte 3-Amino-4,5-diacetyl-phenoxazon-(2) (IXb)⁷⁰⁾ bei der katalytischen Hydrierung zum Unterschied von den Actinomycinen in ein Reduktionsprodukt übergeht, das tiefer gefärbt ist als das Ausgangsmaterial; dieser Befund ließ uns anfangs daran zweifeln, daß die Actinomycine 3-Amino-phenoxazon-derivate sind.

Ein allgemein anwendbares Verfahren, mit dem sich der Wasserstoff der Chromophor-Aminogruppe durch verschiedene Reste ersetzen läßt, besteht darin, Chloractinomycine (LIVa)⁷¹⁾ mit primären und sekundären Aminen umzusetzen⁷²⁾. Neben anderen sind so die Derivate LIVa, LIVb, LIVc, LIVd, LIVe, LIVf, LIVg und LIVh gewonnen worden⁷³⁾. Ihre Tumorwirksamkeit und Toxizität ist geringer als die der Actinomycine. Ob bei einem von ihnen der therapeutische Index der Tumorhemmung den der Actinomycine übertrifft, ist noch nicht entschieden. Ebenso wie bei den Peptidgruppen sind ausgehend von den Actinomycinen die Variationsmöglichkeiten am Chromophor örtlich beschränkt, und ebenso wie bei den Peptidgruppen ist auch beim Chromophor diese Beschränkung gefallen, seit man einen Weg zur Synthese der Actinomycine kennt.

Eingegangen am 17. Oktober 1960 [A 91]

⁶⁸⁾ H. Brockmann u. B. Franck, Angew. Chem. 68, 68 [1956]; das Diacetat wurde für ein Triacetat gehalten. Inzwischen hat sich herausgestellt, daß der Acetylwert durch eingeschlossene Essigsäure so hoch war, daß er auf ein Triacetat paßte.

⁷⁰⁾ A. Butenandt, U. Schiedt u. E. Biekert, Liebigs Ann. Chem. 588, 108 [1954].

⁷¹⁾ H. Brockmann, H. Gröne u. G. Pampus, Chem. Ber. 91, 1916 [1958].

⁷²⁾ H. Brockmann, G. Pampus u. R. Mecke, ebenda 92, 3082 [1959].

⁷³⁾ H. Brockmann u. W. Müller, unveröffentl.