

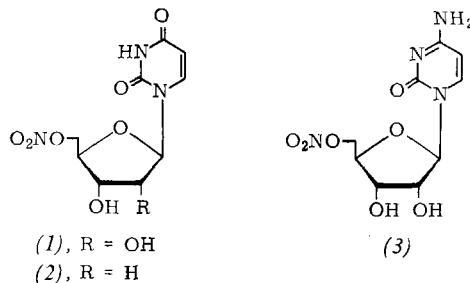
Die Synthese und Versütterung eines spezifisch ^3H - und ^{14}C -markierten Hydroxyloganins werden zur Zeit in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. *A. R. Battersby*, Cambridge, England, durchgeführt.

Eingegangen am 3. Mai 1973,
ergänzt am 29. Mai 1973 [Z 853]

5'-Nitrato von Pyrimidin-Nucleosiden: Salpetersäure-Analoga der Nucleotide^{[1][**]}

Von F. W. Lichtenhaler und H. J. Müller^[*]

Bei direkter Umsetzung ungeschützter Pyrimidin-Nucleoside mit Salpetersäure kann, je nach Reaktionsbedingungen, Nitrierung an C-5 der Nucleobase mit zusätzlicher Oxidation der 5'-Hydroxygruppe zur Carbonsäure^[2] oder Nitratierung der Zucker-Hydroxyfunktionen zu Di-*O*- und Tri-*O*-nitro-nucleosiden eintreten^[3, 4]. Wir beschreiben nun Bedingungen, die es gestatten, aus Ribo- und Desoxyribonucleosiden direkt^[5] und in präparativ brauchbaren Ausbeuten 5'-*O*-Nitro-nucleoside (Nucleosid-5'-nitrate), z. B. (1)–(3), darzustellen, die als Salpetersäure-Analoga der 5'-Phosphate pharmakologisches Interesse beanspruchen.



So liefert Uridin bei Umsetzung mit 90-proz. Salpetersäure (1.5 h, -70 °C) ein Gemisch, das neben etwa 40% Ausgangsverbindung 5'-O-Nitro-uridin (1) und zwei Di-O-nitrate im Verhältnis 5:1 enthält. Hieraus lässt sich (1) durch Essigester-Extraktion in 44-proz. Ausbeute als Nadeln vom $F_p = 139^\circ\text{C}$ und $[\alpha]_D^{20} + 16^{[6]}$ gewinnen, während aus der Dinitrat-Fraktion bislang nur das 3',5'-Di-O-nitro-uridin durch schichtchromatographische Auftrennung als Blättchen vom $F_p = 179\text{--}182^\circ\text{C}$ und $[\alpha]_D^{20} + 12^\circ$, Ausbeute 5%, rein erhalten wurde.

Bei Anwendung der genannten Bedingungen auf 2'-Desoxyuridin lassen sich das 5'-O-Nitrat (2), $Fp = 175^\circ C$, $[\alpha]_D^{20} = +42^\circ$, in 20-proz. Ausbeute neben 13% 3',5'-Di-O-nitro-2'-desoxyuridin, $Fp = 113^\circ C$ ($129^\circ C$ ¹³), $[\alpha]_D^{20} = +12^\circ$, gewinnen. Aus Cytidin entsteht unter den gleichen Bedingungen ein 5:1-Gemisch aus dem 5'-O-Nitrat (3) und zwei Dinitraten, aus dem sich (3) in 46-proz. Ausbeute als Nadeln vom $Fp = 160-161^\circ C$, $[\alpha]_D^{20} = +28^\circ$, abtrennen lässt.

Der Beweis für das Vorliegen der 5'-O-Nitrate folgt eindeutig aus den NMR-spektroskopischen Daten von (1)–(3), insbesondere aus der Lage der 5'-CH₂-Signale, die im Vergleich zu denen der Ausgangsverbindungen um etwa 1.2 ppm paramagnetisch verschoben sind.

Dieses Verfahren der direkten 5'-O-Nitratisierung dürfte sich problemlos zur Darstellung weiterer 5'-O-Mononitrate von Pyrimidin-Nucleosiden heranziehen lassen.

5'-O-Nitro-uridin (1)

In 7.5 ml 90-proz. HNO_3 ($\rho = 1.48$), auf -70°C gekühlt, werden unter kräftigem Rühren 1.2 g (4.9 mmol) Uridin eingetragen. Die nach kurzer Zeit klare Lösung wird 1 h bei -70°C und nach Zusatz weiterer 7.5 ml 90-proz. HNO_3 nochmals 30 min bei -70°C gerührt^[7]. Das Gemisch wird sodann in Eiswasser (80 ml) eingerührt, mit 50 ml Essigester überschichtet und durch anteilweise Zugabe von festem NaHCO_3 neutralisiert. Die wässrige Phase^[8] wird mit Essigester (6 \times 50 ml) extrahiert, die vereinigten Extrakte werden getrocknet (MgSO_4) und eingedampft. Bei Aufnahme des schaumigen Rückstandes in heißem Äthanol, Behandeln mit Aktivkohle und langsamem Abkühlen kristallisiert (1) (530 mg, 37%) in Form farbloser Nadeln vom $\text{Fp} = 139^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{20} = +16^\circ$ ($c = 1$, DMF).

Eingegangen am 24. Januar 1973 [Z 788]
Auf Wunsch der Autoren erst jetzt veröffentlicht

- [1] Nucleoside, 15. Mitteilung. – Als 14. Mitteilung gilt: J. Černá, I. Rychlik u. F. W. Lichtenhaler, FEBS Lett. 30, 147 (1973).

[2] P. A. Levene u. F. B. La Forge, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 45, 608 (1912); J. Wempen, J. L. Doerr, L. Kaplan u. J. J. Fox, J. Amer. Chem. Soc. 82, 1624 (1960).

[3] R. Duschinsky u. U. Eppenberger, Tetrahedron Lett. 1967, 5103; R. Duschinsky, Schweiz. Pat. 492721 (1967); Chem. Abstr. 73, 131272 (1970).

[4] T. Kanai, C. Yamashita u. M. Ichino, Jap. Pat. 7127463 (1968); Chem. Abstr. 75, 130077 (1971).

[5] Das einzige bislang bekannte Nucleosid-5'-nitrat, ebenfalls aus dem ungeschützten Nucleosid zugänglich durch Reaktion mit *in situ* erzeugtem Diäthyl-O-nitro-phosphorothioat (Ausb. 30%), ist 5'-O-Nitro-thymidin: I. Schwandt, G. Teichmann, G. Hilgetag, G. Kowallik u. P. Langen, Z. Chem. 8, 176 (1968).

[6] Alle beschriebenen neuen Verbindungen ergaben befriedigende verbrennungsanalytische Daten. Die Drehwerte wurden jeweils in *N,N*-Dimethylformamid bei $c=1$ bestimmt.

[7] Kräftiges Rühren ist erforderlich, da sonst das Gemisch erstarrt.

[8] Die organische Phase enthält Mononitrat (1) und Dinitrat im etwaigen Verhältnis von 1:1 (DC in $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 9:1); eine Trennung durch präparative Schichtchromatographie (20 \times 40 cm-Platte mit 1.75 mm Merck-Kieselgel $\text{PF}_{354+366}$ und 9:1 $\text{CHCl}_3/\text{Methanol}$ als Laufmittel) liefert weiter 100 mg (7%) (1).

Methoxymethyl-isocyanat als neue reversible SH-Schutzgruppe in der Protein- und Peptidchemie

Von *Harald Tschesche* und *Helmut Jering*^[*]

Die gebräuchlichen Blockierungsreagentien zur Alkylierung, Mercurierung oder Oxidation der SH-Gruppe des Cysteins^[1] führen zur irreversiblen Derivatisierung der Thiolfunktion.

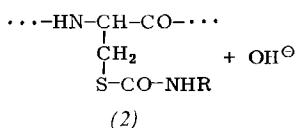
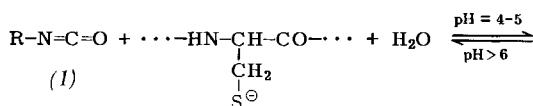
Wie wir fanden, eignet sich Methoxymethyl-isocyanat (*1a*) ausgezeichnet zur raschen und selektiven Carbamoylierung von Cystein-SH bei pH=4-5 in wäßrigem Milieu und bei Raumtemperatur. Die Reaktion zu (*2a*) verläuft sehr rasch und ist bei Überschuß an Reagens in weniger als 2 min vollständig. Unter den genannten Bedingungen reagieren die α - und ϵ -Aminogruppen nicht. Das gebildete

[*] Prof. Dr. F. W. Lichtenthaler und Dipl.-Chem. H. J. Müller
Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule
61 Darmstadt, Schloßgartenstraße 2

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

[*] Doz. Dr. H. Tschesche und Dipl.-Biol. H. Jering
Organisch-Chemisches Laboratorium der Technischen Universität
München,
Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie
8 München 2, Arcisstraße 21

N-Methoxymethyl-*S*-carbamoyl-Derivat (2a) des Cysteins ist bis pH = 6 ausreichend stabil (s. Tabelle 1). Im Vergleich dazu beträgt die Halbwertszeit des unsubstituierten *S*-Carbamoyl-Derivates (2b) aus Cyanat und Cystein nur etwa 10 min bei 25°C und pH = 6^[2].



(a), R = H₃C-O-CH₂; (b), R = H

Methyl-, Äthyl- und tert.-Butyl-isocyanat reagieren bei pH = 4–7 in wäßrigem Milieu nur sehr langsam und sind daher wenig geeignet.

Die Deblockierung der SH-Funktion unter Abspaltung der *N*-Methoxymethyl-carbamoyl-*S*-Schutzgruppe gelingt leicht und unter schonenden Bedingungen im alkalisch-wäßrigen Milieu (s. Tabelle 1). Bei pH = 9.6 ist die Abspaltung vom Cystein nach 30 min, vom Glutathion nach 60 min vollständig.

Tabelle 1. Abspaltung der Schutzgruppe aus Cystein (Cys) und Glutathion (GSH) bei Raumtemperatur.

pH	t [min]	SH-Freisetzung [%]	
		Cys	GSH
9.6	30	100	80
8.6	100	100	55
7.6	100	67	20
6.0	180	2	1.5

Methoxymethyl-isocyanat (1a) wurde als Schutzgruppe zur reversiblen Blockierung der SH-Funktion in Cystein, Glutathion, Papain und selektiv an Cys¹⁴-Cys³⁸ reduziertem Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen^[3] eingesetzt.

Die enzymatische Aktivität von Papain wurde durch Reaktion von Methoxymethyl-isocyanat mit der reaktiven Thiolgruppe von Cys²⁵ augenblicklich blockiert. Die proteolytische Aktivität des bei pH = 5.6 inaktivierten Enzyms ließ sich durch Inkubation bei pH = 8.8 und 20°C innerhalb von 60 min zu 50% regenerieren.

Die beiden SH-Gruppen der selektiv mit Natriumtetrahydridoborat im Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen reduzierten Disulfidbrücke^[3] lassen sich unter den beschriebenen Bedingungen quantitativ mit (1a) umsetzen. Der zweifach *S*-carbamoylierte Inhibitor ist gegenüber Trypsin vollständig inaktiv. Die Abspaltung der SH-Schutzgruppen bei pH = 9.5 und 20°C in Gegenwart von Glycylglycin und die anschließende Oxidation der benachbarten Thiolgruppen zur Disulfidbrücke unter Sauerstoffzutritt beim gleichen pH-Wert regenerieren die Aktivität des Inhibitors innerhalb von 60 min vollständig.

Allgemeine Arbeitsvorschrift:

1 µmol Peptid oder Protein wurde in 0.5 ml 0.2 M Natrium-succinat-Puffer (pH = 4.0) gelöst und pro mol Cystein 350 µmol Methoxymethyl-isocyanat (1a)^[4], gelöst in Dimethylformamid [50 µl (1a) in 150 µl DMF], bei Raum-

temperatur unter Rühren zugefügt. Bei gleichzeitiger leichter CO₂-Entwicklung erfolgt innerhalb von 2 min quantitative Umsetzung. Es wird noch 3 min bis zur vollständigen Zersetzung des Reagens gerührt und anschließend die Lösung zur Abtrennung der Reaktionsprodukte und Puffersalze der Gelfiltration an Sephadex G-15 oder Bio Gel P-2 in 10-proz. Essigsäure unterworfen. Das *N*-Methoxymethyl-*S*-carbamoyl-Derivat (2a) kann in saurer Lösung oder aus saurer Lösung lyophilisiert aufbewahrt werden. Mit NaBH₄ unter Stickstoff reduzierte Disulfidbrücken können direkt im Reaktionsansatz nach Abstumpfen der zur Zerstörung des überschüssigen Reduktionsmittels verwendeten Säure bei pH = 4 mit (1a) umgesetzt werden. – Papain wird bei pH = 5.6 gelöst und mit nur 20 statt 350 µmol (1a) versetzt.

Zur Abspaltung der SH-Schutzgruppe werden 1 µmol geschütztes Peptid oder Protein in 0.5 ml 0.1 M Tris/HCl-Puffer (pH = 9.5) gelöst, 1 mg Glycylglycin als Cyanatsänger zugesetzt und die Lösung 60 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zur Vermeidung unerwünschter Reoxidationen der SH-Gruppen ist die Abspaltung unter Stickstoff durchzuführen.

Eingegangen am 18. Juni 1973 [Z 863]

[1] G. E. Means u. R. E. Feeney: Chemical Modification of Proteins. Holden-Day, San Francisco 1971.

[2] G. R. Stark, W. H. Stein u. S. Moore, J. Biol. Chem. 235, 3177 (1960); G. R. Stark, ibid. 239, 1411 (1964).

[3] L. F. Kress u. M. Laskowski, Sr., J. Biol. Chem. 242, 4925 (1967).

[4] Der Bayer AG, Leverkusen, danken wir für eine Probe.

[2+2]-Photocycloadditionen mit Phenanthren – mechanistische Modelle für Zweistufenprozesse^[**]

Von Gerd Kaupp^[*]

Das anhaltende Interesse an konzertierten Singulett- sowie Triplet-Photocycloadditionen^[1] und der experimentelle Nachweis kinetisch wirksamer Zwischenprodukte bei intramolekularen Modellen^[2] legen mechanistische Entscheidungen auch bei intermolekularen Beispielen nahe. Wir berichten jetzt über experimentelle Ergebnisse an einem typischen Modellsystem (Fluoreszenz, selektive Anregung, keine komplizierende *cis/trans*-Isomcrisierung) für nicht stereospezifische [2π + 2π]-Photoadditionen. Mangelnde Stereoselektivität spricht für Zwischenprodukte mit internen Rotationen, jedoch sind zusätzliche Daten notwendig, um dem Postulat konkurrierender supra- und antarafacialer Additionen^[1] zu begegnen. Hierzu sind die Photoadditionen von Phenanthren (1)^[3] mit Malein- (3) und Fumarsäuredimethylester (2) zu (6) und (7) geeignet^[4]. Das Ergebnis wurde inzwischen durch Annahme von Exciplexen^[5, 6] (elektronisch angeregten π-Komplexen mit der Möglichkeit zur Lumineszenz) sowie nicht synchroner Triplettsmechanismen^[6] gedeutet. Dagegen führt eine Kombination von Ausbute-, Quantenausbeute- und Lumineszenzmessungen unter Zuhilfenahme von Molekülmodellen zu einem Verständnis des kaum variierenden (6):(7)-Verhältnisses (s. Tabelle 1) auf der Grundlage eines zweistufigen Singulettmechanismus^[4] entsprechend dem Formelschema.

[*] Dr. G. Kaupp
Chemisches Laboratorium der Universität
78 Freiburg, Albertstraße 21

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.