

Synthese der 5'-O-Acetyl- und 5'-O-Halogenacetyl-derivate von Puromycin

Hans Hagen von Döhren und Fritz Eckstein*

Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Abteilung Chemie,
D-3400 Göttingen, Hermann-Rein-Straße 3

Eingegangen am 6. März 1975

Die Synthese von 5'-O-Bromacetyl- (**10**) und 5'-O-Chloracetylpuromycin (**5b**) als potentielle Reagentien für die Affinitätsmarkierung ribosomaler Proteine wird beschrieben. – Zur Darstellung von 5'-O-Acetyl- (**5a**) und 5'-O-Chloracetylpuromycin (**5b**) wird die freie Aminogruppe des Puromycins mit der Benzoyloxycarbonyl-Gruppe blockiert. Die Einführung der Acetyl- bzw. Chloracetylgruppe durch die Anhydride erfolgt gleichzeitig an der 5'- und 2'-Hydroxygruppe. Die 2'-O-Acylgruppen können jedoch durch Behandlung mit methanolischer Ammoniaklösung selektiv entfernt werden, so daß nach Abtrennung der *N*-Benzoyloxycarbonyl-Gruppe durch katalytische Hydrierung 5'-O-Acetyl- und 5'-O-Chloracetylpuromycin in Ausbeuten von 36 bzw. 28% erhalten werden. – Der Syntheseweg zum 5'-O-Bromacetylpuromycin (**10**) muß modifiziert werden, da die Bromacetylgruppe bei der Hydrierung reduziert wird. Die Aminogruppe des Puromycins wird mit der *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe blockiert, die mit Trifluoressigsäure leicht abzuspalten ist. Eine selektive Bromacetylierung der 5'-Hydroxygruppe mit Bromessigsäureanhydrid ist möglich. Die Gesamtausbeute beträgt ca. 20%.

Synthesis of 5'-O-Acetyl- and 5'-O-Haloacetyl-puromycin

The synthesis of 5'-O-bromoacetyl- (**10**) and 5'-O-chloroacetylpuromycin (**5b**) as potential reagents for affinity labelling of ribosomal proteins is described. – For the preparation of 5'-O-acetyl- (**5a**) and 5'-O-chloroacetylpuromycin (**5b**) the free amino group of puromycin is protected with the benzoyloxycarbonyl group. The introduction of the acetyl- and the chloroacetyl group by reaction with the corresponding anhydrides takes place simultaneously at the 5'- as well as the 2'-hydroxy groups. However, the 2'-O-acyl groups can selectively be removed by treatment with methanolic ammonia. After removal of the *N*-benzoyloxycarbonyl group by catalytic hydrogenation the 5'-acetyl and 5'-chloroacetyl puromycins are obtained in 36 and 28% yield, respectively. – The synthetic route to 5'-O-bromoacetylpuromycin (**10**) had to be modified since the bromoacetyl group is reduced on hydrogenation. The amino group of puromycin is protected with the *tert*-butyloxycarbonyl group which is removed with trifluoroacetic acid. Selective bromoacetylation of the 5'-hydroxy group is possible with bromoacetic anhydride. The overall yield is approximately 20%.

Die Affinitätsmarkierung¹⁾ ermöglicht es, durch kovalente Bindung von Substratanalogen im aktiven Zentrum von Enzymen Aufschlüsse über den Ort und Ablauf der katalysierten Reaktionen zu erhalten. So haben in den letzten Jahren verschiedene Arbeitsgruppen versucht, das aktive Zentrum der Peptidyltransferase zu markieren und die

¹⁾ S. J. Singer, *Advan. Protein Chem.* **22**, 1 (1967).

Bindungsorte der Transfer-Ribonukleinsäuren am Ribosom bei der Proteinbiosynthese zu untersuchen²⁻⁸). Das Antibiotikum Puromycin (1), das dem 3'-Ende einer Aminoacyl-tRNA strukturell sehr ähnlich ist, dessen freie Aminogruppe mit der wachsenden Peptidkette reagiert und das deshalb eine starke antibiotische Wirkung zeigt⁹⁻¹¹), scheint wie tRNA in unmittelbarer Nachbarschaft zur Peptidyltransferase angelagert zu werden und wie Aminoacyl-tRNA zu reagieren. Deshalb wurde auch Puromycin mit reaktiven Substituenten als Affinitätsmarkierer eingesetzt, um den Ort der Peptidyltransferase am Ribosom zu lokalisieren.

Pongs et al.^{12,13}) synthetisierten zu diesem Zwecke *N*-Jodacetylpuromycin, blockierten damit jedoch die wichtige freie Aminogruppe. Symons et al.^{14,15}) setzten einen sehr großen Substituenten für die Markierung an der 5'-Position des Puromycins ein und kamen zu völlig anderen Ergebnissen. Um in den Markierungsversuchen noch die durch das ribosomale Enzym katalysierte Bindung von Puromycin an die wachsende Peptidkette zu ermöglichen, werden in dieser Arbeit Derivate des Antibiotikums dargestellt, die mit den kleinen reaktiven Halogenacetylsubstituenten in der 5'-Position als potentielle Affinitätsmarkierer der Peptidyltransferase dienen sollen.

Schutz der Aminogruppe

Bevor die 5'-Hydroxygruppe des Puromycins acyliert werden kann, muß die stärker nucleophile Aminogruppe selektiv geschützt werden. Aus der Peptidchemie bieten sich dazu die Benzyloxycarbonyl- und die *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe an. Die Benzyloxycarbonyl-Gruppe (Z) läßt sich leicht durch Chlorameisensäure-benzylester in Dioxan und Pyridin als Protonenacceptor einführen und später schonend durch Hydrierung in Eisessig oder Methanol abtrennen, ohne daß alkalilabile 5'-Esterbindungen angegriffen werden.

Für den Syntheseweg der Bromacetylverbindung wird die *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe eingesetzt. Das entsprechende Azid reagiert in Gegenwart von Triäthylamin sehr gut mit Puromycindihydrochlorid in Dimethylformamid. Die *N*-geschützten Puromycinderivate sind in Chloroform löslich und auf Kieselgel leicht von Nebenprodukten chromatographisch zu trennen.

²) A. P. Czernilofsky und E. Kuechler, *Biochim. Biophys. Acta* **272**, 667 (1972).

³) A. P. Czernilofsky, E. E. Collatz, G. Stöffler und E. Kuechler, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 230 (1974).

⁴) R. Hauptmann, A. P. Czernilofsky, H. O. Voorma, G. Stöffler und E. Kuechler, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **56**, 331 (1974).

⁵) M. Pellegrini, H. Oen und C. R. Cantor, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 837 (1972).

⁶) H. Oen, M. Pellegrini, D. Eilat und C. R. Cantor, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **70**, 2799 (1973).

⁷) D. Eilat, M. Pellegrini, H. Oen, N. de Groot, Y. Lapidot und C. R. Cantor, *Nature (London)* **250**, 514 (1974).

⁸) L. Bispink und H. Matthaehi, *FEBS-Lett.* **37**, 291 (1973).

⁹) R. R. Traut und R. E. Monro, *J. Mol. Biol.* **10**, 63 (1964).

¹⁰) D. Nathans in *Antibiotics*, Herausgeb. D. Gottlieb und P. D. Shaw, Bd. 1, S. 259, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1967.

¹¹) R. J. Suhadolnik, *Nucleoside Antibiotics*, S. 3, Wiley, Interscience, New York 1970.

¹²) O. Pongs, R. Bald, T. Wagner und V. A. Erdmann, *FEBS-Lett.* **35**, 137 (1973).

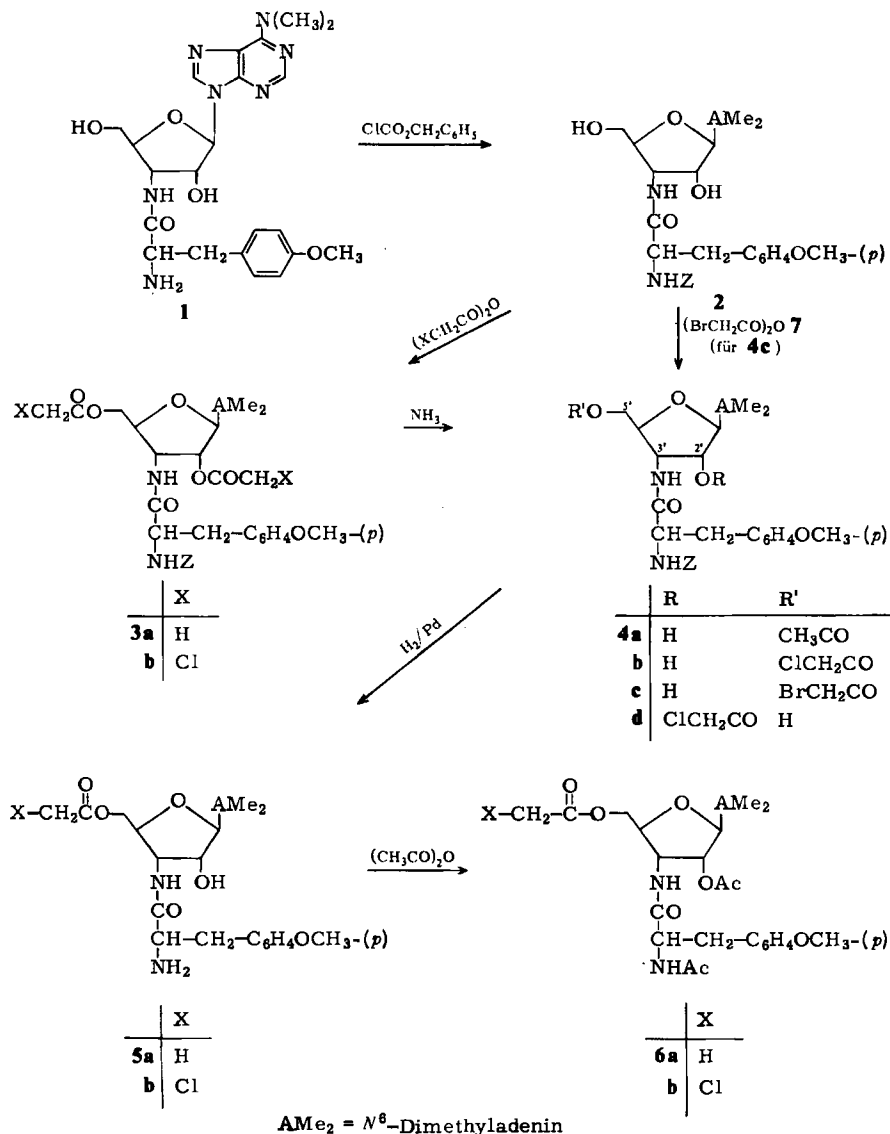
¹³) O. Pongs, K. H. Nierhaus, V. A. Erdmann und H. G. Wittmann, *FEBS-Lett.* **40**, Supplement, S28 (1974).

¹⁴) R. J. Harris, P. Greenwell und R. H. Symons, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**, 117 (1973).

¹⁵) P. Greenwell, R. J. Harris und R. H. Symons, *Eur. J. Biochem.* **49**, 539 (1974).

Acylierung

Zur Acylierung wird **2** mit Acetanhydrid bzw. Chlor- oder Bromessigsäureanhydrid umgesetzt. Auf Grund der verschiedenen Substituenten an der Acetylgruppe verlaufen die Reaktionen sehr unterschiedlich.



Bei den relativ schnellen Reaktionen mit Acetanhydrid und Chloressigsäureanhydrid ist keine Selektivität für die 5'-Hydroxygruppe zu erreichen; es reagiert auch die sekundäre 2'-Hydroxygruppe. Wie durch Untersuchung der Produkte während der Reaktion auf

Dünnschichtchromatogrammen zu erkennen ist, bildet sich zunächst mehr 2'-acyliertes Produkt neben 5'-acyliertem; beide reagieren jedoch sofort weiter zum disubstituierten, das man als Hauptprodukt durch Einsatz von überschüssigem Anhydrid in guter Ausbeute erhält. Während die Reaktion mit Acetanhydrid bei Raumtemperatur ablaufen kann, muß die Reaktion mit Chloressigsäureanhydrid wegen der möglichen Nebenreaktion mit Pyridin zum Betain eisgekühlt werden. In den disubstituierten Produkten wird durch sehr vorsichtige Behandlung mit methanolischer Ammoniaklösung die 2'-O-Acyloxyesterbindung fast selektiv gespalten.

Die Acylierung mit Bromessigsäureanhydrid (7), das sich ohne Schwierigkeiten aus Bromessigsäure und Dicyclohexylcarbodiimid in Essigester darstellen läßt, ist in einem einzigen Schritt durchführbar, ohne daß ein Angriff auf die 2'-Hydroxygruppe stattfindet. Damit kann die Gefahr einer Substitution des Bromatoms bei der sonst folgenden ammoniakalischen Abspaltung einer Acylgruppe umgangen werden.

Die dargestellten acetylsubstituierten *N*-Benzyloxycarbonylpuromycine unterscheiden sich in ihrem Verhalten bei der Kieselgelchromatographie nicht wesentlich von ihren Chlor- bzw. Bromanalogen. Anhand der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten lassen sich die in verschiedenen Positionen substituierten Produkte sehr gut differenzieren.

Tab. 1. R_F -Werte auf Kieselgeldünnschichtchromatogrammen
(Laufmittel Chloroform/Methanol 9:1)

Verbindung	R_F -Wert	Verbindung	R_F -Wert
Z-Pu (2)	0.66	5'-ClAc-Z-Pu (4b)	0.78
2'-ClAc-Z-Pu (4d)	0.71	2',5'-ClAc ₂ -Z-Pu (3b)	0.83

Nicht substituiertes 2 ist mit zwei Hydroxygruppen polar und läuft relativ langsam. Die Änderung der Polarität durch Acylierung der sterisch exponierteren primären 5'-Hydroxygruppe macht sich viel stärker bemerkbar als diejenige beim 2'-Derivat 4d. Disubstituiertes 3b ist das unpolare Produkt und läuft daher am schnellsten. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität bzw. hydrophoben Eigenschaften lassen sich diese Verbindungen leicht auf Kieselgelsäulen mit Chloroform/Methanol-Gemischen trennen und reinigen.

Als Beweis für den Ort der jeweiligen Substitution kann man die chemische Verschiebung der benachbarten Riboseprotonen im NMR-Spektrum heranziehen.

Tab. 2. Chemische Verschiebung δ (in ppm) der Protonen im Ribosering
von *N*-Benzyloxycarbonylpuromycin und seinen Chloracetylderivaten

	1'-H	2'-H	3'-H	4'-H	5'-H ₂
Z-Pu (2)	5.7	4.3	4.3	3.8	3.8
2'-ClAc-Z-Pu (4d)	5.9	5.4	4.0–4.7	4.0–4.5	3.8
5'-ClAc-Z-Pu (4b)	5.9	4.2–4.7	4.2–4.7	4.2–4.7	4.3
2',5'-ClAc ₂ -Z-Pu (3b)	6.1	5.7	4.2	4.2	4.2

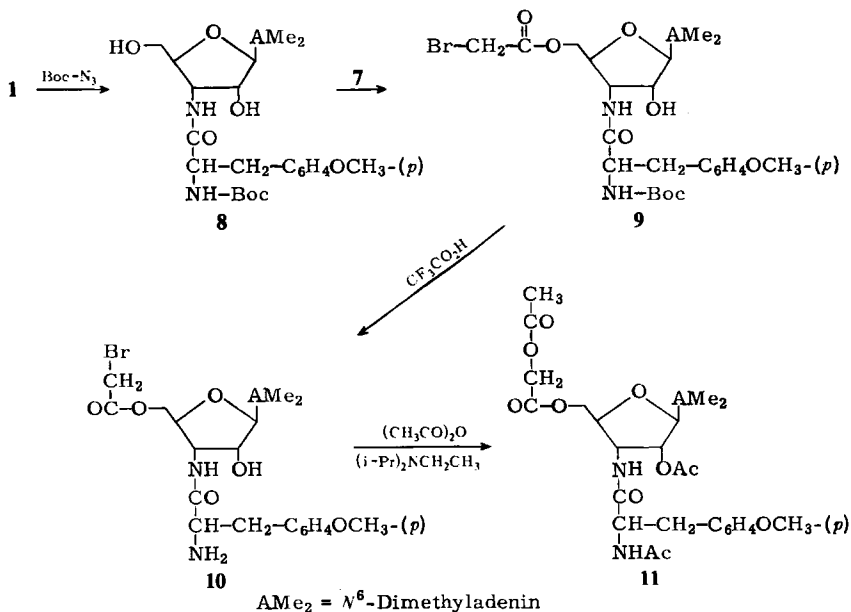
Klar zu erkennen ist, daß beim 2'- und 2',5'-Produkt die 2'-Protonen wegen des starken Elektronenzugs der Acylgruppen weniger vom Magnetfeld abgeschirmt werden und die Signale deshalb im niedrigeren Feld liegen (höhere δ -Werte). Den gleichen Effekt beobachtet man bei den 5'-Protonen des 5'- und 2',5'-Produktes.

Die Abspaltung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe aus **4a** und **b** bereitet keine Schwierigkeiten. Durch katalytische Hydrierung mit Palladium auf Aktivkohle in Essigsäure oder Methanol erhält man **5a** bzw. **b**, die durch Ausfällen mit Petroläther aus Chloroform gereinigt, jedoch nur sehr schlecht kristallisiert werden können. Die Reaktion der freien Aminogruppen mit Ninhydrin verläuft positiv.

Zum Nachweis der Struktur wird mit Acetanhydrid und wenigen Tropfen *N*-Äthyl-diisopropylamin acetyliert. Das kristallisierte Reaktionsprodukt aus **5a** ist nach Schmelzpunkt und R_f -Wert identisch mit Kristallen von *N*,2',5'-Triacetylpuromycin (**6a**), das durch Umsetzen von Puromycindihydrochlorid mit überschüssigem Acetanhydrid unter gleichen Bedingungen direkt synthetisiert wird. Auch **5b** wird auf dieselbe Weise vollständig zum leicht kristallisierbaren **6b** acetyliert. Elementaranalyse, NMR- und Massenspektrum beweisen das Vorliegen des acetylierten *N*,2'-*O*-Diacetyl-5'-*O*-chloracetylpuromycins (**6b**).

5'-O-Bromacetylpuromycin

Bei der katalytischen Abtrennung der Benzyloxycarbonyl-Gruppe aus **4c** wird – im Gegensatz zur Chloracetylgruppe – die Bromacetylgruppe zur Acetylgruppe reduziert, so daß nach vollständiger Acetylierung des Produktes wieder Triacetylpuromycin (**6a**) chromatographisch und NMR-spektrometrisch nachgewiesen wird.



Deshalb wird zur Synthese des 5'-*O*-Bromacetylpuromycins die Puromycin-Amino-Gruppe mit der *tert*-Butyloxycarbonylgruppe blockiert. Die Bromacetylierung von **8** zu **9** verläuft wie beim Benzyloxycarbonyl-Produkt. Die anschließende Abtrennung der Schutzgruppe durch Versetzen mit Trifluoressigsäure ergibt ein Produkt, das im Chromatogramm wie **5a** und **5b** läuft und mit Ninhydrin reagiert. Zur weiteren Charakterisierung wird **10** vollständig acetyliert.

Das Reaktionsprodukt läuft im Chromatogramm wie **6**, enthält jedoch kein Brom mehr. Während bei der Reaktion des analogen Chlorderivats **5b** keine Nebenreaktionen ablaufen, wird **10** auch an der Bromacetylgruppe durch einen Acetatrest nucleophil substituiert. 5'-*O*-Acetoxyacetyl-*N*,2'-*O*-diacetylpuromycin (**11**) wird chromatographisch gereinigt und aus Äthanol umkristallisiert. Das Massenspektrum zeigt den erwarteten Molekülpeak von 655 und die üblichen Spaltstücke, die Eggers et al.¹⁶⁾ bei Puromycin und Acetylderivaten beobachtet haben.

Die Reaktion von **10** mit 2-Mercaptoäthanol in Methanol bei Raumtemperatur ergibt wie erwartet ein Produkt, das sich im Dünnschichtchromatogramm wegen seiner ähnlichen hydrophoben Eigenschaften nicht vom Puromycin unterscheidet (R_F 0.18). Das zeigt die gute Reaktionsfähigkeit von **10** gegenüber Thiolgruppen.

Die Verbindungen **5a**, **5b** und **10** werden z. Z. in ihrem Verhalten bei der polyuridylsäure-abhängigen Polyphenylalanin-Synthese an Ribosomen untersucht.

Die Autoren danken Herrn B. Seeger für die Aufnahme der NMR-Spektren und Herrn H. Steinert für die Massenspektren. Die Arbeit ist Teil der Dissertation von H. H. v. Döhren an der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen.

Experimenteller Teil

Dünnschichtchromatographie wurde auf DC-Mikrokarten SIF (Kieselgel mit Fluoreszenzindikator, 5 × 10 cm, Riedel-de Häen) mit Chloroform/Methanol (9 : 1, v/v) als Laufmittel durchgeführt. Alle angegebenen R_F -Werte beziehen sich auf dieses System. Substanzen mit freien Aminogruppen werden durch Besprühen mit Ninhydrin-Sprühreagenz 0.1proz. (Merck) und anschließende Erwärmung auf 110°C bis zur optimalen Farbentwicklung der Flecken nachgewiesen. Für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (Korngröße 0.063–0.200 mm, Merck) verwendet. Die Säulen wurden zunächst mit einer 4 cm hohen Seesandschicht am Boden versehen und dann mit in Chloroform suspendiertem Kieselgel aufgefüllt. Eluiert wurde mit Chloroform/Methanol-Gemischen an einem mit UV-cord ausgestatteten Fraktionssammler, Fraktionen von 15 ml wurden gesammelt. Die präparative Schichtchromatographie wurde auf PSC-Fertigplatten (Kieselgel F 254, 20 × 20 cm, Schichtdicke 2 mm, Merck) und mit Chloroform/Methanol als Laufmittel ausgeführt. Die gewünschten UV-aktiven Zonen wurden ausgekratzt und auf eine am Boden mit 4 cm Seesand beschichteten Säule (1.5 cm × 25 cm) gefüllt, die Produkte mit Chloroform/Methanol (1 : 1) eluiert und am Rotationsverdampfer bei Raumtemp. eingedampft. Die Schmelzpunkte wurden auf dem Kofler-Block bestimmt und sind unkorrigiert. Die UV-Spektren wurden in Quarzküvetten mit 1 cm Lichtweg im Cary 16-Spektrometer aufgenommen; als Lösungsmittel diente Methanol. Die ¹H-NMR-Spektren wurden an einem Bruker-60-MHz-Kernresonanzspektrometer HX 60 gemessen; als Lösungsmittel dienen CH₃OD und CDCl₃, als innerer Standard Tetramethylsilan; es wurden nur NMR-Signale für jeweils neu eingeführte Gruppen angegeben. Die Massenspektren wurden von Herrn H. Steinert (Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung, Stöckheim) gemessen.

¹⁶⁾ S. H. Eggers, S. I. Biedron und A. O. Hawtrey, Tetrahedron Lett. 1966, 3271.

N-Benzyloxycarbonylpuromycin (**2**): 544 mg Puromycindihydrochlorid (1 mmol) werden in 200 ml 2 N NH₃ gelöst bzw. suspendiert, das freie Puromycin (**1**) wird mehrmals im Schütteltrichter mit Chloroform ausgeschüttelt, die Chloroformphase mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Das erhaltene **1** wird möglichst weitgehend in Dioxan gelöst und mit einem Tropfen Pyridin und 156 µl Chlorameisensäure-benzylester (1.1 mmol) versetzt. Nach 5 min bei Raumtemp. werden wenige Tropfen Wasser zum Lösen des entstandenen Niederschlags zugegeben. Die Lösung wird eingedampft, in Chloroform mit einigen Tropfen Methanol gerade gelöst und an einer Kieselgelsäule chromatographiert (3 × 50 cm, erst linearer Gradient aus je 1 Liter CHCl₃ und CHCl₃/CH₃OH (97:3, v/v), danach aus je 1 Liter CHCl₃/CH₃OH (97:3) und CHCl₃/CH₃OH (80:20)). Als einzelne Fraktionen erhält man nacheinander *N*,5'-O-Bis(benzyloxycarbonyl)puromycin (5%), **2** (45%) und **1** (45%). **2** wird zu einem farblosen Schaum eingedampft und aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 275 mg (45%). Schmp. 213°C. *R*_F 0.66. λ_{max} 275 nm (ε = 19000).

NMR (CDCl₃ + 10% CD₃OD): δ = 2.96 ppm (2H, d, β-CH₂, *J* = 7.5 Hz), 3.50 (6H, s, N(CH₃)₂), 3.75 (3H, s, OCH₃), ≈ 3.80 (2H, 5'-H₂), ≈ 3.82 (1H, 4'-H), ≈ 4.30 (1H, 3'-H), ≈ 4.32 (1H, 2'-H), ≈ 4.45 (1H, α-CH), 5.05 (2H, s, Z), 5.72 (1H, d, 1'-H), 6.98 (4H, q, Ph, *J* = 10.5 Hz), 7.30 (5H, s, Z), 8.18 (2H, Purin).

C₃₀H₃₅N₇O₇ (605.6) Ber. C 59.50 H 5.79 N 16.20 OCH₃ 5.12
Gef. C 59.68 H 6.02 N 16.42 OCH₃ 5.18

2',5'-Di-O-acetyl-*N*-benzyloxycarbonylpuromycin (**3a**): 60 mg **2** (0.1 mmol) werden durch schwaches Erwärmen in 6 ml Acetanhydrid und 3 Tropfen Pyridin gelöst. Nach 30 min wird die Lösung eingedampft, in Chloroform gelöst, 3mal mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, wieder eingedampft und aus Methanol zu farblosen Nadeln umkristallisiert. Ausb. 65 mg (95%). Schmp. 206°C. *R*_F 0.81.

NMR (CDCl₃): δ = 2.08 ppm (6H, s, 2 × Ac), 5.10 (2H, s, Z), 7.35 (5H, s, Z).

C₃₄H₃₉N₇O₉ (689.7) Ber. C 59.22 H 5.66 N 14.22 Gef. C 59.28 H 5.66 N 14.26

5'-O-Acetyl-*N*-benzyloxycarbonylpuromycin (**4a**): 62 mg **3a** (0.09 mmol) werden in 25 ml Methanol und wenigen Tropfen Chloroform durch vorsichtiges Erwärmen gelöst und mit 2.5 ml 2 N NH₃ versetzt. Nach 1 h Reaktionszeit bei Raumtemp. wird eingedampft und das Produkt **4a** auf einer Kieselgelsäule (1.5 × 30 cm, linearer Gradient aus je 0.8 Liter Chloroform und Chloroform/Methanol (19:1)) vom Ausgangsprodukt **3a** und **2** getrennt. Aus Äthanol erhält man 47 mg (80%) farblose Kristalle. Schmp. 199°C. *R*_F 0.78.

NMR (CDCl₃ + CD₃OD): δ = 2.20 ppm (3H, s, Ac). Das zweite Acetylsignal fehlt.

C₃₂H₃₇N₇O₈ (647.7) Ber. C 59.35 H 5.72 N 15.15 Gef. C 59.44 H 5.69 N 15.18

5'-O-Acetylpuromycin (**5a**): 65 mg **4a** (0.1 mmol) lösen sich schwer in 30 ml 15proz. methanolischer Essigsäure. Mit 50 mg Palladium auf Aktivkohle wird die Mischung 2 h unter Schütteln katalytisch hydriert, bis sich die gesamte Substanz gelöst hat. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird durch mehrmalige Kodestillation mit Wasser bei 2 Torr die überschüssige Essigsäure entfernt und mit Petroläther die dünnschichtchromatographisch reine Substanz **5a** aus einer Chloroformlösung ausgefällt. Kristallisationsversuche schlugen fehl. *R*_F 0.30. λ_{max} 277 nm.

NMR (CDCl₃ + CD₃OD, 1:1): δ = 2.15 ppm (3H, s, Ac). Die Signale der Benzyloxycarbonyl-Gruppe fehlen. Die Ninhydrinprobe ist positiv.

N,2'-O,5'-O-Triacetylpuromycin (**6a**)

a) 15 mg **5a** werden in 5 ml Acetanhydrid bei Raumtemp. gelöst und 2 Tropfen *N*-Äthyl-diisopropylamin zugegeben. Nach 30 min wird durch mehrmalige Kodestillation mit Wasser Essigsäure entfernt und aus Äthanol umkristallisiert. Schmp. 214°C. *R*_F 0.51.

NMR (CDCl₃): δ = 2.00 ppm (3H, s, N-Ac), 2.15 (3H, s, O-Ac), 2.20 (3H, s, O-Ac), 3.58 (6H, s, N(CH₃)₂), 3.85 (3H, s, OCH₃).

b) Puromycindihydrochlorid wird wie **5a** mit Acetanhydrid behandelt, wobei man identische Kristalle erhält.

N-Benzoyloxycarbonyl-2',5'-bis-O-(chloracetyl)puromycin (3b): 80 mg **2** (getrocknet) werden bei 0°C in 20 ml trockenem Pyridin gelöst, mit 4 Äquivalenten (90 mg) Chloressigsäureanhydrid versetzt und über Nacht im Kühlschrank bei 0°C stehengelassen. Nach Zugabe von wenig Wasser wird die Reaktionslösung bei 2 Torr eingedampft, in Chloroform gelöst, mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und wieder eingedampft. Durch Umkristallisieren aus Äthanol erhält man 95 mg (94%) farblose Kristalle. Schmp. 165°C. R_F 0.83.

NMR (CDCl₃ + CD₃OD): δ = 4.13 ppm (4H, s, 2 × ClAc), 4.23 (1H, 3'-H), 4.23 (1H, 4'-H), 4.23 (2H, 5'-H₂), 5.75 (1H, 2'-H), 6.07 (1H, 1'-H).

C₃₄H₃₇Cl₂N₇O₉ (758.6) Ber. C 53.82 H 4.88 Cl 9.37 N 12.93

Gef. C 54.09 H 4.96 Cl 9.34 N 12.97

N-Benzoyloxycarbonyl-5'-O-chloracetylpuromycin (4b): 200 mg **3b** werden in 100 ml Methanol und möglichst wenig Chloroform gelöst. Dazu werden 2 ml 2 N NH₃ getropft und sofort (!) i. Wasserstrahlvak. eingedampft. An einer Kieselgelsäule (2 × 40 cm, linearer Gradient aus je 1.5 Liter Chloroform und Chloroform/Methanol 98:2) werden nacheinander **4b** und vollständig deacyliertes **2** erhalten. Die erste große Fraktion wird eingedampft und aus Äthanol umkristallisiert. Ausb. 123 mg (70%). Schmp. 206°C. R_F 0.78.

NMR (CDCl₃ + CD₃OD): δ = 4.23 ppm (2H, s, ClAc), 4.33 (2H, d, 5'-H₂), 4.2–4.7 (4H, Ribose), 5.93 (1H, d, 1'-H).

C₃₂H₃₆ClN₇O₈ (681.5) Ber. C 56.35 H 5.28 Cl 5.21 N 14.38 OCH₃ 4.55

Gef. C 56.24 H 5.49 Cl 5.49 N 14.40 OCH₃ 4.66

N-Benzoyloxycarbonyl-2'-O-chloracetylpuromycin (4d): 200 mg **2** werden durch Kodestillation mit Pyridin getrocknet, in Pyridin gelöst, bei Raumtemp. mit 2 Äquiv. Chloressigsäureanhydrid (120 mg) versetzt und gerührt. Nach 1 h wird etwas Wasser zugegeben, die Reaktionslösung zur Trockne eingedampft, in etwas Chloroform gelöst und an einer Kieselgelsäule (2 × 40 cm, linearer Gradient aus je 1.5 Liter Chloroform und Chloroform/Methanol 98:2) chromatographiert. Nacheinander werden vier Fraktionen aufgefangen: **2** (30%) R_F 0.66; **3b** (20%) R_F 0.83; **4b** (10%) R_F 0.78; **4d** (35%) R_F 0.71.

NMR (CDCl₃) von **4d**: δ = 3.77 ppm (2H, d, 5'-H₂), 4.07 (2H, ClAc), 4.07 (2H, ClAc), 4.0–4.5 (2H, 3'- + 4'-H), 5.37 (1H, 2'-H), 5.90 (1H, 1'-H).

5'-O-Chloracetylpuromycin (5b): 50 mg **4b** in 5 ml Eisessig werden mit Palladium auf Aktivkohle (30 mg) 2 h bei Raumtemp. in einer Schüttelapparatur katalytisch hydriert. Nach Abfiltrieren des Katalysators wird zur Entfernung der Essigsäure mehrmals mit Wasser am Rotationsverdampfer abgedampft. Durch Umkristallisieren aus Isopropylalkohol erhält man 33 mg (85%) farblose Kristalle. Schmp. 146°C. R_F 0.30. λ_{\max} 275 nm (CH₃OH).

NMR (CD₃OD + CDCl₃): δ = 2.93 ppm (2H, d, β -CH₂), 3.54 (6H, s, N(CH₃)₂), 3.80 (3H, s, OCH₃), 4.1–4.6 (5H, Ribose), 6.00 (1H, s, 1'-H), 7.00 (4H, q, Phe), 8.13 (1H, s, 2-H), 8.25 (1H, s, 8-H).

C₂₄H₃₀ClN₇O₆ (547.5) Ber. C 52.60 H 5.48 Cl 6.48 Gef. C 52.05 H 5.76 Cl 7.34

N,2'-O-Diacetyl-5'-O-chloracetylpuromycin (6b): 30 mg **5b** werden in 5 ml Acetanhydrid bei Raumtemp. gelöst und 2 Tropfen *N*-Äthyl-diisopropylamin dazugegeben und gerührt. Nach 30 min wird die Reaktionslösung bei 2 Torr eingedampft. Im Dünnschichtchromatogramm läuft außer Spuren eines Nebenproduktes (R_F 0.44) bei R_F 0.52 **6b**, das man leicht durch Umkristallisieren aus Äthanol zu farblosen, feinen Nadeln reinigen kann. Ausb. 33 mg (95%). Schmp. 177°C.

NMR (CDCl₃ + CD₃OD): δ = 2.00 ppm (3H, s, N-Ac), 2.20 (3H, s, O-Ac), 4.20 (2H, s, O-ClAc). – MS: M⁺: m/e = 631/633 (Intensitäten: 100/39.6); M⁺ + 1: m/e = 632/634 (Intensitäten: 33.92/12.13); M⁺ – Cl: m/e = 596; Basis-Peak: m/e = 121 (⁺CH₂C₆H₄OCH₃),

C₂₈H₃₄ClN₇O₈ (631.5) Ber. C 53.21 H 5.38 Cl 5.62 N 15.52
Gef. C 53.30 H 5.53 Cl 4.81 N 15.27

Bromessigsäureanhydrid (7): 2.78 g Bromessigsäure (20 mmol) in 20 ml Äthylacetat werden mit 2.27 g Dicyclohexylcarbodiimid (11 mmol) unter Rühren bei Raumtemp. versetzt, wobei sofort Dicyclohexylharnstoff ausfällt. Nach 1 h wird abfiltriert, die Lösung auf 5 ml eingengt und erneut abfiltriert. Beim völligen Eindampfen der Lösung bilden sich farblose Kristalle, die an feuchter Luft zerfließen. NMR (CDCl₃): δ = 4.08 ppm (4H, s).

N-Benzoyloxycarbonyl-5'-O-bromacetylpuromycin (4c): 257 mg (0.45 mmol) 2 werden in 20 ml trockenem Dimethylformamid (DMF) gelöst, zu einer Lösung von 130 mg 7 (0.5 mmol) in 20 ml DMF gegeben und 90 min bei Raumtemp. gerührt. Danach wird bei 2 Torr eingedampft, das Reaktionsgemisch in Chloroform gelöst und auf 3 präparativen Kieselgelplatten mit Chloroform/Methanol (95:5) gereinigt. Nach dem Eindampfen der Lösungsmittel erhält man 102 mg (33%) farblose Kristalle. Schmp. 175°C. R_F 0.78.

NMR (CDCl₃ + CD₃OD): δ = 4.05 ppm (2H, s, BrAc), 5.15 (2H, s, Z).

C₃₂H₃₆BrN₇O₈ (726.6) Ber. C 52.90 H 4.99 Br 11.00 N 13.49
Gef. C 52.81 H 4.99 Br 11.00 N 13.30

N-tert-Butyloxycarbonylpuromycin (8): 500 mg Puromycindihydrochlorid (0.92 mmol) werden in 30 ml absol. DMF gelöst. Bei Zugabe von 225 μ l Triäthylamin (1.84 mmol) fällt ein feiner Niederschlag aus. Zu dieser Suspension werden 143 mg (1 mmol) *tert*-Butyloxycarbonylazid getropft und bei Raumtemp. gerührt. Nach 18 h werden nochmals 225 μ l Triäthylamin und 143 mg Boc-Azid zugegeben und weitere 20 h gerührt. Die Lösung wird bei 2 Torr und Raumtemp. eingedampft, das Produkt in Chloroform gelöst, auf zwei präparativen Kieselgelplatten mit Chloroform/Methanol (9:1) vom Ausgangsstoff getrennt und aus Wasser/Äthanol umkristallisiert. Ausb. 460 mg (87.5%). Schmp. 204–205°C. R_F 0.66.

NMR (CDCl₃ + CD₃OD): δ = 1.44 ppm (9H, s, C(CH₃)₃), 3.58 (6H, s, N(CH₃)₂), 3.85 (3H, s, OCH₃).

C₂₇H₃₇N₇O₇ (571.6) Ber. C 56.73 H 6.51 N 17.15 Gef. C 55.70 H 6.32 N 16.95

5'-O-Bromacetyl-N-tert-butyloxycarbonylpuromycin (9): 228 mg 8 (0.40 mmol) werden durch Kodestillation mit absol. Pyridin getrocknet, in 20 ml absol. DMF gelöst und zu 150 mg 7 (0.60 mmol) gegeben. Nach Zugabe von 2 Tropfen *N*-Äthyl-diisopropylamin wird 2 h bei Raumtemp. gerührt und danach eingedampft. Auf drei präparativen Kieselgelplatten werden mit Chloroform/Äthanol (40:1) als Laufmittel zwei große Zonen getrennt: 50% nicht umgesetztes 8 und 25% Produkt 9, das isoliert, eingedampft und aus Benzol/Methanol zu 70 mg (25%) farblosen Nadeln umkristallisiert wird. Schmp. 148°C. R_F 0.78. λ_{\max} 275 nm (CH₃OH). – NMR (CDCl₃): δ = 3.99 ppm (2H, s, BrAc).

C₂₉H₃₈BrN₇O₈ (692.6) Ber. C 50.29 H 5.53 Br 11.54 N 14.16
Gef. C 50.77 H 5.64 Br 10.88 N 14.13

5'-O-Bromacetylpuromycin (10): 50 mg 9 werden mit 5 ml 100proz. Trifluoressigsäure versetzt und die Lösung sofort i. Vak. eingedampft. Anschließend wird noch mehrmals mit Acetonitril abgedampft. Im DC läuft nur eine Substanz, die eine positive Ninhydrinreaktion ergibt. Das Produkt 10 wird auf einer präparativen Kieselgelplatte mit Chloroform/Methanol (9:1) als Laufmittel gereinigt und eingedampft. Ausb. 33 mg (77%). R_F 0.31. λ_{\max} 275 nm (CH₃OH).

C₂₄H₃₀BrN₇O₆ (592.5) Ber. C 48.65 H 5.10 Br 13.48 N 16.55
Gef. C 47.71 H 5.48 Br 13.10 N 16.35

5'-O-Acetoxyacetyl-N,2'-O-diacetylpuromycin (11): 33 mg 10 werden in 20 ml Acetanhydrid und 2 Tropfen N-Äthyl-diisopropylamin gelöst und 3 h bei Raumtemp. gerührt. Die rotbraune Lösung wird durch Kodestillation mit Wasser von Essigsäure befreit, zur Trockne eingedampft, in Chloroform gelöst und auf einer präparativen Kieselgelplatte mit Chloroform/Äthanol (99 : 1) gereinigt. Die am weitesten laufende Zone wird aufgearbeitet und aus Äthanol umkristallisiert. Die farblosen Kristalle enthalten geringe Mengen des Hydrobromids. Schmp. 108°C. R_F 0.52.

NMR (CDCl₃): δ = 1.97 ppm (3H, s, N-Ac), 2.14 (3H, s, O-Ac), 2.17 (3H, s, O-Ac), 4.60 (2H, s, CO₂CH₂CO₂). — MS: M^+ : m/e = 655; Basis-Peak: m/e = 121 (⁺CH₂C₆H₄OCH₃).

C₃₀H₃₇N₇O₁₀ (655.7) Ber. C 54.95 H 5.68 Gef. C 53.89 H 5.52

[86/75]