

Synthese von 5-Azido-3-nitro- ω -brom-acetophenon — einem photoaktivierbaren bifunktionellen Reagenz zur Vernetzung von Biopolymeren

Synthesis of 5-Azido-3-nitro- ω -bromo-acetophenone — a Photochemically Active Bifunctional Reagent for the Cross-Linking of Biopolymers

Frank Seela

Universität Paderborn—Gesamthochschule, Fachbereich 13 (Organische Chemie), Paderborn und Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen

(Z. Naturforsch. 31 c, 389—392 [1976]; eingegangen am 31. März 1976)

Photoactivatable Bifunctional Reagent, Cross Links, Biopolymers

The photochemically activatable heterobifunctional reagent 5-azido-3-nitro- ω -bromo-acetophenone (**3**) was synthesized by condensation of 3,5-dinitrobenzoyl chloride with diethyl malonate, acid-catalyzed decarboxylation of the formed malonester derivative **1** to 3,5-dinitro-acetophenone (**2a**), selective reduction of one nitro group in **2a** to 5-amino-3-nitro-acetophenone (**2b**) and diazotization to **2c**. Nucleophilic displacement of the diazonium group in **2c** by sodium azide forms 5-azido-3-nitro-acetophenone (**2d**) which gives **3** after bromination. Compound **3** is photochemically labile and forms an highly reactive nitrene during ultraviolet irradiation. Since compound **3** is able to alkylate amino- or mercapto-groups of amino acids or nucleosides via its bromoacetyl residue, the bifunctional reagent **3** should cross link proteins or nucleic acids after nitrene generation.

Bifunktionell reaktive Moleküle werden zur Vernetzung von Biopolymeren benutzt^{1,2}. Die Vernetzung kann bei Polymeren sowohl der Stabilisierung der Tertiärstruktur dienen, als auch bei aggregierten Molekülverbänden zur Aufklärung der Nachbarschaftsverhältnisse innerhalb der Quartärstruktur benutzt werden. Die intramolekulare Stabilisierung der Tertiärstruktur kann so Enzyme vor vorzeitiger Denaturierung bewahren und sie damit thermostabiler machen; ein Prozeß, der im Hinblick auf die biotechnologische Anwendung dieser Moleküle von außerordentlicher Bedeutung ist³. Die intermolekulare vernetzende Wirkung bifunktioneller Reagenzien gestattet auch einzelne Moleküle, die Bestandteile hochaggregierter Systeme sind, wie z. B. ribosomale Proteine, im nativen Zustand zu verknüpfen⁴ und nach Isolierung der verknüpften Moleküle die Geometrie des Molekülverbandes festzulegen.

Die meisten bisher benutzten bifunktionellen Reagenzien, wie Glutardialdehyd, 1,5-Difluor-2,4-dinitrobenzol⁵, Toluol-2,4-diisocyanat⁶ oder Azophenyldimaleinimid⁷ sind homobifunktionell, d. h. sie besitzen zwei funktionelle Gruppen vergleichbarer Reaktivität und somit auch vergleichbarer Spezifität. Reagiert ein derartiges homobifunktionelles Reagenz

mit reaktiven Gruppen am Biopolymer intra- oder intermolekular ab, so setzt das voraus, daß diese Gruppen eben den Abstand besitzen müssen, der durch das bifunktionelle Reagenz überbrückt werden kann. Ist das nicht der Fall, so reagiert das Reagenz nur monofunktionell oder es verändert die ursprüngliche Struktur des Makromoleküls, indem es mit einer weiter entfernten Gruppe abreagiert.

Mit heterobifunktionellen Reagenzien lassen sich diese Nachteile überwinden, speziell dann, wenn eine der funktionellen Gruppen eine sehr hohe Reaktivität und damit eine geringe Spezifität besitzt, was ihre Bildung *in situ* voraussetzt.

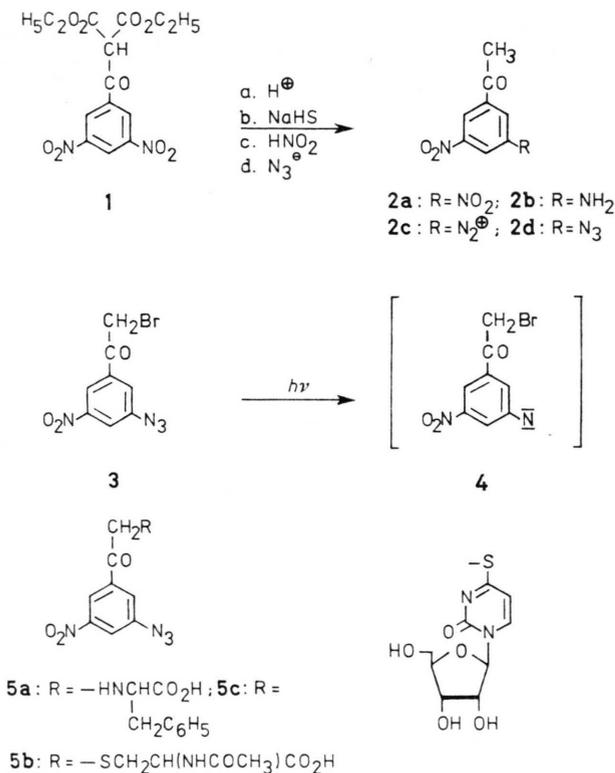
Derartige Voraussetzungen besitzen heterobifunktionelle Reagenzien mit einer Azidogruppe. Azidogruppen sind bei 37 °C und einem weiten pH-Bereich stabil, sie lassen sich jedoch durch UV-Licht zu reaktiven Nitrenen umwandeln, die in weniger als 10⁻⁴ sec mit Nachbarmolekülen abreagieren⁸. Besitzt ein bifunktionelles Reagenz neben der Azidogruppe einen weiteren reaktiven Substituenten, so kann dieser zuerst mit funktionellen Gruppen eines Biopolymers abreagieren, um dann nach Photoaktivierung des Reaktionsproduktes das Polymer zu vernetzen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Synthese von 5-Azido-3-nitro- ω -brom-acetophenon (**3**) sowie dessen photochemische und alkylierende Eigenschaften beschrieben.

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Frank Seela, Universität Paderborn—Gesamthochschule, Fachbereich 13 (Organische Chemie), Pohlweg 55, D-4790 Paderborn.

Synthese von 5-Azido-3-nitro- ω -brom-acetophenon (**3**) sowie dessen photolytische und alkylierende Eigenschaften

Wird 3,5-Dinitro-benzoylchlorid mit Magnesium-Malonsäure-diäthylester umgesetzt, so wird das Malonester-Derivat **1** erhalten, das bei saurer Hydrolyse decarboxyliert, wobei 3,5-Dinitro-acetophenon (**2a**) entsteht. Zur selektiven Reduktion einer Nitrogruppe in **2a** wurde zuerst Zinn-II-chlorid benutzt⁹. Da die Reaktion unbefriedigende Ausbeuten lieferte, wurde mit Natriumhydrogensulfid in wässrigem Methanol reduziert. In über 50-prozentiger Ausbeute konnte 5-Amino-3-nitro-acetophenon (**2b**) isoliert werden. Diazotiert man **2b** in wässriger Lösung und setzt das Diazoniumsalz **2c** unter Lichtausschluß mit Natriumazid um, so entsteht in 90-prozentiger Ausbeute 5-Azido-3-nitro-acetophenon (**2d**). Durch radikalische Bromierung von **2d** bei Tageslicht mit der äquimolaren Menge Brom bildet sich 5-Azido-3-nitro- ω -brom-acetophenon (**3**), das durch Chromatographie an Kieselgel gereinigt, kristallin erhalten wurde.



Die radikalische Bromierung von **2d** bei Tageslicht führt zu keinem merkbar photochemischen

Abbau der Verbindung. Bestrahlt man **3** hingegen in Intervallen von 5 sec mit UV-Licht, so wird es augenblicklich photolytisch, was die Veränderung des UV-Spektrums anzeigt (Abb. 1). Die Photolyse

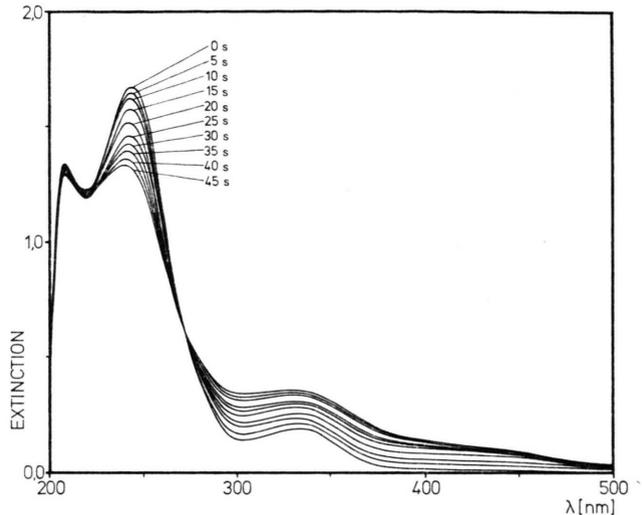


Abb. 1. Photolyse von 5-Azido-3-nitro- ω -brom-acetophenon (**3**) in Methanol in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer; Schichtdicke 1 cm; 2 Sylvania UV-Lampen; Abstand 10 cm.

von **3** führt zu UV-Absorptionskurven mit einem isobestischen Punkt bei 274 nm. Das weist darauf hin, daß bei der Photolyse von **3** im wesentlichen nur ein Photoprodukt entsteht. Die zur Azidogruppe meta-ständige mesomeriefähige Nitrogruppe in **3** erleichtert die photochemische Anregung des Moleküls gegenüber aromatischen Aziden ohne Nitrosubstituenten¹⁰. Das langwellige Absorptionsmaximum von **3**, das bei 333 nm liegt, ermöglicht die Photolyse zum Nitren **4** auch weit außerhalb der Absorptionsmaxima von Proteinen (um 280 nm) und Nucleinsäuren (um 260 nm). Durch geeignete Filter läßt sich außerdem der UV-Anteil unterhalb 330 nm ausblenden, was gewährleistet, daß ein mit **3** alkyliertes Biopolymer nur vernetzt, jedoch nicht photochemisch denaturiert wird.

Die unterschiedliche Reaktivität des Brom- bzw. Azidosubstituenten im heterobifunktionellen Reagenz **3** wurde in Modellreaktionen durch Umsetzen von Mercapto- bzw. Aminogruppen von Thionucleosiden oder Aminosäuren untersucht. Zu diesem Zweck wurden äquimolare Mengen von **3** mit L-Phenylalanin, N-Acetyl-L-cystein, oder 4-Thiouridin bei pH 10,0 (37 °C) 2 h aufbewahrt und die Reaktionsansätze

Tab. I. Vergleich der chromatographischen und elektrophoretischen Mobilitäten von N-Acetyl-L-cystein, L-Phenylalanin und 4-Thiouridin mit den Alkylierungsprodukten **5a–c**.

	Elektrophoretische Mobilitäten (Cellulose, Woelm; 0,1 M Citratpuffer, pH 6,5)	R _F -Werte (Kieselgel, Woelm; Äthanol/Wasser, 1:1)
3	−0,5 *	0,3 *
5b	+0,6 *	0,9 *
N-Acetyl-L-Cystein	—	0,9
L-Phenylalanin	−0,1	—
5a	+0,5 *	—
4-Thiouridin	−1,2	—
5c	0,0 *	—

* Nach UV-Bestrahlung gelb.

analytisch aufgetrennt. Dünnschichtelektrophoretisch bzw. dünnschichtchromatographisch wandern die durch **3** alkylierten Substanzen **5a**, **5b** und **5c** deutlich anders als ihre Ausgangsprodukte. Die Alkylierungsprodukte **5a–c** lassen sich auch im Gegensatz zu L-Phenylalanin, N-Acetyl-L-cystein oder 4-Thiouridin durch UV-Bestrahlung in gelbe Photolyseprodukte umwandeln, was anzeigt, daß die phenacylierten Reaktionsprodukte photochemisch aktivierbar sind.

Da die Alkylierung von Nucleinsäuren oder Proteinen mit freien Mercapto- bzw. Aminogruppen durch **3** prinzipiell nach der bei den Monomeren nachgewiesenen Reaktionsfolge ablaufen sollte und eine Aktivierung des Azidosubstituenten um 330 nm, also außerhalb der UV-Absorption der o. g. Biopolymeren erfolgen kann, sollte das durch UV-Bestrahlung generierte Nitren unter Einschub in CH-Einfachbindungen, Addition an CC-Doppelbindungen oder Reaktion mit einsamen Elektronenpaaren zur Vernetzung derartiger Polymere führen.

Frl. Sabine Rannenbergr wird für geschickte Mitarbeit bei den Experimenten gedankt.

Die Arbeit wurde durch Forschungsmittel des Landes Nordrhein-Westfalen unterstützt.

Experimentelles

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Monoskop der Fa. Reichert, Österreich, bestimmt und sind nicht korrigiert. Elementaranalysen: Mikroanalytisches Labor Beller, Göttingen. ¹H-NMR-Spektren: Bruker HX 60-Spektrometer (Tetramethylsilan als innerer Standard). UV-Spektren: Zeiss PMQ II bzw. Shimadzu RV-200-Spektrometer. Analytische Dünnschichtchromatographie wurde an Kieselgeldünnschichtplatten 60 (Fa. Merck, Darmstadt), präpara-

tive Säulenchromatographie an Kieselgel 60 (Fa. Merck, Darmstadt) ausgeführt. Wegen der Lichtempfindlichkeit der Azidverbindungen erfolgte der Nachweis der eluierten Substanzen bei der säulenchromatographischen Trennung von **3** dünnschichtchromatographisch (Kieselgel, Chloroform/Äthanol; 97:3).

3.5-Dinitro-benzoyl-malonsäure-diäthylester (**1**):

In einem 1000 ml Dreihalskolben mit KPG-Rührer, Rückflußkühler und Tropftrichter werden 7,2 g (300 mmol) Mg-Späne eingetragen und mit 24 ml absol. Äthanol und 1,0 ml absol. CCl₄ versetzt. Nach Anspringen der Reaktion werden 48 g (300 mmol) Malonsäurediäthylester in 60 ml absol. Äthanol und 240 ml Äther so schnell eingetropft, daß das Reaktionsgemisch ständig unter Rückfluß kocht. Nach dem Auflösen der Mg-Späne und Zusatz von 300 ml Äther werden in die Lösung 69,15 g (300 mmol) 3.5-Dinitrobenzoylchlorid eingetragen und 1 h unter Rühren Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen versetzt man mit 15 ml konz. H₂SO₄ in 240 ml Eiswasser, wobei ausgefallene Substanz in Lösung geht. Die saure Lösung wird ausgeäthert, die Ätherphase mit Wasser gewaschen, filtriert, getrocknet und abgedampft. 102 g (96%) kristalliner Feststoff, der zur Bestimmung der analytischen Daten aus Äthanol umkristallisiert wird. Farblose Nadeln vom Schmelzpunkt 61–62 °C.

C₁₄H₁₄N₂O₉ (354,28)

Ber. C 47,46 H 3,98 N 7,91;

Gef. C 47,63 H 4,06 N 7,82.

3.5-Dinitro-acetophenon (**2a**):

102 g des Rohproduktes **1** werden in einer Mischung von 60 ml Wasser/80 ml Eisessig und 18 ml konz. Schwefelsäure 8 h unter Rückfluß gekocht. Man neutralisiert mit NaHCO₃, extrahiert mehrfach mit Chloroform und dampft ab. Umkristallisation aus Äthanol liefert 35,0 g (60,5%) farblose Plättchen vom Schmelzpunkt 78–80 °C. Erneutes Umkristallisieren aus Äthylacetat/Petroläther ergibt farblose Kristalle vom Schmelzpunkt 80–81 °C (Lit.:⁹ 80–81 °C).

UV (Methanol): λ_{\max} 219 ($\epsilon = 24400$),NMR ([D₆]DMSO): 2,78 (s, 2H), 8,95 (m, 3H).

5-Amino-3-nitro-acetophenon (**2b**):

3,74 g (20 mmol) 3.5-Dinitro-acetophenon, gelöst in 80 ml Methanol, werden mit 35 ml NaHS-Lösung (35 mg NaHS/ml) versetzt und 25 min bei 75 °C

auf dem Ölbad unter Rückfluß gekocht. Man engt am Rotationsverdampfer auf 1/4 des Volumens ein, versetzt mit 200 ml Eiswasser und alkalisiert mit 1 N NaOH auf pH 11–12. Ausgefällene Substanz wird auf einem Blaubandfilter abgesaugt und in 20 ml Methanol gelöst. Nach Zusatz von 400 ml Äther wird mehrfach mit 200 ml Wasser gegengeschüttelt, die organische Phase filtriert und abgedampft (1,7 g). Aus der wässrigen Phase gewinnt man nach Alkalisieren mit 1 N NaOH erneut zweimaligen Ausschütteln mit je 100 ml Äther/5 ml Methanol und Filtrieren der organischen Phase nach Abdampfen weitere 240 mg. Die vereinigten Abdampfrückstände werden aus 500 ml Wasser umkristallisiert. 1,65 g (51,6%) gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 157–158 °C.

DC (Kieselgel, Chloroform/Äthanol, 95:5): $R_F = 0,45$.

NMR ($[D_6]$ DMSO): 2,58 (s, 3H); 7,55 (m, 2H); 7,65 (m, 1H) NH_2 6,06 (s, breit).

UV (Methanol): λ_{max} 382, 219 ($\epsilon = 2100, 24900$).

$C_8H_8N_2O_3$ (180,17)

Ber. C 53,33 H 4,48 N 15,55;
Gef. C 53,44 H 4,59 N 15,65.

5-Acido-3-nitro-acetophenon (2d):

1,35 g (7,5 mmol) 3-Amino-5-nitro-acetophenon (2b) werden in 45 ml 0,5 N Salzsäure suspendiert und auf 0–5 °C gekühlt. In die Suspension tropft man unter Lichtausschluß eine eiskalte Lösung von 540 mg (7,8 mmol) $NaNO_2$ in 4,5 ml Eiswasser und rührt 45 min. Wenig ungelöstes Material wird abfiltriert und das Filtrat bei 0 °C unter Rühren mit 509 mg (7,8 mmol) NaN_3 in 6 ml Eiswasser tropfenweise versetzt, wobei sich Stickstoff entwickelt und ein blaßrosa Niederschlag ausfällt. Man hält 1 h bei 0–5 °C, filtriert ab, wäscht mit Wasser und trocknet über KOH. 1,39 g (89,9%) blaßrosa Kristalle vom Schmelzpunkt 79 °C.

DC (Kieselgel, $CHCl_3$): $R_F = 0,3$.

NMR ($[D_6]$ DMSO): 2,68 (s, 3H); 8,0 (m, 2H); 8,3 (m, 1H).

UV (Methanol): λ_{max} 332, 233 ($\epsilon = 1700, 22100$).

$C_8H_6N_4O_3$ (206,17)

Ber. C 46,61 H 2,93 N 27,18;
Gef. C 46,96 H 3,07 N 27,25.

5-Azido-3-nitro- ω -brom-acetophenon (3):

412 mg (2 mmol) 3-Azido-5-nitro-acetophenon und 2 mg $AlCl_3$ in 2 ml Chloroform werden auf 15 °C gekühlt und unter Rühren mit 36 mg (110 μ l, 2,1 mmol) Brom versetzt. Nach Zugabe von 1 ml Äther bewahrt man 80 min bei 15 °C auf, wobei sich die Lösung entfärbt. Man wäscht die organische Phase mit Wasser säurefrei und dampft ab. Der Rückstand wird an einer 3 \times 30 cm Säule (Kieselgel 60, Chloroform) chromatographiert. Nach Abtrennen der Hauptzone und Abdampfen erhält man 339 ml (59,9%) farblose Nadeln (Äthanol) vom Schmelzpunkt 68–69 °C.

DC (Chloroform, Kieselgel): **3** wandert wenig langsamer als **2d**.

NMR ($[D_6]$ DMSO): 5,08 (s, 2H); um 8,1 (m, 2H); um 8,4 (m, 1H).

UV (Methanol): λ_{max} 333, 245 ($\epsilon = 2300, 23300$).

$C_8H_5N_4O_3Br$ (285,06)

Ber. C 33,71 H 1,77 N 19,66 Br 28,03;
Gef. C 33,95 H 1,81 N 19,76 Br 28,11.

Alkylierung von N-Acetyl-cystein, L-Phenylalanin und 4-Thiouridin mit (3):

10 mg **3** werden in 5 ml Dioxan gelöst. Je 10 μ mol (1,43 ml) dieser Lösung pipettiert man in 3 Schliffgläser.

Die Lösungen versetzt man:

1. mit 1,65 ml (10 μ mol) einer Stammlösung von L-Phenylalanin (10 mg L-Phe/10 ml Boratpuffer pH 10);
2. mit 1,63 ml (10 μ mol) einer Stammlösung von N-Acetyl-cystein (10 mg N-Acetyl-cystein/10 ml Boratpuffer pH 10) und
3. mit 1,25 ml (10 μ mol) einer Stammlösung von 4-Thiouridin (10 mg/5 ml Boratpuffer pH 10).

Die drei Proben werden 2 h bei 37 °C aufbewahrt und dünnschichtchromatographisch bzw. elektrophoretisch aufgetrennt (Tabelle I).

¹ F. Wold, Methods of Enzymol. **11**, 617 [1967].

² H. Fasold, J. Klappenberger, C. Mayer u. H. Remold, Angew. Chem. **83**, 875 [1971].

³ K. J. Skinner, Chemical and Engineering News **53**, 22 [1975].

⁴ R. R. Traut, R. L. Heimark, T-T. Sun, J. W. B. Hershey u. A. Bollen, Ribosomes (M. Nomura, A. Tissieres u. P. Lengyel, eds.), S. 277, Cold Spring Harbor Laboratory 1974.

⁵ H. Zahn u. H. Steuerle, Biochem. Z. **331**, 29 [1959].

⁶ A. F. Schick u. S. J. Singer, J. Biol. Chem. **236**, 2477 [1961].

⁷ H. Fasold, U. Gröschel-Stewart u. F. Turba, Biochem. Z. **337**, 425 [1963].

⁸ J. R. Knowles, Accounts Chem. Res. **5**, 155 [1972].

⁹ I. B. Brasnow, Z. obšč. Chim. **32**, 293 [1962].

¹⁰ S. H. Hixson u. S. S. Hixson, Biochemistry **14**, 4251 [1975].