

Aminonucleoside, X¹⁾

Über die Synthese von 3'-Amino-3'-desoxyguanosin, 3'-Amino-3'-desoxyguanosin-5'-monophosphat und seinem 3',5'-Cyclophosphat

Michael Morr

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH,
Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig

Eingegangen am 28. September 1981

3'-Amino-3'-desoxyadenosin (**1**) wird nach Trifluoracetylierung sowie Acetylierung und Acetolyse zu 1,2,5-Tri-*O*-acetyl-3-trifluoroacetamido- β -D-ribofuranose (**4b**) gespalten. **4b** reagiert mit *N*²-Acetylguanin in Acetonitril bei Gegenwart von Hexamethyldisilazan, Trimethylchlorsilan und Kalium-perfluorbutansulfonat in ca. 60proz. Ausbeute zu 3'-Amino-3'-desoxyguanosin (**6**) aus ca. 25% α - und 75% β -Anomerem. – Nach Einführung der *tert*-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe in **6b**, anschließender Phosphorylierung nach *Yoshikawa*, Hydrolyse und Abspaltung der 3'-*N*-Boc-Schutzgruppe erhält man in guten Ausbeuten das 3'-Amino-3'-desoxyguanosin-5'-monophosphat (**8**). Cyclisierung von **8** mit wasserlöslichem Carbodiimid (EDC) bei pH 7.7 und 40 °C führt zu 90% des Cyclophosphats **9**. Die Strukturen der neu synthetisierten Verbindungen werden durch ¹H-, ¹³C- und ³¹P-NMR-Spektren abgesichert.

Aminonucleosides, X¹⁾. – Synthesis of 3'-Amino-3'-deoxyguanosine, 3'-Amino-3'-deoxyguanosine 5'-Monophosphate, and its 3',5'-Cyclophosphate

Trifluoroacetylation and acetylation of 3'-amino-3'-deoxyadenosine (**1**) followed by acetolysis gives 1,2,5-tri-*O*-acetyl-3-trifluoroacetamido- β -D-ribofuranose (**4b**) which reacts with *N*²-acetylguanine in acetonitrile in the presence of hexamethyldisilazane, trimethylchlorosilane, and potassium perfluorobutanesulfonate to give 3'-amino-3'-deoxyguanosine (**6**) in an overall yield of 60%. Compound **6** contains 25% α -anomer and 75% β -anomer. – By introduction of the *tert*-butyloxycarbonyl protective group into **6b** followed by phosphorylation according to *Yoshikawa* and hydrolysis in order to remove the 3'-*N*-Boc protective group 3'-amino-3'-deoxyguanosine 5'-monophosphate (**8**) could be obtained in good yield. Cyclization of **8** with water-soluble carbodiimide (EDC) at pH 7.7 and 40 °C gives the cyclophosphate **9** in 90% yield. The structures of the new compounds are derived mainly from their ¹H-, ¹³C-, and ³¹P-NMR spectra.

Nucleotide des Guanins sind wichtige Substrate oder Aktivatoren für zahlreiche Reaktionen des zellulären Metabolismus, wie z. B. für DNA-, RNA- oder Proteinbiosynthese²⁾.

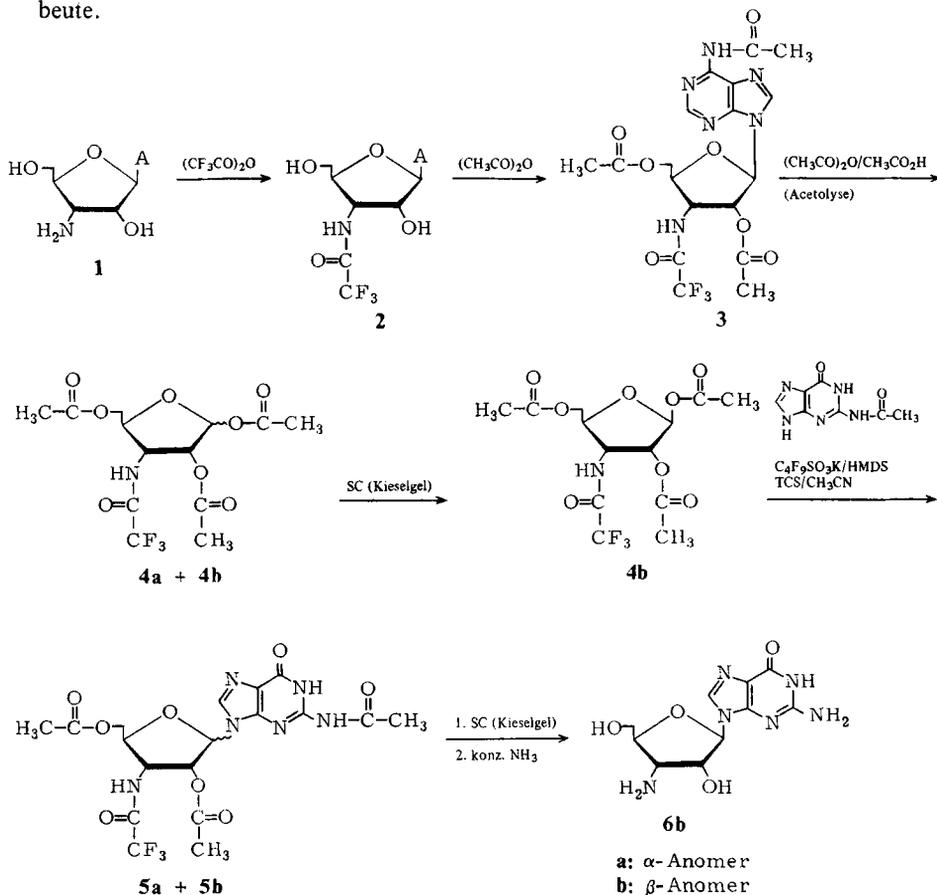
Das kürzlich in der Natur aufgefundene 2'-Aminoguanosin³⁾, Arabinoguanosin⁴⁾ sowie α - und β -2'-Desoxythioguanosin⁵⁾ sind Guanosinderivate mit Antitumor- und/oder antiviralen Eigenschaften. *Mengel* et al. haben Nucleosidtransformationen am Ribofuranose-Teil des Guanosins durchgeführt und vermeiden somit die bei den üblichen

Syntheseverfahren der Zucker-Base-Verknüpfung zum Teil schwierige Auftrennung der entstandenen positionsisomeren α,β -Gemische⁶⁾. Über 5'-Amino-5'-desoxyguanosin und seine 5'-*N*-substituierten Derivate berichteten *Schattka* et al.⁷⁾.

Kissman et al. beschrieben 1962 die Synthese des 3'-Amino-3'-desoxyguanosins⁸⁾. Durch Kondensation von Chloromercuri-2,6-diacetamidopurin mit geschützter 1-Chlor-3-aminoribofuranose erhielten sie in etwa 60proz. Ausbeute das geschützte Nucleosid, das nach Abspaltung der Schutzgruppen in 44proz. Ausbeute das 2-Amino-6-hydroxy-9-(3-amino-3-desoxy- β -D-ribofuranosyl)purin (**6b**) lieferte. Das α -Isomere wurde bei dieser Synthese nicht beobachtet.

Wir verwendeten für unsere Synthese als Zucker nicht wie üblich Ribosederivate, die sich von der D-Xylose ableiten und welche u. a. von *Lichtenthaler* et al.⁹⁾, *Azhayev* et al.^{10,11)} und *Verkade* et al.¹²⁾ für die Synthese von Derivaten des 3'-Amino-3'-desoxyadenosins (**1**) angewendet wurden, sondern **1**, das in größeren Mengen durch Fermentation von *Helminthosporium sp. 215* und einfache Aufarbeitung zugänglich ist¹³⁾.

1 dient zur einfachen Synthese des geschützten Zuckerderivates von **4**. Durch Trifluoracetylierung von **1** mit Trifluoracetanhydrid erhält man **2** in quantitativer Ausbeute.



Nach der üblichen Acetylierung von **2** mit Acetanhydrid in Pyridin wurde das entstehende peracetylierte Derivat **3** einer Acetolyse¹⁴⁾ in Acetanhydrid/Essigsäure unterworfen. Neben 6-Acetyladenin erhält man die beiden α - und β -Isomeren (1,2,5-Tri-O-acetyl-3-trifluoracetamido- α -(β -)D-ribofuranose) von **4** etwa in einem Verhältnis von 1:9 (laut ¹³C-NMR-Spektrum, ca. 90% Ausbeute). Eine Trennung der beiden Isomeren ist auf Kieselgel mit Chloroform möglich, wobei das α -Anomere **4a** vor dem β -Anomeren **4b** eluiert wird. **4b** ist Ausgangsmaterial für die eigentliche Synthese von **6** nach *Vorbrüggen*¹⁵⁾. In einem Eintopfverfahren werden **4b** und *N*²-Acetylguanin in trockenem Acetonitril mit Hexamethyldisilazan (HMDS) und Trimethylchlorsilan (TCS) bei Gegenwart von Kalium-perfluorbutansulfonat¹⁶⁾ mehrere Stunden unter Rückfluß gekocht¹⁷⁾. Nach der Aufarbeitung erhielt man **5a** und **b** in etwa 70proz. Ausbeute, allerdings die α - und β -Isomeren in einem Verhältnis von 1:2.5, deren Trennung man durch Säulenchromatographie auf Kieselgel und Elution mit Dichlormethan/Methanol (95:5) erreichte. Dabei wird das α -Anomere vor dem β -Anomeren eluiert. Während der Säulenchromatographie wurde z. T. eine Abspaltung der 2'-O-Acetylgruppe beobachtet, so daß das obige Laufmittel in einem Verhältnis von 8:2 bzw. 6:2 angewendet wurde.

Nach Abspaltung der Schutzgruppen mit wäßriger konzentrierter Ammoniaklösung (24 h, Raumtemperatur) erhielt man die reinen 9-verknüpften α - und β -Anomeren von **6**.

Ein ähnlicher Syntheseweg wurde von *Hobbs et al.*¹⁸⁾ für die Synthese von 2'-Amino-2'-desoxyguanin beschrieben. Durch Spaltung von 2'-Azido-2'-desoxyuridin wurde zunächst 2-Azido-2-desoxyribose isoliert, die nach Überführung in 1,3,5-Tri-O-acetyl-2-azido-2-desoxyribose mit den substituierten Purinbasen Adenin und Guanin umgesetzt wurde. Sowohl beim Adenin als auch beim Guanin erhielten sie die α - und β -Anomeren. Beim Guanin wurden neben den 9-verknüpften Anomeren auch die 7-verknüpften Anomeren gewonnen. Bei der Kondensation in 1,2-Dichloräthan und Zinn(IV)-chlorid war das Anomerenverhältnis N-9 α :N-9 β :N-7 α :N-7 β = 7:51:12:30.

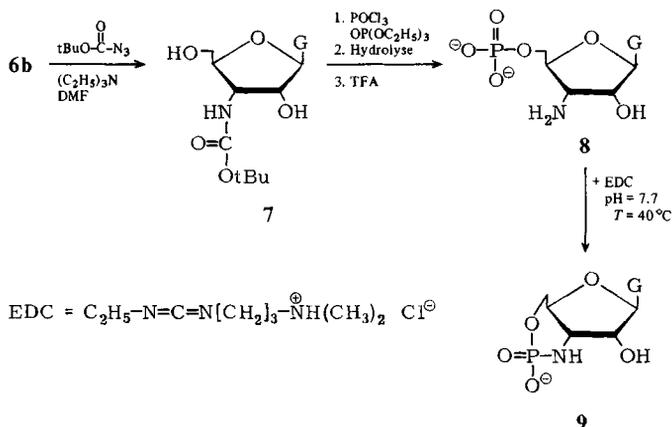
Cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP), ein Struktur analoges zum Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP), kommt in vielen Geweben in ähnlichen Konzentrationen vor wie cAMP. cGMP wird von einer für Guanosintriphosphat hoch spezifischen Guanylat-Cyclase synthetisiert. Das cGMP-Guanylat-Cyclasesystem hat biologische Bedeutung bei der Vermittlung der Wirkung bestimmter Hormone und neurohumoraler Überträgerstoffe wie Acetylcholin, Prostaglandine und Histamin¹⁹⁾.

Der großen Zahl von synthetisierten cAMP-Derivaten steht nur eine relativ kleine Zahl von synthetisierten cGMP-Derivaten gegenüber. In der Hauptsache wurden die cyclischen Nucleotide an der Base modifiziert²⁰⁾. So beschreiben *Miller et al.*²¹⁾ eine Reihe von 8-substituierten cGMP-Derivaten, die gegenüber der cGMP-abhängigen Proteinkinase und Phosphodiesterase untersucht wurden.

In dieser Arbeit wird ein cGMP-Analoges beschrieben, in dem der 3'-Sauerstoff im Cyclophosphatring durch eine NH-Gruppe ersetzt wurde. Dieses Derivat **9** ließ sich unter den gleichen Bedingungen wie das von uns beschriebene 3'-NH-cAMP herstellen²²⁾.

Nach Einführung der *tert*-Butyloxycarbonyl-(Boc-)Schutzgruppe durch Reaktion von **6b** mit Azidoameisensäure-*tert*-butylester in DMF in Gegenwart von Triethylamin erhielt man in quantitativer Ausbeute **7**, das nach Entfernen aller flüchtigen Substanzen genügend rein für die Phosphorylierung nach *Yoshikawa*²³⁾ war. Nach Lösen von **7**

in Phosphorsäure-triethylester (PTE) wurde selektiv die 5'-OH-Gruppe mit Phosphoroxchlorid in guter Ausbeute phosphoryliert. Nach der Hydrolyse bei pH 7 wurde die Lösung lyophilisiert und anschließend die Boc-Schutzgruppe durch 5minütiges Einwirken von wasserfreier Trifluoressigsäure (TFA) entfernt. Nach dem Abdestillieren der Säure und Neutralisieren der wäßrigen Lösung wurde an einer DEAE-Sephadex-Säule (HCO_3^- -Form) chromatographiert und **8** als Triethylammoniumsalz erhalten.



Das Na-Salz von **8** ist wie Guanosin-5'-monophosphat (GMP) eine wohlgeschmeckende Verbindung. Unterhalb von pH 5 bildet **8** ein anisotropes Säure-Gel, so wie es bei GMP beobachtet wurde²⁴). Die anschließende Cyclisierung von **8** zu **9** erfolgte mit einem Überschuß an wasserlöslichem Carbodiimid [1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid, EDC] in wäßriger Lösung bei pH 7.7 und 40°C. Die Ausbeuten für die Cyclisierung lagen bei über 80%. Aus Abb. 1 ist der Reaktionsverlauf für die Cyclisierung von **8** → **9** zu entnehmen.

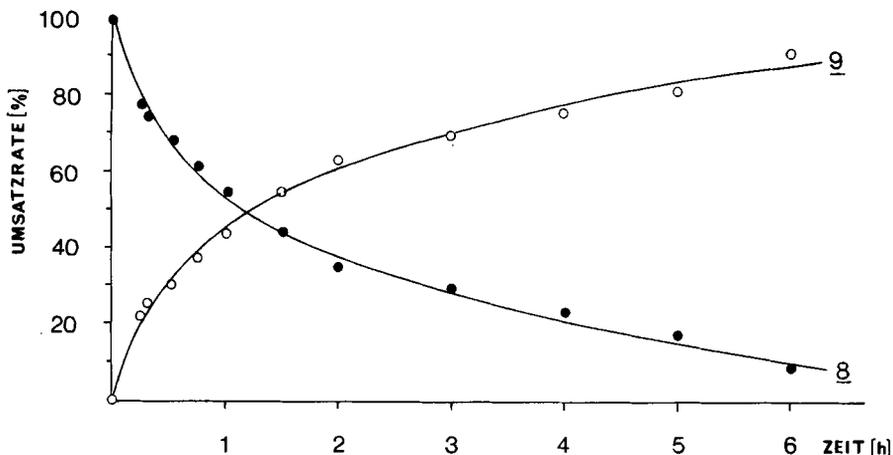


Abb. 1. Zeitlicher Ablauf der Produktbildung bei der Cyclisierung von **8** mit wasserlöslichem Carbodiimid (EDC) bei pH 7.7 und 40°C zum Cyclophosphat **9**

Die Aufarbeitung erfolgte wiederum durch Chromatographie an DEAE-Sephadex. Verbindung **9** ist über viele Stunden bei pH 7 stabil. Nach 5 h bei pH 6 waren etwa 20% von **9** zu **8** gespalten. Die Struktur der neuen Guanosinderivate wurde eindeutig belegt durch ^1H -, ^{31}P - und ^{13}C -Spektren. Im Gegensatz zum $3',5'$ -cGMP ist das 400-MHz- ^1H -Spektrum von **9** gut aufgelöst, so daß alle Riboseprotonen eindeutig zugeordnet werden konnten.

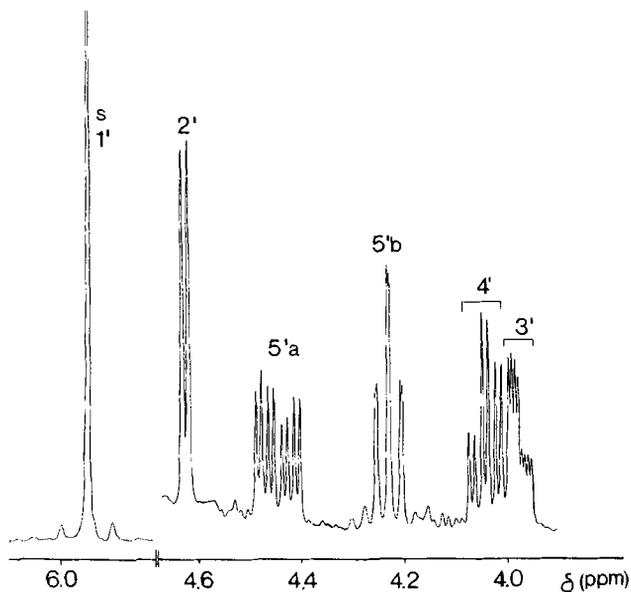


Abb. 2. 400-MHz- ^1H -NMR-Spektrum von **9** in D_2O

In Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen werden die biochemischen Eigenschaften des $3'\text{-NH-cGMP}$ untersucht²⁵⁾.

Frau Priv.-Doz. Dr. *M.-R. Kula* danke ich für das Interesse und die Förderung dieser Arbeit.

Experimenteller Teil

Allgemeine Angaben, Messung der Spektren, DC-Untersuchungen siehe bei Lit.¹³⁾. Das für die Phosphorylierungen verwendete Phosphoroxchlorid wurde vor Gebrauch frisch destilliert. Phosphorsäure-triethylester (PTE) wurde destilliert und über Molekularsieb (4 Å, Merck) aufbewahrt. Die Nucleotidderivate wurden grundsätzlich über eine DEAE-Sephadex-A-25-Säule (HCO_3^- -Form) mit einem Gradienten aus Wasser/Triethylammoniumbicarbonat-(TEAB)-Puffer, pH 7.5, gereinigt. Nach dem Einengen im Rotationsverdampfer wurden die Pufferreste durch mehrmaliges Eindampfen mit Methanol entfernt. Nicht kristallisierbare Verbindungen wurden aus Wasser lyophilisiert. Die C,H,N-Analysen wurden vom Analysenlabor Beller (Göttingen) durchgeführt. Die ^1H -NMR-Spektren wurden bei 100 bzw. 400 MHz mit einem Varian-XL-100- und Bruker-WM-400-Gerät aufgenommen, ^{13}C -NMR-Spektren mit den Geräten Varian XL-100 sowie Bruker WM-400, ^{31}P -NMR-Spektren mit Varian XL-100 (40.5 MHz). Referenzsubstanzen

waren TMS oder Dioxan ($\delta = 67.4$) für die ^{13}C - und TMS oder $(\text{CH}_3)_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ (DSS) für die ^1H -NMR-Spektren bzw. bei Spektren in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ das Signal bei $\delta = 2.5$. Die chemischen Verschiebungen wurden entweder direkt relativ zu diesen Standards gemessen oder relativ zum Lösungsmittelsignal und anschließend auf TMS umgerechnet. ^{31}P -Verschiebungen sind relativ zu externer H_3PO_4 (indirekt über den Spektrometer-Offset bestimmt) angegeben, wobei positive Werte Entschirmung bedeuten. Die Analysen der 400-MHz- ^1H -Spektren wurden durch homonucleare Doppelresonanz abgesichert. – Die quantitative Auswertung der Dünnschichtchromatogramme (Kieselgel, 20×20 cm, Schichtdicke 0.25 mm, Merck) erfolgte mit einem High Speed TLC Scanner CS-920 von Shimadzu.

3'-Trifluoracetamido-3'-desoxyadenosin (2): 1.35 g (5.00 mmol) **1** werden i. Vak. bei 50°C getrocknet und unter Ausschluß von Feuchtigkeit langsam mit 10 ml Trifluoressigsäureanhydrid (≈ 70 mmol) versetzt. Nach einiger Zeit ist alles in Lösung gegangen (Schütteln), und nach 5 h wird im Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird mehrmals mit Methanol aufgenommen und zur Trockne eingeeengt. Die Umsetzung ist nahezu quantitativ. Ausb. ca. 1.8 g (95%). – ^1H -NMR ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$, $\delta = 2.50$): $\delta = 9.5$ (br, NH), 8.40 und 8.16 (je 1 s, 2'- und 8-H), 7.31 (s, NH), 6.00 (d, $J = 4$ Hz, 1'-H), ≈ 6.1 (br, 2'-OH), 5.31 (t, $J = 5.5$ Hz, 5'-OH), 4.5–4.7 (m, 2'-H, 3'-H), 4.30–4.15 (m, 4'-H), 3.84–3.36 (m, 5', 5''-H).

$\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_4$ (362.3) Ber. C 39.79 H 3.62 N 23.20 Gef. C 40.50 H 3.77 N 23.05

1,2,5-Tri-O-acetyl-3-trifluoracetamido- β -D-ribofuranose (4b) und α -Anomeres (4a): 1.7 g (4.7 mmol) **2** werden in 50 ml Pyridin gelöst und mit 50 ml Acetanhydrid versetzt. Nach etwa 20 h ist die Acetylierung vollständig. Nach dem Einengen der braunroten Lösung im Ölpumpenvak. wird noch zweimal mit Toluol aufgenommen und eingeeengt. Ohne Isolierung von **3** wird der Rückstand der Acetolyse unterworfen, in 60 ml Eisessig und 15 ml Acetanhydrid gelöst und auf dem Ölbad unter Rühren auf 100°C erwärmt. Die Spaltung der glycosidischen Bindung wird dünnschichtchromatographisch verfolgt (DC, Kieselgel, Chloroform:Methanol 97.5:2.5 oder reines Chloroform, Anfärbung des Zuckers mit Anisaldehyd/Schwefelsäure²⁶). Nach etwa 12 h wird die Mischung abgekühlt und das ausgefallene *N*-Acetyladenin abfiltriert. Nach dem Einengen zur Trockne im Ölpumpenvak. bei 60°C wird der braune Sirup in 100 ml Chloroform gelöst und durch Filtration von restlichem *N*-Acetyladenin befreit. Die Chloroformlösung wird mit 3 *N* Schwefelsäure, eiskaltem Wasser, eiskalter, wäßriger Natriumhydrogencarbonatlösung (5proz.) und erneut mit eiskaltem Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen mit wasserfreiem Natriumsulfat wird zur Trockne eingeeengt und der Rückstand auf einer Kieselgelsäule (Kieselgel 60, Korngröße 0.040–0.063 mm, Merck, 30×5 cm) mit Chloroform chromatographiert. Neben wenig α -Anomerem **4a** (Anomerenverhältnis aus ^{13}C -Spektrum ist etwa $\alpha : \beta = 1 : 9$), das zuerst eluiert wird, erhält man nach dem Einengen der **4b**-haltigen Fraktion etwa 1.3 g (75%) eines Öles, das im Kühlschrank kristallisiert.

β -Anomeres 4b: Schmp. 106°C ; $[\alpha]_{\text{D}} = +18.65^\circ$ ($c = 1$ in CH_3OH); $R_{\text{F}} = 0.1$ (DC, Kieselgel, CHCl_3). – ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3/TMS): $\delta = 6.57$ (br, d, NH), 6.17 (s, 1-H), 5.18 (d, $J_{1,2} = 5.0$ Hz, 2-H), 4.85 (dt, $J_{3,\text{NH}} \approx J_{3,4} \approx 8.5$ Hz, 3-H), 4.32–4.18 (m, 4-H, 5-H₂), 2.18; 2.12 und 2.08 (s, Acetyl- CH_3). – ^{13}C -NMR (CDCl_3): $\delta = 20.1$ q, 20.3 q, 20.7 q (Acetyl- CH_3), 50.7 d (C-3), 63.9 t (C-5), 74.9 d (C-4), 79.5 d (C-2), 97.8 d (C-1), 115.4 s ($J_{\text{F,C}} = 287.4$ Hz, CF_3), 157.9 s ($J_{\text{F,C}} = 38.2$ Hz, CF_3 -CO), 168.9 s, 169.2 s, 170.4 s (Acetyl-CO). – MS: $m/e = 312$ ($\text{M}^{\oplus} - \text{OCOCH}_3$), 43 (Basispeak, $\text{CH}_3 - \text{CO}$).

$\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{NO}_8$ (371.3) Ber. C 42.06 H 4.34 N 3.77 Gef. C 42.89 H 4.39 N 3.60

α -Anomeres 4a: Reinigung erfolgte über eine Lobar-Fertigsäule, Größe B, Kieselgel 60 (Merck) und Elution mit Chloroform (Merck). $[\alpha]_{\text{D}} = +121.5^\circ$ ($c = 1$ in Methanol); $R_{\text{F}} = 0.2$ (DC, Kieselgel, CHCl_3). – ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3/TMS): $\delta = 6.82$ (br, d, $J_{\text{NH},3\text{-H}} \approx 8$ Hz, NH),

6.41 (d, $J_{1,2} = 4.1$ Hz, 1-H), 5.24 (dd, $J_{1,2} = 4.1$ Hz, $J_{2,3} = 7.6$ Hz, 2-H), 4.60 (dt, $J_{3,4} = 2.6$ Hz, $J_{2,3} \approx J_{3,\text{NH}} \approx 8$ Hz, 3-H), 4.33 (q, $J_{4,5a} \approx J_{4,5b} \approx J_{3,4} \approx 3.0$ Hz, 4-H), 4.24 (5a-H) und 4.17 (5b-H), AB-Teil eines ABX-Spektrums $J_{5a,5b} = 12.2$ Hz, $J_{4,5a} = 3.6$ Hz, $J_{4,5b} = 3.8$ Hz, 2.07, 2.06 und 2.05 (s, Acetyl- CH_3). – $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): $\delta = 20.11$ q, 20.64 q, 20.82 q (Acetyl- CH_3), 49.89 d (C-3), 63.60 t (C-5), 69.56 d (C-4), 82.54 d (C-2), 94.44 d (C-1), 115.65 s ($J_{\text{F,C}} = 287$ Hz, CF_3), 156.94 s ($J_{\text{F,C}} = 37$ Hz, $\text{CF}_3 - \text{CO}$), 168.54 s, 168.77 s, 170.2 s (Acetyl-CO).

9-(3-Amino-3-desoxy- α -D-ribofuranosyl)guanin (6a) und 9-(3-Amino-3-desoxy- β -D-ribofuranosyl)guanin (6b): 2.04 g (5.50 mmol) **4b**, 1.06 g (5.50 mmol) Acetylguanin, 4.50 g (13.2 mmol) Kalium-perfluorbutansulfonat und 0.6 g (3.8 mmol) Hexamethyldisilazan werden in einen Kolben gegeben und mit 70 ml absolutem Acetonitril versetzt. Unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit werden 2.12 ml (16.8 mmol) Trimethylchlorsilan, gelöst in wenig 1,2-Dichlorethan, in die Reaktionsmischung getropft. Anschließend wird 24 h unter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit unter Rückfluß gekocht. Nach kurzer Zeit scheidet sich im Rückflußkühler ein weißes Sublimat (NH_4Cl) ab. Nach dem Abkühlen wird das Reaktionsgemisch mit 100 ml Dichlormethan verdünnt und in der Kälte mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand (≈ 3.5 g) wird über eine Kieselgelsäule [Kieselgel 60, Korngröße 0.040–0.063 mm (Merck), 30×5 cm] chromatographiert und mit Dichlormethan/Methanol 9:1, 8:2 und 6:4 entwickelt. Zuerst wird das α -Anomere **5a** und anschließend das β -Anomere **5b** in einem Verhältnis von 1:2.5 eluiert. Man erhält etwa 1.7 g ($\approx 70\%$) **5a** und **5b**, davon ca. 650 mg α -Anomeres **5a**.

9-(2,5-Di-O-acetyl-3-trifluoracetamido- β -ribofuranosyl)-N-2-acetylguanin (5b): $^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 20.1$ q, 20.4 q, 23.9 q (Acetyl- CH_3), 50.6 d (C-3'), 63.3 t (C-5'), 73.4 d (C-4'), 78.0 d (C-2'), 86.15 d (C-1'), 117.5 s ($J_{\text{F,C}} = 287.0$ Hz, CF_3), 120.5 s (C-5), 138.0 d (C-8), 148.1 s (C-4), 148.3 s (C-2), 154.7 s (C-6), 156.5 s ($J_{\text{F,C}} = 37.0$, $\text{CF}_3 - \text{CO}$), 169.0 s, 170.0 s, 173.5 s (Acetyl-CO).

Zur Schutzgruppenabspaltung werden die gereinigten Anomeren ca. 12 h bei Raumtemp. mit konz. Ammoniak behandelt, zur Trockne eingeeengt, mit Wasser aufgenommen und über eine Amberlite-IRC-50-Säule von den entstandenen Ammoniumsalzen befreit. Nach der Elution mit verd. wäßrigem Ammoniak und Umkristallisation aus Wasser erhält man die reinen α - und β -Anomeren **6a** und **6b**. Ausb. 230 mg α -Anomeres **6a** und 520 mg β -Anomeres **6b** (80%).

α -Anomeres 6a: $[\alpha]_{\text{D}} = +44.9^\circ$ ($c = 0.45$ in 50proz. wäßriger Essigsäure). – $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 8.35$ (s, 8-H), 6.2 (br s, NH_2 , mit D_2O austauschbar), 6.07 (d, $J = 2.5$ Hz, 1'-H), 5.0 (br s, OH, NH_2 , mit D_2O austauschbar), 4.10 (dd, $J = 3$ Hz und 5 Hz, 2'-H), 3.2–3.8 (m, restliche Riboseprotonen). – $^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 51.8$ d (C-3'), 60.6 t (C-5'), 76.1 d (C-2'), 85.4 d (C-4'), 91.0 d (C-1'), 107.6 s (C-5), 141.6 d (C-8), 153.5 s (C-4), 155.1 s (C-2), 160.5 s (C-6).

β -Anomeres 6b: $[\alpha]_{\text{D}} = -23.3^\circ$ ($c = 0.45$ in 50proz. wäßriger Essigsäure), Lit.⁸⁾ $[\alpha]_{\text{D}} = 26.6^\circ$ ($c = 0.45$ in 50proz. wäßriger Essigsäure). – $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 7.95$ (s, 1 H, 8-H), 6.50 (br s, NH_2 , mit D_2O austauschbar), 5.72 (br s, 1 H, 1'H), 5.0 (br s, OH, mit D_2O austauschbar), 4.12 (br s, 2'-H), 3.4–3.7 (m, restliche Riboseprotonen). – $^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 52.6$ (C-3'), 60.9 (C-5'), 75.0 (C-2'), 85.2 (C-4'), 88.0 (C-1'), 116.6 (C-5), 135.3 (C-8), 150.7 (C-4), 153.6 (C-2), 156.8 (C-6).

$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_4$ (282.3) Ber. C 42.55 H 4.99 N 29.77 Gef. C 42.60 H 4.81 N 29.55

3-(tert-Butyloxycarbonylamino)-3'-desoxyguanosin (7): 210 mg (0.75 mmol) **6b** werden in 50 ml wasserfreiem Dimethylformamid gelöst und mit 0.25 ml (1.8 mmol) Triethylamin und 0.15 ml (1.1 mmol) Azidoameisensäure-tert-butylester versetzt. Man läßt 24 h bei 50°C stehen und engt im Ölpumpenvak. zur Trockne ein. Es wird mehrmals mit Methanol aufgenommen und

eingengt. Das entstandene Triethylammoniumazid ist flüchtig. Die Umsetzung ist quantitativ (275 mg), die Substanz einheitlich (DC, Kieselgel, Methanol) und für weitere Umsetzungen genügend rein. – $^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$): $\delta = 1.39$ (s, tBu).

3'-Amino-3'-desoxyguanosin-5'-monophosphat (**8**): 275 mg (0.72 mmol) **7** werden in 5 ml PTE gelöst und unter Feuchtigkeitsausschluß bei 0°C mit 80 μl (0.8 mmol) Phosphoroxychlorid versetzt. Nach 5 h bei 4°C im Kühlschrank wird anschließend i. Ölpumpenvak. das überschüssige Phosphoroxychlorid entfernt. Danach gibt man den Ansatz bei Raumtemp. langsam in 100 ml Wasser und hält mit einem pH-Stat (Radiometer, Kopenhagen) durch Zugabe von 0.5 N NaOH bei pH 7. Nach der Hydrolyse wird 5mal mit je 25 ml Chloroform ausgeschüttelt und die wäßrige Lösung lyophilisiert. Anschließend trocknet man noch 5 h bei $40-50^\circ\text{C}$ i. Ölpumpenvak. Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe versetzt man mit 10 ml wasserfreier Trifluoressigsäure für 5 min bei Raumtemp. Es wird i. Ölpumpenvak. eingedampft, 3mal mit je 20 ml Methanol aufgenommen und erneut i. Vak. zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird in 250 ml Wasser gelöst, auf pH 7.5 eingestellt und auf eine DEAE-Sephadex-Säule (HCO_3^- -Form, 40×2.5 cm) gegeben. Nach dem Waschen mit Wasser wurde mit einem Gradienten aus 1 l Wasser/1 l 0.6 M TEAB-Puffer (pH 7.5) Verbindung **8** eluiert. Nach dem Einengen des **8**-haltigen Peaks und Entfernen des Puffers durch mehrmaliges Eindampfen mit Methanol wird **8** über eine Dowex- Na^+ -Säule (40×1.5 cm) in das Dinatriumsalz übergeführt und aus Wasser lyophilisiert. Ausb. 210 mg ($\approx 67\%$) **8**. – $^1\text{H-NMR}$ (D_2O): $\delta = 8.11$ (s, 8-H), 5.93 (br s, 1'-H), 4.70 (br s, 2'-H), 4.3–4.0 (m, restliche Riboseprotonen). – $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): $\delta = 52.92$ (C-3'), 64.11 (C-5'), 75.32 (C-2'), 83.67 (C-4'), 89.73 (C-1'), 116.89 (C-5), 138.19 (C-8), 151.69 (C-4), 154.72 (C-2), 159.64 (C-6). – $^{31}\text{P-NMR}$: $\delta = +4.01$ (pH = 10). – UV (H_2O): $\lambda_{\text{max}} = 261$ nm (pH 8).

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_6\text{Na}_2\text{O}_7\text{P} \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ (433.2) Ber. C 27.72 H 3.72 N 19.40 Gef. C 27.73 H 3.42 N 19.18

3',5'-Cyclophosphat von 3'-Amino-3'-desoxyguanosin-5'-monophosphat [3'-NH-cGMP] (**9**): 150 mg (0.32 mmol) **8** als Triethylammoniumsalz werden in 70 ml Wasser gelöst und mit dem 5fachen Überschuß (310 mg) EDC versetzt. Die Lösung wird auf 40°C erwärmt und auf pH 7.7 eingestellt. Während der Reaktion wird durch Zugabe von 5 μl -Portionen 1 N HCl der pH-Wert auf 7.7 gehalten. Nach etwa 7–8 h ist die Cyclisierung fast vollständig (DC, Kieselgel, 2-Propanol; Ammoniak (konz.): Wasser = 7:1:2). Nach der Reaktion wird die Lösung mit Wasser auf 250 ml verdünnt und auf eine DEAE-Sephadex-A25-Säule (HCO_3^- -Form, 40×2.5 cm) gegeben. Nach dem Waschen mit Wasser wird mit einem Gradienten aus 1 l Wasser/1 l 0.3 M TEAB-Puffer (pH 7.5) Verbindung **9** und wenig nicht cyclisiertes 3'-Amino-5'-GMP **8** eluiert. Nach dem Einengen des **9**-haltigen Peaks wird zur Entfernung des TEAB-Puffers noch 3mal mit Methanol eingengt, der Rückstand in Wasser gelöst und über eine Dowex- Na^+ -Säule gegeben. Das Na-Salz von **9** wird aus Wasser lyophilisiert. Ausb. 75 mg als TEA-Salz ($\approx 52\%$). Es scheint so, als ob 30–40% von **9** aus der obigen Reaktionsmischung auf der DEAE-Sephadex-Säule festgehalten werden und nicht eluierbar sind. Dagegen wird reines **9** ohne Verluste bei der Chromatographie auf der gleichen Säule wiedergefunden. Für die Lagerung im Tiefkühlschrank ist es ratsam, die wäßrige Lösung mit 1 N NaOH auf pH 10 einzustellen und anschließend zu lyophilisieren. – $^1\text{H-NMR}$ [400 MHz, D_2O , $(\text{CH}_3)_3\text{SiCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$): $\delta = 7.86$ (s, 8-H), 5.95 (s, 1'-H), 4.62 (d, $J_{2',3'} = 5.1$ Hz, 2'-H), 4.44 (ddd, $J_{5'a,5'b} = (-)9.7$ Hz, $J_{5'a,P} = 20.2$ Hz, 5'-Ha), 4.23 (dt, $J_{5'b,P} = 1.5$ Hz, 5'-Hb), 4.04 (dt, $J_{4',5'b} = 10.5$ Hz, $J_{4',5'a} = 10.5$ Hz, 4'-H), 3.98 (ddd, $J_{3',4'} = 10.3$ Hz, $J_{3',P} = 2.5$ Hz, 3'-H). – $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O): $\delta = 59.91$ (C-3'), 68.15 (C-5'), $J_{5',P} = 5$ Hz), 74.22 (C-2'), $J_{2',P} = 9$ Hz), 75.35 (C-4'), 92.99 (C-1'), 117.32 (C-5), 138.42 (C-8), 151.79 (C-4), 155.03 (C-2), 160.10 (C-6). – $^{31}\text{P-NMR}$: $\delta = +5.7$ (pH 8.8); +5.15 ($[\text{D}_6]\text{DMSO}$). – UV (H_2O): $\lambda_{\text{max}} = 251$ nm (pH 8).

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{NaO}_6\text{P} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (384.2) Ber. C 31.26 H 3.67 N 21.87 Gef. C 31.07 H 3.44 N 21.45

- 1) IX. Mitteil.: M. Morr und L. Ernst, J. Chem. Res. (S) **1981**, 90; (M) **1981**, 1153.
- 2) C. I. Pogson, Am. J. Clin. Nutr. **27**, 380 (1974).
- 3) T. Nakanishi, T. Iida, F. Tomita und A. Furuya, Chem. Pharm. Bull. **24**, 2955 (1976).
- 4) G. B. Elion, J. L. Rideout, P. d. Miranda, P. Collins und D. J. Bauer, Ann. N. Y. Acad. Sci. **255**, 468 (1975).
- 5) W. W. Lee, A. P. Martinez, L. Goodman und D. W. Henry, J. Org. Chem. **37**, 2923 (1972), und dort zitierte Literatur.
- 6) R. Mengel und W. Muhs, Chem. Ber. **112**, 625 (1979).
- 7) K. Schatka und B. Jastorff, Chem. Ber. **105**, 3824 (1972).
- 8) H. M. Kissman, A. S. Hoffman und M. J. Weiss, J. Am. Chem. Soc. **85**, 407 (1963).
- 9) F. W. Lichtenhaler, E. Cuny, T. Morino und J. Rychlik, Chem. Ber. **112**, 2588 (1979).
- 10) A. V. Azhayev und J. Smrt, Collect. Czech. Chem. Commun. **43**, 1520 (1978).
- 11) A. V. Azhayev, Nucleic Acids Res. **6**, 625 (1979).
- 12) A. Okruszek und J. G. Verkade, J. Med. Chem. **22**, 882 (1979).
- 13) M. Morr und L. Ernst, Chem. Ber. **111**, 2152 (1978).
- 14) M. J. Robins und R. K. Robins in Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry, Vol. 1, S. 519, Interscience Publ., New York, London, Sydney, Toronto 1968.
- 15) H. Vorbrüggen und B. Bennua, Tetrahedron Lett. **1978**, 1339.
- 16) Wir danken Herrn Dr. Mitschke, Anorganisch-Chemische Abteilung, Bayer AG, 5090 Leverkusen, für die Überlassung von $C_4F_9SO_3K$.
- 17) H. Vorbrüggen und B. Bennua, Chem. Ber. **114**, 1279 (1981).
- 18) J. B. Hobbs und F. Eckstein, J. Org. Chem. **42**, 714 (1977).
- 19) Brockhaus, abc biochemie, VEB, F. A. Brockhaus Verlag, Leipzig 1976.
- 20) B. Jastorff, Cyclic Nucleotide Analogues in Eukaryotic Cell Function and Growth (J. E. Dumont, B. L. Brown und N. J. Marshall), Plenum Publishing Corp., New York 1976.
- 21) J. P. Miller, K. H. Boswell, K. Muneyama, L. N. Simon, R. K. Robins und D. A. Shuman, Biochemistry **12**, 5310 (1973).
- 22) M. Morr, M.-R. Kula und L. Ernst, Tetrahedron **31**, 1619 (1975).
- 23) M. Yoshikawa, T. Kato und T. Takenishi, Bull. Chem. Soc. Jpn. **42**, 3505 (1969).
- 24) T. J. Pinnaraia, H. Todd Miles und Edwin D. Becker, J. Am. Chem. Soc. **97**, 7198 (1975).
- 25) B. Jastorff, E. Carcia Abbad, G. Petridis, W. Tegge, R. de Wit, C. Erneux, W. J. Stec und M. Morr, Systematic use of cyclic nucleotide analogues-mapping of essential interactions between nucleotides and proteins, in Nucleic Acids Res., S. 219, The Vth Symposium on the Chemistry of Nucleic Acid Components held at Bechyně Castle Czechoslovakia, September 6th–11th 1981, Nucleic Acids Symposium Series No. 9, IRL Press, Limited, London 1981.
- 26) Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papier-Chromatographie, E. Merck, Darmstadt, 1980, S. 7.

[150/81]