

## Systematische Untersuchung der Phosphorylierungsbedingungen für 5'-Amino-5'-desoxyguanosin-Verbindungen<sup>1)</sup>

Kay Schattka\*) und Bernd Jastorff\*\*\*)

Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Abteilung Chemie, Göttingen,  
D-3400 Göttingen, Hermann-Rein-Str. 3

Eingegangen am 1. April 1974\*\*\*\*)

Die Phosphorylierungsbedingungen für 5'-Amino-, 5'-Amino-2',3'-isopropyliden- bzw. 5'-Butylamino-5'-desoxyguanosin (**1a**, **b** bzw. **1c**) mit Phosphorsäurediesterchloriden wurden systematisch untersucht und eine Abhängigkeit von allen Reaktionsparametern wie Reagenz, Lösungsmittel, tertiärer Hilfsbase und Guanosinderivat festgestellt. Ein neues generell geeignetes Phosphorylierungssystem, bestehend aus Phosphorsäurediesterchlorid, *N,N*-Diisopropyläthylamin und Triäthylphosphat bzw. Dimethylformamid, wurde gefunden.

### Systematic Investigation of the Reaction Conditions for the Phosphorylation of 5'-Amino-5'-desoxyguanosine Compounds

Reaction conditions for the phosphorylation of 5'-amino-, 5'-amino-2',3'-isopropylidene-, and 5'-butylamino-5'-desoxyguanosine (**1a**, **b**, **c** respectively) with diesters of phosphorochloridic acid have been systematically investigated and the dependence of the reaction on reagent, solvent, tertiary base and guanosine derivative has been determined. A new, generally applicable phosphorylating system employing a diester of phosphorochloridic acid, *N,N*-diisopropylethylamine and triethylphosphate (or dimethylformamide) is described.

Vergleicht man die Arbeiten über die Phosphorylierung von Guanosin mit denen der anderen Nucleoside, so findet man, daß die Zahl der Publikationen wesentlich geringer ist. So sind in der Literatur nur wenige Standardmethoden zur Darstellung von Phosphorsäureestern des Guanosins mit annehmbaren Ausbeuten beschrieben, wie die direkte Phosphorylierung der 5'-Hydroxygruppe mit  $\text{POCl}_3$ <sup>2)</sup> oder die Umsetzung mit  $\beta$ -Cyanäthylphosphat<sup>3)</sup> bzw. Dinitrophenylphosphat<sup>4)</sup> und Dicyclohexylcarbodiimid. Mit den für die anderen Nucleoside gängigen Reagenzien wie Phosphorsäure-bis(benzyl- bzw. phenylester)-chlorid<sup>4,5)</sup> oder Phosphorsäure/Phosphorpentoxid<sup>6)</sup> ließ sich Guanosin gar nicht phosphorylieren. Neuere Phosphorylierungsmethoden werden fast ausschließlich an Thymidin, Cytidin oder Adenosin er-

\*) Neue Adresse: D-6200 Wiesbaden, Bundeskriminalamt KT II, Thearstr.

\*\*\*) Neue (Korrespondenz-)Adresse: D-2800 Bremen 33, Universität NW 1, Achterstraße.

\*\*\*\*) Erweiterte Fassung eines am 17. Juli 1972 eingegangenen Manuskripts.

1) Nucleotid-Analoga mit P–N-Bindung, VIII; VII. Mitteil.: K. Schattka und B. Jastorff, Chem. Ber. 105, 3824 (1972).

Ein Teil dieser Arbeit wurde auf der Arbeitstagung der Nucleotidchemiker am 3./4. Mai 1973 in der Univ. Konstanz vorgetragen.

2) M. Yoshikawa, T. Kato und T. Takenishi, Tetrahedron Lett. 1967, 5065.

3) P. T. Gilham und G. M. Tener, Chem. Ind. (London) 1959, 542.

4) R. W. Chambers, J. G. Moffatt und H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 79, 3747 (1957).

5) A. M. Michelson und A. R. Todd, J. Chem. Soc. 1949, 2476.

6) R. H. Hall und H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 77, 1871 (1955).

probt<sup>7-10</sup>). Es wird dabei vermutlich angenommen, daß die für diese Nucleoside gültigen Synthesen ohne große experimentelle Schwierigkeiten auf Guanosin übertragen werden können.

Wie wenig zutreffend diese Vermutung ist, stellten wir fest, als wir die für 5'-Aminoadenosin und -thymidin-Derivate beschriebenen Phosphorylierungsmethoden<sup>11-14</sup>) auf die Darstellung von Nucleotidanalogen des 5'-Amino-5'-desoxyguanosins (**1**) anwendeten. Keine der angegebenen Reaktionsbedingungen führte bei den entsprechenden Derivaten des Guanosins zum Erfolg, obwohl anzunehmen war, daß die Reaktivität des Nucleosids durch Einführung einer Aminogruppe in die 5'-Position erheblich gesteigert würde.

Überraschenderweise bessere Ausbeuten bei Guanosin als bei Adenosin lieferte dagegen das jüngst von uns beschriebene Verfahren zur Darstellung von Nucleotidanalogen mit P-N-Bindung aus Azidonucleosid und Phosphit<sup>15</sup>), das sich allerdings bisher nicht auf die Synthese *N*-substituierter Derivate übertragen ließ. Da gerade diese Verbindungsklasse im Hinblick auf die Synthese von 5'-Amidoanalogen des Guanosin-(3',5')-cyclophosphats<sup>16</sup>) sehr interessant ist, untersuchten wir systematisch die Gründe für die gehinderte Phosphorylierung der Aminoguanosin-Derivate **1** mit Phosphorsäurediesterchloriden.

Modellverbindungen für die Untersuchungen waren 5'-Amino-5'-desoxy-2',3'-isopropylidenguanosin (**1a**)<sup>17</sup>), 5'-Amino-5'-desoxyguanosin (**1b**)<sup>1)</sup> und 5'-Butylamino-5'-desoxyguanosin (**1c**)<sup>1)</sup>. Diese Verbindungen wurden nach dem folgenden allgemeinen Schema (Reaktionsschema 1) phosphoryliert.

Alle Ansätze führte man im Halbmikromaßstab durch und analysierte u. a. dünn-schichtchromatographisch. Die Aminonucleotide **5** wurden dabei durch ihr UV-Spektrum, den  $R_F$ -Wert sowie durch Salzsäure-Spaltung der P-N-Bindung und den Nachweis des dabei gebildeten Aminonucleosids **1** eindeutig charakterisiert. Bei den Verbindungen **5b3**, **5b4** und **5c2-5c4** zeigte man darüber hinaus durch Nachweis der vicinalen OH-Gruppen, daß in 2',3'-Stellung keine Phosphorylierung stattgefunden hatte, obwohl alle Ansätze mit einem Überschuß an Phosphorylierungsreagenz durchgeführt wurden. Durch Vergleich mit auf anderem Wege<sup>15</sup>) hergestelltem Material konnten die Verbindungen **5a3** und **5a4** zugeordnet werden.

Die Phosphorylierung der Verbindungen **1a** und **1b** mit dem Phosphorsäure-diphenylester-chlorid (**3**) in Pyridin mit Tri-*n*-butylamin als Hilfsbase lieferte die Diesteramide **5a3** und **5b3**. Wurde die Reaktion mit dem Phosphorsäure-bis(*p*-nitrophenylester)-chlorid (**4**) durchgeführt, so erhielt man ein unübersichtliches Reaktionsgemisch,

<sup>7)</sup> A. F. Cook, M. J. Holman und A. L. Nussbaum, J. Amer. Chem. Soc. **91**, 1522 (1969).

<sup>8)</sup> T. A. Khwaja und C. B. Reese, J. Amer. Chem. Soc. **88**, 3446 (1966).

<sup>9)</sup> F. Cramer und K. H. Scheit, Liebigs Ann. Chem. **679**, 150 (1964).

<sup>10)</sup> F. Eckstein, Angew. Chem. **77**, 912 (1969); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **4**, 876 (1969).

<sup>11)</sup> B. Jastorff und H. Hettler, Chem. Ber. **102**, 4119 (1969).

<sup>12)</sup> A. Murayama, B. Jastorff, F. Cramer und H. Hettler, J. Org. Chem. **36**, 3029 (1971).

<sup>13)</sup> R. L. Letsinger und W. S. Mungall, J. Org. Chem. **35**, 3800 (1970).

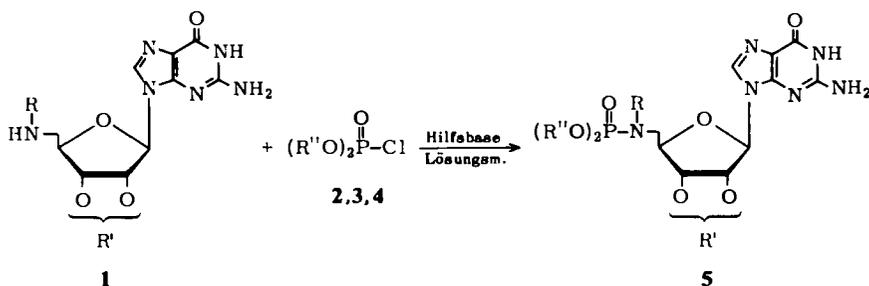
<sup>14)</sup> B. Jastorff und T. Krebs, Chem. Ber. **105**, 3192 (1972).

<sup>15)</sup> W. Freist, K. Schatka, F. Cramer und B. Jastorff, Chem. Ber. **105**, 991 (1972).

<sup>16)</sup> Literaturübersicht der biologischen Eigenschaften s. J. G. Hardman, G. A. Robinson und E. W. Suherland, Ann. Rev. Physiol. **33**, 311 (1971).

<sup>17)</sup> M. G. Stout, M. J. Robins, R. K. Olsen und R. K. Robins, J. Med. Chem. **12**, 658 (1969).

## Reaktionsschema 1



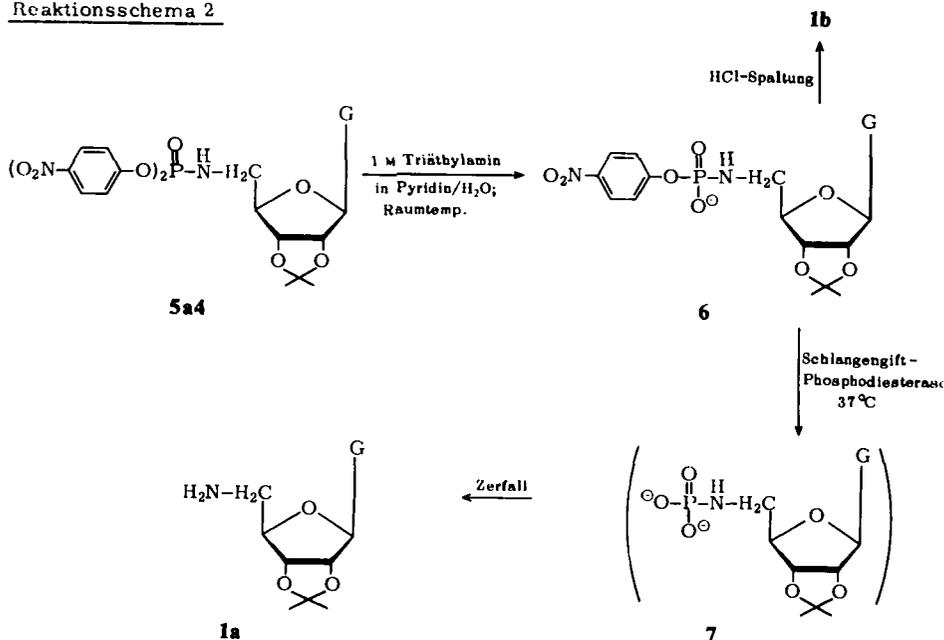
	R	R'	R''
<b>1a</b>	H	Isopropyliden	
<b>1b</b>	H	H	
<b>1c</b>	n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	H	
<b>2</b>			C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
<b>3</b>			C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
<b>4</b>			p-O <sub>2</sub> N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
<b>5a3</b>	H	Isopropyliden	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
<b>5a4</b>	H	Isopropyliden	p-O <sub>2</sub> N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
<b>5b3</b>	H	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
<b>5b4</b>	H	H	p-O <sub>2</sub> N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>
<b>5c2</b>	n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
<b>5c3</b>	n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
<b>5c4</b>	n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	H	p-O <sub>2</sub> N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>

Ersetzte man hingegen das Pyridin durch Triäthylphosphat oder Dimethylformamid, so verliefen die Reaktionen in der gewünschten Richtung. Allgemein ließ sich **1a** leichter und mit besseren Ausbeuten als **1b** phosphorylieren, was sicherlich u. a. auf dessen bessere Löslichkeit zurückzuführen ist.

Die Verbindung **5a4** konnte auch noch auf anderem Weg — ausgehend vom 5'-Azido-5'-desoxy-2',3'-isopropylidenguanosin mit Tris(*p*-nitrophenyl)phosphit als Reagenz nach Zit.<sup>15)</sup> — hergestellt werden. Auffallend ist die Instabilität von **5a4**. Allerdings zerfällt die Substanz nicht — wie beim 5'-Sauerstoff-Analogen beobachtet<sup>4)</sup> — in das cyclische Nucleosid. Es wird vielmehr schon bei Raumtemperatur sukzessive eine Estergruppe abgespalten, wobei das geladene Monoesteramid **6** entsteht, das man durch chemischen und enzymatischen Abbau analysierte. Quantitativ läßt sich diese Spaltung in einer 1 M Lösung von Triäthylamin in Pyridin, das Spuren von Wasser enthält, durchführen (Reaktionsschema 2).

Die Phosphorylierbarkeit des *N*-substituierten Aminoguanosins **1c** war noch entscheidender abhängig von der Art des Reagenzes, des Lösungsmittels und der tertiären Hilfsbase. So führte die klassische Phosphorylierung in Pyridin/Triäthylamin bzw. Tri-*n*-butylamin bei keinem der drei Reagenzien **2**, **3** und **4** zum Erfolg, was nicht auf Lösungsschwierigkeiten zurückzuführen war. Der Ersatz des Pyridins

## Reaktionsschema 2



durch Triäthylphosphat lieferte mit **2** und **3** in sehr guten Ausbeuten die Diesteramide **5c2** und **5c3**, während bei der Phosphorylierung mit dem Bis(*p*-nitrophenylester)-chlorid **4** die Ausgangsverbindung **1c** quantitativ zurückerhalten wurde. Dieses Verhalten sollte wegen des gleichen Lösungsmittels auf unterschiedliche Wechselwirkung des Phosphorylierungsreagenzes mit der Hilfsbase zurückzuführen sein.

Entsprechende Versuche ergaben, daß **4** sowohl mit Triäthylamin als auch mit Tri-*n*-butylamin einen stabilen Komplex bildet. Der Triäthylamin-Komplex konnte in kristalliner Form isoliert werden. Nach dem NMR-Spektrum und der Analyse entfallen dabei auf 1 mol Reagenz **2** mol Base. Auch der Tri-*n*-butylamin-Komplex ließ sich — allerdings wegen der besseren Löslichkeit etwas umständlicher — isolieren und durch NMR charakterisieren. Er zeichnete sich außerdem noch in der Dünnschichtchromatographie durch einen wesentlich höheren  $R_F$ -Wert aus. Weder bei Reagenz **2** noch bei **3** ließen sich ähnliche Verbindungen nachweisen.

Die Komplexbildungstendenz des Phosphorsäure-bis(*p*-nitrophenylester)-chlorids (**4**) mußte also für die Inaktivität gegenüber **1c** verantwortlich sein. Durch Wahl der sterisch an der Komplexbildung gehinderten Hilfsbase *N,N*-Diisopropyläthylamin (Hünig-Base) wurde in Kombination mit Triäthylphosphat als Lösungsmittel die Phosphorylierung von **1c** mit **4** ermöglicht.

Die unterschiedliche Phosphorylierbarkeit der Aminogruppe in **1a,b** bzw. **1c** mit dem Reagenz **4** läßt vermuten, daß *N*-Substitution und Komplexbildung zwischen Reagenz und Hilfsbase zu so starker sterischer Hinderung führt, daß eine Phosphorylierung unmöglich wird. Verhindert man die Komplexbildung, spielt die *N*-Substitution keine entscheidende Rolle mehr.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt, daß bei der Reaktion von Amino-guanosin-Derivaten **1** mit Phosphorsäure-diester-chloriden folgende Faktoren berücksichtigt werden müssen:

1. Eine Substitution der 5'-Aminogruppe vermindert die Reaktivität erheblich. Sie gleicht bei Verbindungen von Typ **1c** der des Guanosins.

2. Das Lösungsmittel hat einen bedeutenden Einfluß auf den Ablauf der Reaktion. Das bei Phosphorylierungen so gängige Pyridin ist ungeeignet. Im Fall **1c** verhindert es jegliche Umsetzung. Das unpolare Triäthylphosphat erwies sich als bestes Lösungsmittel, da hierin nahezu keine Nebenreaktionen beobachtet wurden. Auch Dimethylformamid ermöglicht eine Umsetzung mit befriedigender Ausbeute.

3. Bei Phosphorylierungsreagenzien, die wie z. B. **4** stabile Komplexe mit der tertiären Hilfsbase bilden, ist eine sterisch gehinderte Base nötig (**1c**) bzw. vorteilhaft (**1a, b**), um erfolgreich zu phosphorylieren.

Als allgemeines Phosphorylierungssystem für die Darstellung von 5'-Amino-5'-desoxyguanosin-*N*-phosphateestern **5** hat sich daher folgende Kombination bewährt: Phosphorsäure-diester-chlorid, Triäthylphosphat und *N,N*-Diisopropyläthylamin. Für präparative Ansätze wählt man allerdings besser Dimethylformamid als Lösungsmittel, da die Abtrennung größerer Mengen an Triäthylphosphat mit erheblichem Aufwand verbunden ist.

Die neuen Reaktionsbedingungen führten auch zur bisher als nicht möglich beschriebenen<sup>4)</sup> Phosphorylierung von 2',3'- Isopropylidenguanosin mit Phosphorsäure-bis(*p*-nitrophenylester)-chlorid (**4**).

Herrn Prof. Dr. *F. Cramer* danken wir für die Förderung dieser Arbeit. Unser Dank gilt auch Herrn *B. Seeger* für die Messung der NMR-Spektren sowie Herrn *W. Ahrberg* und Frau *T. Krebs* für ausgezeichnete technische Assistenz. Die Arbeit wurde von der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* unterstützt.

## Experimenteller Teil

### Allgemeine Bemerkungen

Die UV-Spektren wurden in Methanol mit dem Spektralphotometer Unicam SP 1800 gemessen. Die <sup>1</sup>H- und <sup>31</sup>P-NMR-Spektren wurden mit dem Multikern-Spektrometer Modell HX-60 der Fa. Bruker, die Massenspektren mit dem MS 30 bzw. MS 9 der Firma AEI aufgenommen.

Die Ausbeuten wurden z. T. dünnschichtchromatographisch mit dem Vitatron-Dünnschicht-Densitometer TLD 100, zum Teil durch Auswiegen bestimmt. Sie wurden nicht optimiert.

Zur Erkennung der 5'-Amino-5'-desoxynucleoside **1a** und **1b** bzw. des 5'-Butylamino-5'-desoxyguanosins (**1c**) auf Dünnschichtplatten bzw. Papier dienen Ninhydrin bzw. Nitroprussidnatrium-Acetaldehyd-Reagenz<sup>18)</sup>. Der Nachweis freier vicinaler Hydroxygruppen wurde mit dem Benzidin-Natriummetaperjodat-Reagenz geführt<sup>18)</sup>. Phosphor wies man mit dem Isherwood-Hanes-Reagenz<sup>19)</sup> nach. Nucleotide mit Nitrophenylgruppen erkannte man

<sup>18)</sup> *E. Merck*, Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, Darmstadt 1970.

<sup>19)</sup> *H. Hettler* in *M. Lederer*, Chromatographic Reviews, Bd. 1, S. 255, Elseviers Publ. Comp., Amsterdam 1959.

Analysen, Spektraldaten und  $R_F$ -Werte der dargestellten Verbindungen<sup>a)</sup>

Substanz	UV <sup>b)</sup> (Methanol) $\lambda_{\max}$ (nm)	Summen- formel (Mol.-Masse)	Analyse Ber./Gef.	<sup>1</sup> H-NMR <sup>c)</sup> $\delta$ (ppm) <i>J</i> (Hz)	<sup>31</sup> P-NMR <sup>d)</sup> $\delta$ (ppm)	Massenspektren <sup>e)</sup> <i>m/e</i> (rel.Int.) [MeiTemp.]	$R_F$ -Werte, bezogen auf Thymidin Papier			
							C	D	B	B
<i>N</i> -(5'-Desoxy-2',3'-isopropyliden-5'-guanosyl)phosphorsäure-diphenylester-amid	(5a3) 253 (Sch.)	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> P (554,5)	P 5.59/5.56	7.86 (1H, s, 8-H) 6.9–7.6 (10 H, m, Aromatenprot.)	-0.48	555 (6%), 554 (20%) M <sup>+</sup> ; 404 (15%) M <sup>+</sup> - (B + 1) 151 (85%) B + 1 F 94 (100%) C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH [280°C]	1.29	1.45	0.89	0.89
<i>N</i> -(5'-Desoxy-2',3'-isopropyliden-5'-guanosyl)phosphorsäure-bis( <i>p</i> -nitrophenylester)-amid <sup>f)</sup>	(5a4)	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> N <sub>6</sub> O <sub>11</sub> P (644,3)	—	—	—	—	1.25	1.64	—	—
<i>N</i> -(5'-Desoxy-5'-guanosyl)phosphorsäure-diphenylester-amid	(5b3) 257 270 (Sch.)	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> P (514,4)	P 5.30/6.02	[D]Methanol 7.78 (1H, s, 8-H) 7.08–7.5 (10 H, m, Aromatenprot.)	0.48	363 (1%) M <sup>+</sup> - (B + 1) 153 (8%) B + 3 152 (10%) B + 2 151 (6%) B + 1 F 94 (100%) C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH [250°C]	0.94	0.92	1.08	1.08
<i>N</i> -(5'-Desoxy-5'-guanosyl)phosphorsäure-bis( <i>p</i> -nitrophenylester)-amid	(5b4)	C <sub>22</sub> H <sub>21</sub> N <sub>6</sub> O <sub>11</sub> P (604,4)	—	7.88 (1H, s, 8-H) 7.51 (4H, dd <i>J</i> = 9, 3, 1) 8.28 (4H, d, <i>J</i> = 9, 3) (Aromatenprot.)	0.0 (d)	—	1.26	1.13	1.14	1.14
<i>N</i> -Butyl- <i>N</i> -(5'-desoxy-5'-guanosyl)phosphorsäurediäthylester-amid	(5c2) 257 (Sch.)	C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> P (474,5)	C 45.57/45.44 H 6.59/6.80 N 17.71/17.02	7.89 (1H, s, 8-H) 3.6–4.3 (4 H, m, P–O–CH) 1.3 (6H, t, <i>J</i> = 7, P–O–C–CH)	-9.97	179 (100%) B + C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> B + CHO 151 (85%) B + 1 F [350°C]	0.88	0.96	1.07	1.07
<i>N</i> -Butyl- <i>N</i> -(5'-desoxy-5'-guanosyl)phosphorsäurediphenylester-amid	(5c3) 256 271 (Sch.)	C <sub>26</sub> H <sub>31</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> P (570,6)	—	7.94 (1H, s, 8-H) 6.9–7.4 (10 H, m, Aromatenprot.)	-0.69	—	1.08	1.04	1.11	1.11

Tab. (Fortsetzung)

Substanz	UV <sup>b)</sup> (Methanol) $\lambda_{\text{max}}$ (nm)	Summenformel (Mol.-Masse)	Analyse Ber./Gef.	<sup>1</sup> H-NMR <sup>c)</sup> $\delta$ (ppm) J (Hz)	<sup>31</sup> P-NMR <sup>d)</sup> $\delta$ (ppm)	Massenspektren <sup>e)</sup> m/e (rel. int.) [Methemp.]	R <sub>f</sub> -Werte bezogen auf Thymidin Dünnschicht Papier C D B
N-Butyl-N-(5'-desoxy-5'- guanosyl)phosphorsäure- bis(p-nitrophenylester)- amid	(5 e4) 259 270 (Sch.)	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> N <sub>8</sub> O <sub>11</sub> P (660,6)	C 47,28/47,09 H 4,43/4,51 N 16,96/16,82 P 4,69/4,70	7,88 (1H, s, 8-H) 7,43 (4H, vierfaches d, J = 9,3; 2,5; 1) 8,22 (4H, dd; J = 9,3; 2,5) (Aromatenprot.)	0,0	492 (2%), 491 (7%) M <sup>+</sup> - (B + 1) - H <sub>2</sub> O; 353 (10%), 352 (62%) 491 - pNPH. 169 (10%) (B + 1) + H <sub>2</sub> O; 151 (67%) B + 1; 139 (100%) pNPH 123 (63%) C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> [215°C]	1,30 1,11 1,13
Komplex  <chem>O=C(Oc1ccc(O)cc1)Cl</chem> · 2 N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub>	292	C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> ClN <sub>8</sub> O <sub>7</sub> P (561,0)	C 51,38/51,40 H 6,83/6,95 Cl 6,32/6,36 N 9,99/9,98 P 5,52/5,70	Deuteriochloroform 8,16 (4H, d, J = 9) 7,41 (4H, d, J = 9) 3,18 (6H, q, J = 7) 3,10 (6H, q, J = 7) 1,36 (18H, t, J = 7)	Deuteriochloroform + 12,4	526 (17%); 525 (30%); 524 (53%); M <sup>+</sup> - HCl 480 (5%); 479 (16%); 478 (16%); M <sup>+</sup> - HCl - NO <sub>2</sub> 323 (45%); M <sup>+</sup> - (pNP) <sub>2</sub> PO 139 (100%) pNP + H 109 (100%) pNP + H - NO 101 (32%); N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub> [350°C]	1,1

a) Siehe auch „Allgemeine Bemerkungen“.

b) Sch. = Schülter.

c) An NMR-Daten wurden nur die für neu eingeführte Gruppen beweisenden Signale sowie die Lage von 8-H aufgeführt (Lösungsmittel, wenn nicht anders angegeben: [D<sub>2</sub>]DMSO; int. Standard: Tetramethylsilan)

d) Lösungsmittel, wenn nicht anders angegeben: [D<sub>6</sub>]DMSO; ext. Standard: H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

e) M<sup>+</sup> = Molekülpeak; B = Base; F = Basenfragmente bei m/e 135, 134, 110, 109, 108; pNP = O<sub>2</sub>N-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-O.

f) Siehe allg. Teil.

durch Abspaltung des *p*-Nitrophenylrestes mit Natronlauge bzw. an einer UV-Aktivität bei 254 und 360 nm.

Vergleichsmaterialien standen aus Synthesen, die im Zitat<sup>15)</sup> beschrieben sind, zur Verfügung.

Papierchromatographie: Papier Schleicher & Schüll 2043 b Mgl, Laufmittel: *n*-Propanol/konz. Ammoniak/Wasser (7:1:2) (A) und Äthanol/1 M Ammoniumacetatlösung (7:3) (B). Dünnschichtchromatographie: Kieselgel-DC-Fertigplatten F<sub>254</sub> bzw. PF<sub>254</sub> der Fa. E. Merck, Laufmittelsysteme: A sowie Aceton/Benzol/Wasser (8:2:1) (C) und Chloroform/Methanol (8:2) (D). Man ließ sowohl bei der analytischen als auch bei der präparativen Schichtchromatographie grundsätzlich in Chloroform vorlaufen, um ein Verschmieren der Zonen durch Dimethylformamid (DMF), Triäthylphosphat u. a. zu vermeiden. Zur Bestimmung der *R<sub>F</sub>*-Werte wurde, soweit nichts anderes angegeben, Thymidin als Bezugssubstanz gleich 1 gesetzt.

Elektrophorese: Papier Schleicher & Schüll 2043 b Mgl, Laufmittel Boratpuffer pH 10 (E).

Analysen, Spektraldaten und *R<sub>F</sub>*-Werte der dargestellten Verbindungen s. Tabelle.

*N*-(5'-Desoxy-2',3'-isopropyliden-5'-guanosyl)phosphorsäure-diphenylester-amid (**5a3**): 32.2 mg (1360 OD = 0.1 mmol) 5'-Amino-5'-desoxy-2',3'-isopropylidenguanosin (**1a**) wurden in 1 ml absol. Pyridin gelöst. Nach Zugabe von 100 µl Tri-*n*-butylamin wurde die Mischung auf -40°C abgekühlt. Danach tropfte innerhalb von 5 min eine Lösung von 50 µl (ca. 0.25 mmol) Phosphorsäure-diphenylester-chlorid (**3**) in 1 ml absol. Pyridin so zu, daß die Temperatur -30°C nicht überstieg. Nach Zugabe wurden weitere 30 min bei -30°C und danach noch 3 h bei 0°C gerührt. Anschließend wurde das Pyridin abgedampft, der Rückstand mit Methanol aufgenommen und das Gemisch chromatographisch im System Chloroform/Methanol (85:15) getrennt. Ausb. 70% (spektralphotometrisch bestimmt). Bei der HCl-Spaltung entstand **1b**. **5a3** ist mit dem in Zitat<sup>15)</sup> synthetisierten Vergleichsmaterial identisch.

*N*-(5'-Desoxy-2',3'-isopropyliden-5'-guanosyl)phosphorsäure-bis(*p*-nitrophenylester)-amid (**5a4**): Man löste 16 mg (680 OD = 0.05 mmol) 5'-Amino-5'-desoxy-2',3'-isopropylidenguanosin (**1a**) in 2 ml absol. DMF. Anschließend wurde — nach Zugabe der tertiären Hilfsbase Tri-*n*-butylamin — die Mischung innerhalb von 30 min bei Raumtemp. mit 55 mg (0.15 mmol) Phosphorsäure-bis(*p*-nitrophenylester)-chlorid (**4**) portionsweise versetzt. Nach 2 h waren mehr als 80% Amin umgesetzt.

Nach 4 h wurde aufgearbeitet, da das Produkt **5a4** zusehends in das Monoesteramid **6** zerfiel. Die Lösung wurde zur Trockene eingedampft, mit wenig DMF wieder aufgenommen und schichtchromatographisch im System Chloroform/Methanol (9:1) aufgetrennt. Dabei zeigte sich, daß es unmöglich war, **5a4** wegen seiner großen Instabilität rein zu isolieren. Bei jedem Versuch, **5a4** chromatographisch rein zu erhalten, wurde ein Teil des Diesters zum Monoesteramid **6** gespalten, wobei sich UV-spektroskopisch und chromatographisch jeweils nur ein Gemisch beider Komponenten nachweisen ließ. Von dem Produkt **5a4** lassen sich einwandfrei nur die *R<sub>F</sub>*-Werte angeben (s. Tab.).

*N*-(5'-Desoxy-2',3'-isopropyliden-5'-guanosyl)phosphorsäure-mono(*p*-nitrophenylester)-amid (**6**): Um das Produkt **6** quantitativ zu bekommen, wurden 180 OD Lösung des Gemisches eingedampft, der Rückstand mit 1 ml 1 M Triäthylamin in Pyridin über Nacht bei Raumtemp. stehengelassen. Der Ansatz wurde papierchromatographisch im System A aufgetrennt und die der Verbindung **6** entsprechende Zone mit Wasser/Methanol eluiert.

Das erhaltene Produkt weist ein für diese Verbindungsklasse typisches UV-Spektrum mit doppeltem Maximum auf. Ausb. 66 OD. UV: λ<sub>max</sub> 257, λ<sub>max</sub> 278, 315 nm (Schulter).

*R<sub>F</sub>*-Werte: Papierchromatographie: 1.0 (B), Dünnschichtchromatographie: 1 (A), 0.71 (C), 0 (D), Bezugssubstanz cGMP. — Elektrophorese: System E, 0.75, Bezugssubstanz cGMP. — Bei der HCl-Spaltung entstand das Amin **1b**.

*Enzymatische Spaltung von 6*: 5 OD von **6** wurden mit 50  $\mu$ l 0.1 M Tris-Puffer pH 7.5 und 5  $\mu$ l Schlangengift-Phosphodiesterase bei 37°C 5 h inkubiert. Es entstand quantitativ das Amin **1a**.

*N-(5'-Desoxy-5'-guanosyl)phosphorsäure-diphenylester-amid (5b3)*: Zu einer auf 0°C abgekühlten Suspension von 70.5 mg (0.25 mmol) 5'-Amino-5'-desoxyguanosin (**1b**) in 12.5 ml absol. Pyridin gab man 180  $\mu$ l (0.75 mmol) über Aluminiumoxid getrocknetes Tri-n-butylamin. Anschließend tropften 155  $\mu$ l (0.75 mmol) Phosphorsäure-diphenylester-chlorid (**3**) zur Mischung. Man ließ 4 h bei 0°C und weitere 4 h bei Raumtemp. rühren.

Der leicht bräunliche Ansatz wurde mit 10 ml Wasser versetzt und dann zur Trockne eingedampft. Den Rückstand digerierte man mit Methanol und dampfte erneut ein. Nach erneuten Aufnehmen mit 50 ml Methanol filtrierte man von Ungelöstem ab, engte das Filtrat auf 5 ml ein und isolierte die gesuchte Substanz durch präparative Schichtchromatographie in System C. Ausb. 26 mg (20%). Test auf freie vicinale OH-Gruppen: positiv. Die HCl-Spaltung ergab 5'-Amino-5'-desoxyguanosin (**1b**).

*N-(5'-Desoxy-5'-guanosyl)phosphorsäure-bis(p-nitrophenylester)-amid (5b4)*: 70 mg (0.25 mmol) gut getrocknetes 5'-Amino-5'-desoxyguanosin (**1b**) wurden — in einem 100-ml-Dreihalskolben mit Einleitungsrohr, Absaugvorrichtung und Vorratsgefäß mit Phosphorylierungsreagenz — in 35 ml absol. DMF suspendiert. Nach Zugabe von 65  $\mu$ l (0.38 mmol) Hünig-Base wurden innerhalb 1 h bei Raumtemp. 90 mg (0.25 mmol) Phosphorsäure-bis(p-nitrophenylester)-chlorid (**4**) hinzugefügt. Durch das Reaktionsgemisch wurde ein trockener Stickstoffstrom geleitet.

Der Ansatz wurde zusehends klarer und färbte sich schwach gelblich. Nach 3 h war der größte Teil desamins (**1b**) umgesetzt. Man ließ über Nacht rühren, dampfte zur Trockne ein, digerierte den Rückstand in 25 ml Chloroform und tröpfelte die gelartige Suspension in 100 ml Äther. Es fiel ein farbloser Niederschlag aus, der abfiltriert und mit Äther gewaschen wurde. Im Filtrat befand sich ausschließlich überschüssiges Phosphorylierungsreagenz. Den Rückstand löste man in wenigen ml DMF und isolierte das gesuchte Diesteramid **5b4** durch präparative Schichtchromatographie im System D.

Bei der Aufarbeitung zerfällt ein Teil der Substanz in das geladene Monoesteramid. Bei Durchführung des Versuches muß eine übermäßige Lichteinwirkung vermieden werden. Ausb. 30 mg (20%). Test auf p-Nitrophenyl: positiv. Test auf freie vicinale OH-Gruppen: positiv. Bei der HCl-Spaltung entstand das Amin **1b**.

*N-Butyl-N-(5'-desoxy-5'-guanosyl)phosphorsäure-diäthylester-amid (5c2)*: Zu einer Lösung von 85 mg (0.25 mmol) 5'-Butylamino-5'-desoxyguanosin (**1c**) in 50 ml Triäthylphosphat und 150  $\mu$ l Tri-n-butylamin tropften bei 0°C 100  $\mu$ l (0.75 mmol) Phosphorsäure-diäthylester-chlorid (**2**). Nach beendeter Zugabe ließ man bei Raumtemp. weiterrühren. Nach 3 h waren noch ca. 5% Amin **2** am Start.

Die Mischung wurde i. Hochvak. zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit Methanol aufgenommen. Die gesuchte Substanz **5c2** wurde durch präparative Schichtchromatographie im System D isoliert. Ausb. 90% (spektralphotometrisch bestimmt). Test auf vicinale freie OH-Gruppen: positiv. Bei der HCl-Spaltung entstand das Amin **1c**, nachgewiesen durch chromatographischen Vergleich und durch den Test auf sekundäre Amine.

*N-Butyl-N-(5'-desoxy-5'-guanosyl)phosphorsäure-diphenylester-amid (5c3)*: 85 mg (0.25 mmol) 5'-Butylamino-5'-desoxyguanosin (**1c**), in 50 ml Triäthylphosphat und 150  $\mu$ l Tri-n-butylamin gelöst, versetzte man bei Raumtemp. mit 110  $\mu$ l Phosphorsäure-diphenylester-chlorid und verfolgte dünnschichtchromatographisch den Umsatz. Nach 2 h waren 60%, nach 4 h etwa 80% desamins **1c** phosphoryliert. Man ließ über Nacht rühren, dampfte am nächsten Tag zur Trockne ein, nahm den Rückstand mit Methanol auf und trennte das Reaktionsgemisch

durch präparative Schichtchromatographie im System Chloroform/Methanol (85:15) auf. Ausb. 85% (spektralphotometrisch bestimmt). Test auf freie, vicinale OH-Gruppen: positiv. Bei der HCl-Spaltung entstand 5'-Butylamino-5'-desoxyguanosin (**1c**).

*N-Butyl-N-(5'-desoxy-5'-guanosyl)phosphorsäure-bis(p-nitrophenylester)-amid (5c4)*: 340 mg (1 mmol) 5'-Butylamino-5'-desoxyguanosin (**1c**) wurden i. Hochvak. über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> getrocknet und anschließend in 50 ml absol. DMF gelöst. Nach Zugabe von 200 µl Hünig-Base gab man zur klaren Lösung bei Raumtemp. portionsweise 456 mg (1.3 mmol) Phosphorsäure-bis(p-nitrophenylester)-chlorid (**4**). Die Mischung färbte sich goldgelb. Nach 4 h waren etwa 60% zum Diesteramid **5c4** umgesetzt.

Die restlichen 40% konnten durch chromatographischen Vergleich und durch Test auf sekundäre Amine als nicht umgesetztes Amin identifiziert werden. Die Lösung wurde eingengt und mit H<sub>2</sub>O/Essigester versetzt. Nach mehrmaligem Ausschütteln befand sich in der Wasserphase die Hauptmenge an überschüssigem Phosphorylierungsreagenz und in der Essigesterphase überwiegend das Diesteramid **5c4**, das durch anschließende Schichtchromatographie im System D rein erhalten wurde. Aus einer konzentrierten methanolischen Lösung kristallisiert **5c4** in kleinen Pusteln aus. Ausb. 285 mg (43%). Schmp. 183°C. Test auf vicinale freie OH-Gruppen: positiv. Test auf p-Nitrophenol: positiv. Bei der HCl-Spaltung entstand 5'-Butylamino-5'-desoxyguanosin (**1c**).

*Säurespaltung mit HCl*: Jeweils 10 OD der dargestellten Aminonucleotide **5a3**, **5a4**, **5b3**, **5b4**, **5c2**, **5c3**, **5c4** wurden mit 100 µl HCl/Methanol (1:1) über Nacht bei 45°C gehalten. Das Reaktionsgemisch wurde papierchromatographisch im System A aufgetrennt und die Amine **1b** und **1c** durch Vergleich mit authentischen Proben und durch Besprühen mit Ninhydrin bzw. Tüpfeln mit dem Nitroprussidnatrium-Acetaldehyd-Reagenz nachgewiesen.

*1:2-Komplex aus Phosphorsäure-bis(p-nitrophenylester)-chlorid (4) und Triäthylamin*: 220 mg **4** wurden in 750 µl Triäthylphosphat gelöst. Nach Zutropfen von 1 ml Triäthylamin bei 0°C fiel ein farbloser Niederschlag aus, der abfiltriert und mit Äther gewaschen wurde. Ausb. 240 mg (70%).

Der Komplex kann durch Methanol bzw. Wasser wieder zerlegt werden, was sich NMR-spektroskopisch nachweisen läßt: Aus den beiden Quartetts für je 6 Protonen der Methylengruppen entsteht ein Quartett für die 12 Protonen.

[270/72]