

Fritz Eckstein

## $\beta,\beta,\beta$ -Trichlor-äthanol als Phosphorsäureschutzgruppe für Nucleotide<sup>1)</sup>

Aus dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Chemische Abteilung, Göttingen  
(Eingegangen am 18. Januar 1967)

Die Synthese von 2'-Desoxy-nucleosid-5'-phosphorsäure- $[\beta,\beta,\beta$ -trichlor-äthylestern], ihre Stabilität und ihre Reduktion zu 2'-Desoxy-nucleosid-5'-phosphorsäuren wird beschrieben.

Zur Darstellung von Mononucleotiden aus Nucleosiden kondensiert man das zu phosphorylierende und entsprechend geschützte Nucleosid im allgemeinen mit Phosphorsäure- $[\beta$ -cyan-äthylester]<sup>2)</sup> in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid. Durch alkalische Behandlung kann die  $\beta$ -Cyanäthylgruppe nach erfolgter Kondensation wieder entfernt werden. Als Schutzgruppe für die OH-Gruppen des Riboserestes hat sich in der Nucleotidchemie die Acetylgruppe besonders bewährt. Da aber auch sie alkalilabil ist, dürfte eine selektive Abspaltung einer der beiden Schutzgruppen kaum möglich sein.

Wir waren zur Synthese von Oligodesoxynucleotiden aber an einer Phosphat-schutzgruppe interessiert, die unabhängig von einer anderen Schutzgruppe entfernt werden konnte, und die unter den Bedingungen der Oligonucleotidsynthese stabil ist.

Da die Alkalilabilität der  $\beta$ -Cyanäthylgruppe durch die Anwesenheit eines aktivierte  $\beta$ -H-Atoms, das eine  $\beta$ -Eliminierung des Phosphatrestes bewirkt, bedingt ist, suchten wir nach einem Alkohol, der ein solches H-Atom nicht trägt. *Cherbuliez* et al.<sup>3)</sup> fanden, daß der Phosphorsäure- $[\beta,\beta,\beta$ -trichlor-äthylester] im alkalischen Medium außerordentlich stabil ist. Eine Möglichkeit zur Abspaltung dieses Alkoholrestes zeigten *Faworsky* und *Jocitsch*<sup>4)</sup>: Zn-Staub in Methanol zersetzt  $\beta,\beta,\beta$ -Trichlor-äthylacetat augenblicklich zu  $\alpha,\alpha$ -Dichlor-äthylen. Auch *Woodward* et al.<sup>5)</sup> haben kürzlich von diesem Alkohol zum Schutz einer Carboxylgruppe Gebrauch gemacht.

Um die Verwendbarkeit von  $\beta,\beta,\beta$ -Trichlor-äthanol für unsere Zwecke zu untersuchen, stellten wir 2'-Desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure- $[\beta,\beta,\beta$ -trichlor-äthylester] (**1a**) her und prüften Stabilität und Abspaltbarkeit dieser Gruppe. In der nachfolgenden

<sup>1)</sup> Zum Teil vorgetragen auf der Hauptversammlung der Gesellschaft Deutscher Chemiker, 13.–18. 9. 1965, Bonn; vorläufige Mitteil.: *F. Eckstein*, *Angew. Chem.* **77**, 912 (1965); *Angew. Chem. internat. Edit.* **4**, 876 (1965).

<sup>2)</sup> *G. M. Tener*, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 159 (1961).

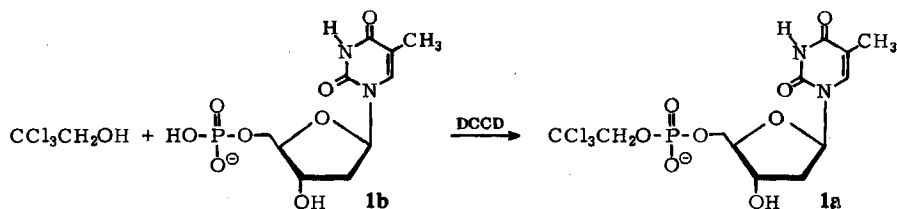
<sup>3)</sup> *E. Cherbuliez*, *A. Gabbai*, *H. Probst*, *A. Yazgi* und *J. Rabinowitz*, *Helv. chim. Acta* **45**, 2282 (1962).

<sup>4)</sup> *A. Faworsky* und *Ž. Jocitsch*, *J. russ. physik.-chem. Ges.* **30**, 998 (1899), *C. 1899 I*, 777.

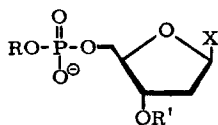
<sup>5)</sup> *R. B. Woodward*, Nobelvortrag, *Angew. Chem.* **78**, 557 (1966); *Science* **153**, 487 (1966).

Arbeit berichten wir über die Verwendung dieser Verbindung zur Synthese von Oligo-desoxynucleotiden mit endständiger 5'-Phosphatgruppe.

Wir synthetisierten **1a** durch Veresterung von **1b** mit  $\beta,\beta,\beta$ -Trichlor-äthanol in Gegenwart von DCCD.



Ein nicht wie **1a** als kristallisiertes Cyclohexylammoniumsalz zu gewinnendes Nebenprodukt, nach dem elektrophoretischen Verhalten ein Diester, haben wir nicht näher untersucht. Analoge Nebenprodukte traten auch bei den entsprechenden Umsetzungen mit den anderen Nucleotiden auf.



X = Thyminyl-

**1a**: R =  $\text{CCl}_3\text{CH}_2$  R' = H

**1b**: R = H R' = H

**1c**: R =  $\text{CCl}_3\text{CH}_2$  R' =  $\text{CH}_3\text{CO}$

**1d**: R = H R' =  $\text{CH}_3\text{CO}$

**1e**: R =  $\text{CCl}_3\text{CH}_2$  R' =  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$

**1f**: R = H R' =  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}$

X = Adenyl-

**2a**: R =  $\text{CCl}_3\text{CH}_2$  R' = H

**2b**: R = H R' = H

X = Guanyl-

**3a**: R =  $\text{CCl}_3\text{CH}_2$  R' = H

**3b**: R = H R' = H

X = Cytosyl-

**4a**: R =  $\text{CCl}_3\text{CH}_2$  R' = H

**4b**: R = H R' = H

Zur Prüfung der Stabilität unter den Kondensationsbedingungen setzten wir **1a** mit DCCD in Pyridin um. Im Gegensatz zu einem entsprechenden Versuch mit Thymidin-5'-phosphorsäure- $[\beta$ -cyan-äthylester]<sup>6)</sup> ist **1a** vollkommen stabil.

Auch unter den Bedingungen der Nucleotidkondensation mit Triisopropylbenzolsulfonylchlorid<sup>7)</sup> war keine Reaktion festzustellen. In konz. Ammoniak und in 1 *n* NaOH bei Raumtemp. konnte nach einer Stde. weder Hydrolyse noch Abspaltung von HCl zum Vinylphosphat, wie für Phosphorsäure-dibutylester- $[\beta,\beta,\beta$ -trichlor-äthylester] beschrieben<sup>8)</sup>, festgestellt werden. In 1 *n* NaOH bei 100° (1 Stde.) trat Hydrolyse zu ca. 40% Thymidin-5'-phosphorsäure ein. Unter sauren Bedingungen, 1 Stde. in 80-proz. Essigsäure bei 100°, war **1a** vollkommen stabil. Damit genügt diese Schutzgruppe unseren Stabilitätsanforderungen.

Um festzustellen, ob die  $\beta,\beta,\beta$ -Trichloräthyl-Schutzgruppe abgespalten werden kann, ohne daß Acetyl- oder Benzoylgruppen an der 3'-OH-Gruppe in Mitleidenschaft gezogen werden, haben wir die Verbindungen **1c** und **1e** dargestellt. Den zur Phosphorylierung von 3'-O-Acetyl-2'-desoxy-thymidin bzw. 3'-O-Benzoyl-2'-desoxy-thy-

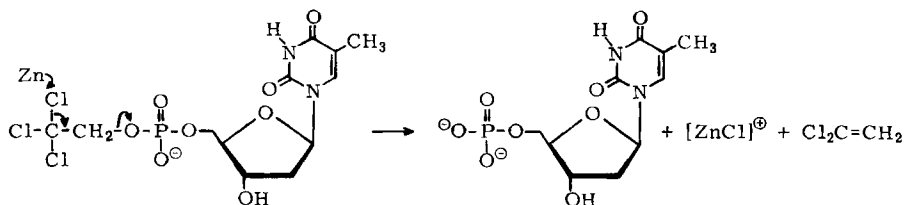
6) G. Weimann und H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. **84**, 419 (1962).

7) R. Lohrmann und H. G. Khorana, J. Amer. chem. Soc. **88**, 829 (1966).

8) F. W. Lichtenthaler, Chem. Reviews **61**, 618 (1961).

midin benötigten Phosphorsäure- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-}\alpha\text{-thylester}]^3)$  stellten wir nach der Trichloracetnitril-Methode<sup>9)</sup> dar. Die Kondensation mit den beiden Nucleosiden gelang wieder mit DCCD. **1c** wurde auch durch Veresterung von **1d** mit Trichlor- $\alpha$ -thanol dargestellt. **1c** und **1e** können durch Abspaltung der Hydroxyschutzgruppen in **1a** übergeführt werden.

Die Abspaltung der Trichloräthylgruppe nach der Methode von *Faworsky*<sup>4)</sup> führte in mehreren Lösungsmitteln nicht zum Ziel, ebensowenig eine Behandlung mit Mg, NaJ oder Raney-Nickel. Mit NaJ und Raney-Nickel trat zwar teilweise eine Reaktion ein, der neue Fleck auf dem Papierchromatogramm hatte aber einen kleineren  $R_F$ -Wert als **1b**, war also nicht das gewünschte Produkt. Erst die Aktivierung des Zinks nach *Le Goff*<sup>10)</sup> brachte den gewünschten Erfolg.



Bei **1a**, **1c** und **1e** konnte mit diesem aktivierten Zn/Cu-Paar in DMF (50°, 1 Stde.) und in 80-proz. Essigsäure (Raumtemp., 5 Stdn.) die Trichloräthylgruppe abgespalten werden.

In Methanol (Raumtemp., 5 Stdn.) verlief die Reduktion nur zu ca. 40%. Da sich bei dieser Reaktion die im Neutralen unlöslichen Zinksalze der Nucleotide bilden, ist es notwendig, beim Arbeiten in DMF und Methanol das Zink mit verdünnter Essigsäure nachzuwaschen, die man bei säurelabilen Nucleotiden sogleich in Pyridin eintropfen lassen kann. Als vollkommen stabil erwies sich nur die Benzoylgruppe beim Arbeiten in DMF oder Essigsäure. Die Acetylgruppe von **1c** wurde beim Arbeiten in diesen beiden Lösungsmitteln in geringem Ausmaß abgespalten. Da in allen Fällen die Abspaltung der Trichloräthylgruppe nie zu 100% verläuft, muß man anschließend chromatographisch trennen. Daß auch die anderen Desoxynucleotide die Abspaltung mit Zn/Cu überstehen, konnte mit **2a**, **3a** und **4a** gezeigt werden (Tab. 1).

Tab. 1. Ausbeuten bei der Abspaltung der Trichloräthyl-Schutzgruppe aus einigen Desoxynucleotiden durch Reduktion mit Zn/Cu

Ausgangsmaterial	Produkt	% Ausb. *)	
		in 85 proz. Essigsäure (Raumtemp., 5 Stdn.)	in DMF (50°, 1 Stde.)
<b>1a</b>	<b>1b</b>	85	85
<b>1c</b>	<b>1d</b>	85	90
	<b>1b</b>	4	5
<b>1e</b>	<b>1f</b>	95	90
	<b>1b</b>	0	0
<b>2a</b>	<b>2b</b>	—	65
<b>3a</b>	<b>3b</b>	76 **)	54
<b>4a</b>	<b>4b</b>	81 ***)	—

\*) Spektrophotometrisch bestimmt. \*\*) **3a** als Triäthylammoniumsalz eingesetzt. \*\*\*) Reaktionsdauer 1 Stde.

9) *F. Cramer* und *G. Weimann*, Chem. Ber. **94**, 996 (1961).

10) *E. Le Goff*, J. org. Chemistry **29**, 2048 (1964).

Herrn Prof. R. Olofson sei für Anregungen und Herrn Prof. F. Cramer darüber hinaus auch für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit gedankt.

Herrn G. Sievers danke ich für die geschickte Mitarbeit.

## Beschreibung der Versuche

Pyridin wurde über Calciumhydrid unter Rückfluß gekocht, destilliert und aufbewahrt. Alle Papierchromatogramme (Papier Schleicher & Schüll 2043 b, gewaschen) wurden absteigend entwickelt, entweder in System A = Äthanol/1 *m* Ammoniumacetat (7 : 3, v/v), System B = Äthanol/1 *m* Ammoniumacetat (8 : 2, v/v), oder System C = Propanol-(2)/konz. Ammoniak/Wasser (7 : 1 : 2, v/v). Elektrophoresen wurden auf dem gleichen Papier in Puffer pH 7.5 (0.1 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat) durchgeführt. Säulenchromatographien an DEAE-Cellulose wurden mit einem linearen Gradienten an Triäthylammoniumhydrogencarbonat (3l 0.125 *m* Triäthylammoniumhydrogencarbonat im Vorratsgefäß, 3l Wasser im Mischgefäß) ausgeführt. Es wurden 25-ccm-Fractionen gesammelt. Die NMR-Spektren wurden an einem Perkin-Elmer R 10 mit TMS als innerem Standard (= 10 ppm) aufgenommen. Zur Bestimmung der optischen Dichte wurde das Pyridiniumsalz durch Eindampfen mit konz. Ammoniak in das Ammoniumsalz übergeführt.

*5'-O-Trityl-3'-O-benzoyl-2'-desoxy-thymidin*: Zu 1.16 g *5'-O-Trityl-2'-desoxy-thymidin* (2 mMol) in 10 ccm absol. Pyridin wurden 5.16 g *Benzoessäureanhydrid* (20 mMol) in 15 ccm absol. Pyridin gegeben. Nach Aufbewahren über Nacht bei 50° wurden 20 ccm Methanol zugesetzt, 1 Stde. stehengelassen, zur Trockene eingedampft und anschließend an Kieselgel (0.05–0.20 mm, Merck) chromatographiert. Mit Benzol wurde das nicht umgesetzte Benzoesäureanhydrid eluiert, mit Chloroform/Methanol (1 : 1) das gewünschte Produkt. Ausb. 1.10 g (94%), Schmp. 184–186° (aus Äthanol).

UV (Methanol):  $\lambda_{\max}$  267 m $\mu$  ( $\epsilon$  = 9600).

C<sub>36</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> · C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (634.7) Ber. C 71.91 H 6.03 N 4.42 Gef. C 72.52 H 5.58 N 4.73

*3'-O-Benzoyl-2'-desoxy-thymidin*: 587 mg *5'-O-Trityl-3'-O-benzoyl-2'-desoxy-thymidin* (1 mMol) wurden mit 30 ccm 80-proz. *Essigsäure* 15 Min. auf 100° erhitzt. Die Lösung wurde nach Abkühlen in Eiswasser gerührt, der Niederschlag abfiltriert und dieser an einer präparativen Dickschichtplatte (Kieselgel PF 254 Merck) in Chloroform/Methanol (95 : 5) chromatographiert. Ausb. 220 mg (69%), Schmp. 96–100° (Aceton/Petroläther).

UV (Methanol):  $\lambda_{\max}$  267 m $\mu$  ( $\epsilon$  = 9600).

C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (346.3) Ber. C 58.96 H 5.24 N 8.08 Gef. C 59.25 H 5.60 N 8.02

*Phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]*: 3.75 ccm wäbr. 2 *m* *Orthophosphorsäure*-Lösung (7.5 mMol) und 3.15 ccm *Triäthylamin* (22.5 mMol) wurden zusammen zur Trockene eingedampft und durch mehrmalige Kodestillation mit absol. Pyridin getrocknet. Die Lösung des Rückstands in 15 ccm  $\beta,\beta,\beta$ -Trichlor-äthanol versetzte man unter Kühlung vorsichtig mit 15 ccm *Trichloracetonitril* und bewahrte 2.5 Stdn. bei 60–65° auf. Dann wurde das Trichloracetonitril i. Vak. so weit wie möglich entfernt, der Rückstand in 150 ccm Wasser und 150 ccm Äther aufgenommen und die Ätherphase mit 30 ccm Wasser extrahiert. Die vereinigten wäbr. Lösungen wurden zur Trockene eingedampft, der Rückstand unter Kühlung in 15 ccm 2 *n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aufgenommen, mit 5 × 100 ccm Äther extrahiert, die Ätherlösungen vereinigt, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand an freier Säure betrug 1.60 g (95%). Er wurde in wenig Äther gelöst, *Cyclohexylamin* zugegeben, bis kein weiterer Niederschlag ausfiel, im

Kühlschrank aufbewahrt und evtl. zur Vervollständigung der Fällung noch etwas Petroläther zugefügt. Aus 180 ccm Äthanol/Dioxan (1 : 1) Ausb. 1.54 g (46%) *Dicyclohexylammoniumsalz*, Schmp. 194–199°.

NMR (D<sub>2</sub>O): CH<sub>2</sub>CCl<sub>3</sub> d 5.78 ppm (*J* = 6.0 Hz).

2C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NH<sub>3</sub>]C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>4</sub>P · H<sub>2</sub>O (443.7) Ber. C 37.89 H 6.83 Cl 23.97 N 6.31 P 6.97  
Gef. C 37.30 H 6.90 Cl 23.75 N 5.99 P 7.38

*2'-Desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]* (**1a**): 3 mMol *2'-Desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure* (**1b**) (Pyridiniumsalz) wurden in 3 ccm absol. Pyridin und 6 ccm  $\beta,\beta,\beta$ -Trichlor-äthanol gelöst und 6.0 g *Dicyclohexylcarbodiimid* in 3 ccm absol. Pyridin zugegeben. Nach 20 Stdn. Schütteln wurden ca. 50 ccm 20-proz. wäbr. Pyridin zugegeben, mit Petroläther extrahiert, der Petroläther mehrere Male mit 20-proz. wäbr. Pyridin extrahiert, die Pyridinlösung mehrere Stdn. stehengelassen, dann zur Trockene eingedampft, der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen, die Lösung mit Wasser bis zur beginnenden Trübung versetzt und anschließend an einer DEAE-Cellulosesäule chromatographiert. In den Fraktionen 56–70 wurde ein nicht näher charakterisiertes Nebenprodukt, in den Fraktionen 71–100 **1a** eluiert. Ausb. 14400 Optical Density-Einheiten (267 m $\mu$ ) = 1.5 mMol (50%).

Die gesammelten Fraktionen wurden eingedampft, noch mehrere Male nach Versetzen mit Methanol zur Trockene gebracht und in das *Cyclohexylammoniumsalz* übergeführt (Merck I-Ionenaustauscher, Cyclohexylammoniumform); aus Aceton/Petroläther Ausb. 425 mg (26%), Schmp. 198–202°. Das nicht umkristallisierte Produkt ist für alle weiteren Umsetzungen rein genug. Bei der Elektrophorese (pH 7.5) lief das Produkt halb so weit wie **1b**.

UV (Wasser, pH 7.0):  $\lambda_{\max}$  267 m $\mu$  ( $\epsilon$  = 9600).

NMR (D<sub>2</sub>O): CH<sub>2</sub>CCl<sub>3</sub> d 5.50 ppm (*J* = 6.0 Hz).

C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NH<sub>3</sub>]C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>P (552.8) Ber. C 39.11 H 5.29 Cl 19.24 N 7.60 P 5.60  
Gef. C 39.12 H 5.43 Cl 19.10 N 7.47 P 5.55

*Stabilität von 1a (Cyclohexylammoniumsalz)*

a) In Gegenwart von 5 mg *Dicyclohexylcarbodiimid* blieben 5 · 10<sup>-3</sup> mMol **1a** in 0.1 ccm absol. Pyridin nach viertägigem Schütteln bei Raumtemp. unverändert; Extinktion bei 267 m $\mu$ , Papierchromatogramm in den Systemen A und B.

b) Auch 30 mg *2,4,6-Triisopropyl-benzolsulfonylchlorid* griffen 0.05 mMol **1a** in 1 ccm Pyridin/DMF (1 : 1) innerhalb von 8 Stdn. nicht an.

c) In 1 ccm 80-proz. *Essigsäure* zeigten 5 · 10<sup>-3</sup> mMol **1a** nach einer Stde. bei 100° im Papierchromatogramm (System A und C) ca. 1.5% *2'-Desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure* und 98.5% Ausgangsmaterial.

d) Aus 5 ccm *In NaOH* konnten 200 mg **1a** nach einer Stde. bei Raumtemp. durch Neutralisation mit Merck I-Ionenaustauscher (Pyridinform), Abdampfen und Überführen in das *Cyclohexylammoniumsalz* (Schmp. 198–203° aus Aceton/Petroläther) unverändert zurückgewonnen werden. Wurde die Lösung 1 Stde. bei 100° gehalten, so zeigte die papierchromatographische Analyse in System A und B 39% *2'-Desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure* und 61% Ausgangsmaterial an.

e) Auch die Lösung von 200 mg **1a** in 15 ccm konz. *Ammoniak* lieferte nach 2 Stdn. bei Raumtemp. das Ausgangsmaterial (Schmp. 198–203° aus Aceton/Petroläther) zurück, und das Papierchromatogramm (System B) zeigte keine Veränderung.

*3'-O-Acetyl-2'-desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]* (**1c**)

a) Aus *3'-O-Acetyl-2'-desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure* (**1d**): 0.2 mMol **1d** (Pyridiniumsalz), 0.2 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (1 mMol) und 0.1 ccm  $\beta,\beta,\beta$ -Trichlor-äthanol wurden in

2 ccm absol. Pyridin 3 Tage geschüttelt. Dann wurden 20 ccm 20-proz. wäbr. Pyridin zugegeben, mit Petroläther extrahiert, die wäbr. Phase mehrere Stdn. stehengelassen, zur Trockene eingedampft und der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen. Nach Chromatographie an einer präparativen Dickschichtplatte (Kieselgel PF 254 Merck, Chloroform/Methanol (6 : 4)) Ausb. 1530 OD-Einheiten (267 m $\mu$ ) (0.16 mMol, 80%). Dieses Produkt ist für alle weiteren Reaktionen rein genug. Nach Überführen in das *Cyclohexylammoniumsalz* an Merck I-Ionenaustauscher (Cyclohexylammoniumform) aus Aceton/Petroläther Schmp. 124–128°, Ausb. 35 mg (27%).

UV (Wasser, pH 7.0):  $\lambda_{\max}$  267 m $\mu$  ( $\epsilon = 9600$ ).

$C_6H_{11}NH_3]C_{14}H_{17}Cl_3N_2O_9P \cdot H_2O$  (612.8) Ber. C 39.25 H 5.43 Cl 17.38 N 6.86 P 5.01  
Gef. C 39.00 H 5.68 Cl 16.65 N 7.16 P 5.30

50 mg des Produktes wurden in 5 ccm konz. *Ammoniak* gelöst und nach 2 Stdn. eingedampft. Papierchromatographie in System B und C zeigte ein mit **1a** identisches Produkt.

b) Aus *3'-O-Acetyl-2'-desoxy-thymidin*: Eine Lösung von 56 mg *3'-O-Acetyl-2'-desoxy-thymidin* (0.21 mMol) und 0.5 mMol *Phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]* (Pyridiniumsalz) in ca. 1 ccm absol. Pyridin wurde durch mehrmaliges Eindampfen mit absol. Pyridin wasserfrei gemacht, der Rückstand in 3 ccm absol. Pyridin nach Zugabe von 206 mg *Dicyclohexylcarbodiimid* (1.0 mMol) 3 Tage geschüttelt. Dann wurden ca. 20 ccm 20-proz. wäbr. Pyridin zugegeben, mit Petroläther extrahiert und die wäbr. Phase mehrere Stdn. stehengelassen. Nach Eindampfen wurde, wie unter a) beschrieben, weitergearbeitet. Ausb. 1820 OD-Einheiten (267 m $\mu$ ) (0.19 mMol, 90%), mit dem unter a) gewonnenen Produkt papierchromatographisch (System B) identisch.

c) Aus *2'-Desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]* (**1a**): 200 mg **1a** (Cyclohexylammoniumsalz) wurden in das Pyridiniumsalz übergeführt, durch mehrmaliges Eindampfen mit absol. Pyridin getrocknet und in 2 ccm Pyridin und 1 ccm *Acetanhydrid* über Nacht bei Raumtemp. aufbewahrt. Dann wurde zur Trockene eingedampft, in 50-proz. wäbr. Pyridin aufgenommen und nach 1.5 Stdn. wieder zur Trockene eingedampft. Nach wiederholtem Einengen mit Wasser war das Produkt papierchromatographisch (System B) einheitlich und mit dem unter a) gewonnenen identisch. Nach Überführen in das Cyclohexylammoniumsalz (Merck I-Ionenaustauscher) aus Aceton/Petroläther Schmp. 124–128°.

*3'-O-Benzoyl-2'-desoxy-thymidin-5'-phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]* (**1e**): In eine Lösung von 380 mg *3'-O-Benzoyl-2'-desoxy-thymidin* (1.1 mMol) und 2.9 mMol *Phosphorsäure-[\beta,\beta,\beta-trichlor-äthylester]* (Pyridiniumsalz) in 12 ccm absol. Pyridin wurden 1.16 g *Dicyclohexylcarbodiimid* (5.6 mMol) gegeben. Nach 3 tägigem Schütteln wurden ca. 50 ccm 20-proz. wäbr. Pyridin zugegeben, mit Petroläther extrahiert, die wäbr. Phase mehrere Stdn. stehengelassen, dann zur Trockene eingedampft, der Rückstand in Methanol aufgenommen und auf einer präparativen Dickschichtplatte (Kieselgel PF 254 Merck) erst in Chloroform/Methanol (9 : 1), anschließend in Chloroform/Methanol (7 : 3) chromatographiert. Ausb. 8000 OD-Einheiten (267 m $\mu$ ) (0.84 mMol, 76%). Dieses Produkt ist für alle weiteren Umsetzungen rein genug. Zur Überführung in das Cyclohexylammoniumsalz wurde die Substanz über Merck I-Ionenaustauscher (Cyclohexylammoniumform) gegeben und mit Wasser/Methanol (1 : 1) eluiert. Beim Eindampfen des Eluats kristallisierte das gewünschte Produkt aus. Ausb. 340 mg (47%), Schmp. 236–238°.

UV (Wasser, pH 7.0):  $\lambda_{\max}$  267 m $\mu$  ( $\epsilon = 9600$ ).

$C_6H_{11}NH_3]C_{19}H_{19}Cl_3N_2O_9P$  (656.9) Ber. C 45.71 H 5.64 Cl 16.19 N 6.39 P 4.71  
Gef. C 45.70 H 5.20 Cl 15.73 N 6.72 P 4.53

Zu 20 mg des Produktes in 2 ccm Methanol wurden bei 0° 3 ccm 2*n* NaOH gegeben und 10 Min. bei 0° stehengelassen. Mit Merck I-Ionenaustauscher (Pyridiniumform) wurde neutralisiert und das Filtrat mit Äther extrahiert. Papierchromatographie der wäßr. Lösung in System B und C zeigte nur **1a**.

2'-Desoxy-adenosin-5'-phosphorsäure- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-}\alpha\text{-thylester}]$  (**2a**): 3 mMol 2'-Desoxy-adenosin-5'-phosphorsäure (**2b**) (Pyridiniumsalz) wurden in 25 ccm absol. Pyridin und 7.5 ccm Acetanhydrid bis zur Lösung gerührt (ca. 6 Stdn.) und weitere 10 Stdn. aufbewahrt. Dann wurden 50 ccm Wasser unter Eiskühlung zugegeben, nach 1.5 Stdn. eingedampft, mit Wasser mehrere Male zur Vertreibung der Essigsäure destilliert und anschließend durch wiederholtes Eindampfen mit absol. Pyridin getrocknet.

Die so erhaltene 3'-O,N<sup>6</sup>-Diacetyl-2'-desoxy-adenosin-5'-phosphorsäure wurde mit  $\beta,\beta,\beta\text{-Trichlor-}\alpha\text{-thanol}$ , wie bei der Darstellung von **1a** beschrieben, verestert. Vor dem Aufgeben auf die DEAE-Cellulosesäule wurden jedoch durch 4stdg. Behandlung mit ca. 50 ccm konz. Ammoniak die Acetylgruppen abgespalten. Ein nicht näher untersuchtes Nebenprodukt war in den Fraktionen 84–87 enthalten, das gewünschte Produkt in den Fraktionen 96–112. Ausb. 26800 OD-Einheiten (259 m $\mu$ ) (1.77 mMol, 58%).

Das Eluat wurde zur Trockene eingedampft und mit Methanol mehrere Male zum Vertreiben des Puffers eingengt. Das so erhaltene Triäthylammoniumsalz wurde in das Cyclohexylammoniumsalz übergeführt, dieses in wenig Methanol gelöst und in ca. 250 ccm Äther eingetropf. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert. Ausb. 0.90 g, Schmp. 124–128°. Bei der Elektrophorese (pH 7.5) lief das Produkt halb so weit wie **2b**.

UV (Wasser, pH 7.0):  $\lambda_{\text{max}}$  260 m $\mu$  ( $\epsilon = 15200$ ).

C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NH<sub>3</sub>]C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>P·2H<sub>2</sub>O (597.8) Ber. C 36.15 H 5.39 Cl 17.79 N 14.05 P 5.18  
Gef. C 36.67 H 5.50 Cl 18.36 N 14.10 P 4.96

2'-Desoxy-guanosin-5'-phosphorsäure- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-}\alpha\text{-thylester}]$  (**3a**): Darstellung analog **2a**. Bei der Säulenchromatographie wurde ein Nebenprodukt in den Fraktionen 68–80 aufgefangen. **3a** war in den Fraktionen 81–104 enthalten. Ausb. 30000 OD-Einheiten (252 m $\mu$ ) (2.18 mMol, 73%). Dieses Produkt ist für alle weiteren Untersuchungen rein genug.

Nach Überführung in das Cyclohexylammoniumsalz mit Merck I-Ionenaustauscher (Cyclohexylammoniumform) wurde aus Aceton/Methanol/Petroläther umkristallisiert. Ausb. 475 mg (27%), Schmp. 172–176°. Bei der Elektrophorese (pH 7.5) lief das Produkt halb so weit wie **3b**.

UV (Wasser, pH 7.0):  $\lambda_{\text{max}}$  252 m $\mu$  ( $\epsilon = 13700$ ).

C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NH<sub>3</sub>]C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>P·H<sub>2</sub>O (595.8) Ber. C 36.13 H 5.05 Cl 17.78 N 14.05 P 5.17  
Gef. C 36.62 H 5.36 Cl 16.70 N 14.05 P 4.89

2'-Desoxy-cytidin-5'-phosphorsäure- $[\beta,\beta,\beta\text{-trichlor-}\alpha\text{-thylester}]$  (**4a**): 10 mMol 2'-Desoxy-cytidin-5'-phosphorsäure (**4b**) wurden nach Khorana<sup>11)</sup> acetyliert und das acetylierte Produkt analog der für **2a** angegebenen Darstellung verestert. In den Fraktionen 64–91 war ein Nebenprodukt enthalten, in den Fraktionen 92–108 **4a**. Ausb. 44 mMol (44%) (40000 OD).

Nach Überführung in das Cyclohexylammoniumsalz mit Merck I-Ionenaustauscher (Cyclohexylammoniumform) wurde in etwas Methanol gelöst und in Äther eingetropf. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert. Ausb. 1.95 g (35%). Bei der Elektrophorese (pH 7.5) lief das Produkt halb so weit wie **4b**.

UV (Wasser, pH 7.0):  $\lambda_{\text{max}}$  271 m $\mu$  ( $\epsilon = 9100$ ).

C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NH<sub>3</sub>]C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>3</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>P·H<sub>2</sub>O (556.8) Ber. C 36.60 H 5.60 Cl 19.07 N 10.05 P 5.53  
Gef. C 36.80 H 5.79 Cl 19.21 N 9.78 P 5.54

<sup>11)</sup> H. G. Khorana und J. P. Vizolyi, J. Amer. chem. Soc. **83**, 675 (1961).

*Abspaltung der Trichloräthylgruppe, allgemeine Vorschrift*

a) *In Essigsäure*: 500 OD-Einheiten des 2'-Desoxy-nucleosid-5'-phosphorsäure-[ $\beta,\beta,\beta$ -trichlor-äthylesters] (Pyridiniumsalz) wurden in 5 ccm 80-proz. Essigsäure mit ca. 500 mg aktiviertem Zn/Cu versetzt und 5 Stdn. bei Raumtemp. geschüttelt. Danach wurde abfiltriert, mit Wasser nachgewaschen und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde über einen Merck I-Ionenaustauscher (saure Form, bei **2a** und **3a** jedoch Pyridiniumform) gegeben, mit Wasser (bei **2a** mit 20-proz. wäßr. Pyridin) eluiert, die Ausb. spektrophotometrisch bestimmt und das Eluat mit Pyridin zur Trockene eingedampft. Ausb. 95—100 %, lediglich bei den Reaktionen mit **2a** und **3a** in DMF ca. 85 %. Die Ausb. an Desoxynucleosid-5'-phosphorsäure im Reaktionsgemisch wurde durch Papierchromatographie in System A oder C bestimmt. Die UV-aktiven Flecken wurden ausgeschnitten, mit Wasser/Methanol (1 : 1) eluiert und die Konzentration spektrophotometrisch ermittelt. Die Werte sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Die so erhaltenen Nucleotide waren papierchromatographisch und elektrophoretisch identisch mit authent. Material.

b) *In DMF*: 500 OD-Einheiten des 2'-Desoxy-nucleosid-5'-phosphorsäure-[ $\beta,\beta,\beta$ -trichlor-äthylesters] (Pyridiniumsalz) in 5 ccm DMF wurden mit ca. 500 mg aktiviertem Zn/Cu versetzt und 1 Stde. bei 50° geschüttelt. Danach wurde abfiltriert, mit verd. Essigsäure gewaschen und zur Trockene eingedampft. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter a).

Tab. 2.  $R_F$ -Werte bei der Papierchromatographie

Substanz	System		
	A	B	C
<b>1b</b>	0.35		0.28
<b>1a</b>	0.80	0.67	0.85
<b>1d</b>	0.46		
<b>1c</b>	0.84	0.75	
<b>1f</b>	0.56		
<b>1e</b>	0.85	0.81	
<b>2b</b>	0.21		0.27
<b>2a</b>	0.75		0.77
<b>3b</b>	0.16		0.16
<b>3a</b>	0.68		0.73
<b>4b</b>	0.21		0.27
<b>4a</b>	0.75		0.73

[31/67]