

Gerhard Etzold, Rainer Hintsche und Peter Langen

Anomere Thymin-nucleoside der 2-Desoxy-D-ribose¹⁾ und 2-Desoxy-L-ribose²⁾

Aus dem Institut für Biochemie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch

(Eingegangen am 8. Juli 1967)

D- und L-1-Chlor-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-ribose (1 und 8) reagieren mit Monoquecksilberthymin (5) zu den entsprechenden anomeren Thymin-N-1-nucleosiden (α -2/ β -2 und α -9/ β -9). Die Perjodatoxydation der Nucleoside führt zu spiegelbildisomeren Nucleosidialdehyden (6, 7). Die Anomerenpaare gehorchen nicht den Hudsonschen Isorotationsregeln. β -9 ist ein starker Hemmstoff der Uridin-Desoxyuridin-Phosphorylase aus Ascites-Tumorzellen.

Nucleoside mit Pyranose-Struktur des Zuckers galten bis zur Auffindung der Hemmwirkung von 1-[2-Desoxy-D-glucopyranosyl]-thymin auf die Uridin-Desoxyuridin-Phosphorylase (E.C. 2.4.2.3) *in vitro*^{3,4)} und *in vivo*^{5,6)} als biochemisch unwirksam. Die Prüfung weiterer Thymin-nucleoside ergab, daß neben der Pyranose-Struktur die 2'-Desoxy-Gruppierung³⁾ und die Konfiguration der OH-Gruppen am Lactolring⁷⁾ eine entscheidende Rolle für die Affinität zum Enzym spielen. Für diese Struktur-Wirkungsvergleiche haben wir die bisher unbekanntenen Thymin-N-1-nucleoside der 2-Desoxy-D-ribose und 2-Desoxy-L-ribose (D- und L-2-Desoxy-erythro-pentose) benötigt, über deren Darstellung und Charakterisierung im folgenden berichtet wird.

Pyrimidin-nucleoside von 2-Desoxy-pentapyranosen sind unseres Wissens von anderer Seite bisher noch nicht beschrieben worden. Mitteilungen über die Synthese der anomeren 1-[2-Desoxy-D-xylopyranosyl]-thymine aus Monoquecksilberthymin bzw. Bis-trimethylsilylthymin mit 1-Chlor-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-D-xylose⁸⁾ und der anomeren 1-[2-Desoxy-D-ribosepyranosyl]-thymine aus Bis-trimethylsilylthymin und 1-Chlor-3,4-bis-O-[p-nitro-benzoyl]-2-desoxy-D-ribose⁹⁾ befinden sich in Vorbereitung.

Die Darstellung der hier beschriebenen Thymin-nucleoside erfolgte nach dem Quecksilberverfahren von Fox et al.¹⁰⁾. Als Zuckerkomponenten dienten 1-Chlor-

1) Vorläuf. Mitt.: G. Etzold und P. Langen, *Naturwissenschaften* **53**, 178 (1966).

2) R. Hintsche, Dissertat., Univ. Leipzig, in Vorbereitung.

3) P. Langen und G. Etzold, *Biochem. Z.* **339**, 190 (1963).

4) G. Etzold und P. Langen, *Chem. Ber.* **98**, 1988 (1965).

5) P. Langen und G. Etzold, *Mol. Pharmacol.* **2**, 89 (1966).

6) P. Langen und G. Etzold, *Acta biol. med. german.* **17**, K1 (1966).

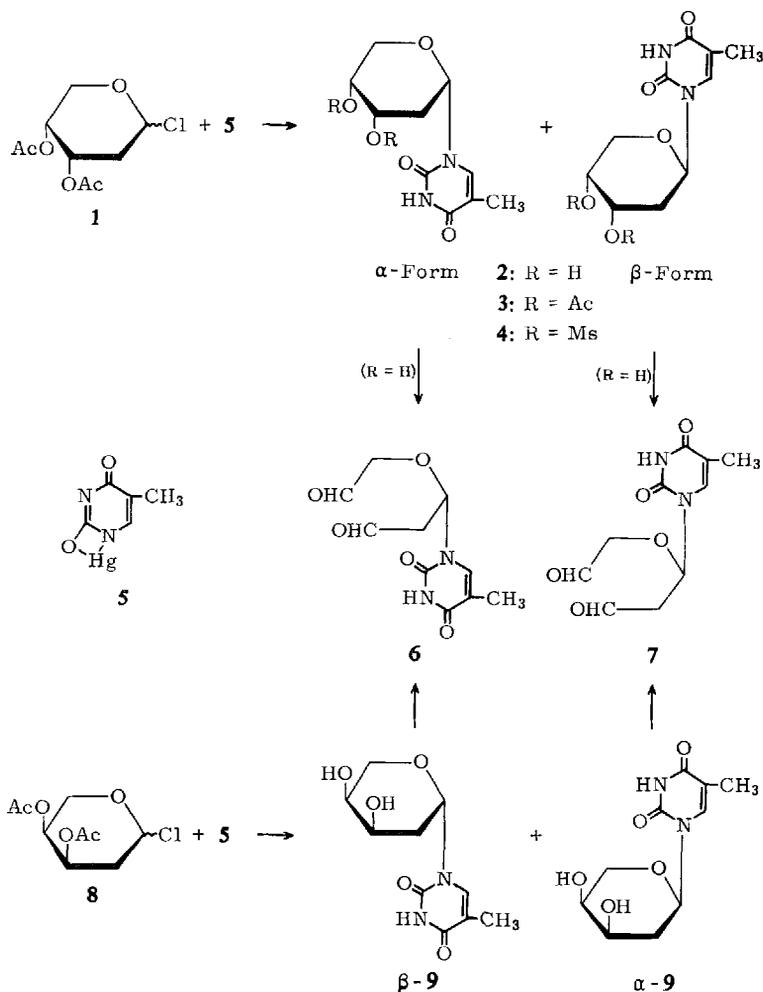
7) G. Etzold, B. Preussel und P. Langen, *Mol. Pharmacol.*, im Druck.

8) E. Wittenburg, G. Etzold und P. Langen, *Chem. Ber.*, im Druck.

9) E. Wittenburg, in Vorbereitung.

10) Vgl. J. J. Fox und I. Wempfen, *Advances Carbohydrate Chem.* **14**, 328 (1959).

3,4-di-*O*-acetyl-2-desoxy-D-ribofuranose (**1**) und das entsprechende L-Derivat (**8**). Beide Halogenosen wurden durch Addition von Chlorwasserstoff an 3,4-Di-*O*-acetyl-D-arabinal bzw. -L-arabinal in Benzol erhalten und ohne Isolierung zur Kondensation eingesetzt. Da Quecksilberpyrimidine mit einem Verhältnis von Quecksilber zu Pyrimidin wie 1:1 leichter mit Halogenosen reagieren als Pyrimidinquecksilberchloride oder Dipyrimidylquecksilber-Derivate¹¹⁻¹³, wurde als Pyrimidinkomponente Monoquecksilberthymin (**5**) verwendet. **5** kommt aus sterischen Gründen wahrscheinlich eine polymere Struktur zu¹⁴.



Ac = Acetyl, Ms = Methansulfonyl

11) J. J. Fox, N. C. Yung, I. Wempen und I. L. Doerr, J. Amer. chem. Soc. **79**, 5060 (1957).

12) M. Hoffer, Chem. Ber. **93**, 2777 (1960).

13) J. J. Fox, N. C. Yung, I. Wempen und M. Hoffer, Chem. Ber. **83**, 4066 (1961).

14) T. L. V. Ulbricht und G. T. Rogers, J. chem. Soc. [London] **1965**, 6130.

Bei der Umsetzung von **1** bzw. **8** mit **5** in Dimethylformamid bei Raumtemperatur entstehen in glatter Reaktion die acetylierten Anomeren des 1-[2-Desoxy-D-ribo-pyranosyl]-thymins (α -**2**, β -**2**) bzw. 1-[2-Desoxy-L-ribo-pyranosyl]-thymins (α -**9**, β -**9**). Die rohen Kondensationsgemische werden ohne Reinigung mit methanolischem Ammoniak entacetyliert. Durch Verteilungschromatographie an Celite erhält man die anomeren Nucleoside α -**2** und β -**2** bzw. α -**9** und β -**9** in reiner Form.

Die Ausbeute beträgt in der D-Reihe (α -**2**/ β -**2**) 30%, in der L-Reihe (α -**9**/ β -**9**) 60% (bezogen auf **5**). In beiden Fällen entstehen die Anomeren im Verhältnis 1:1. Das gleiche Anomerenverhältnis wird auch bei der analogen Synthese des 1-[2-Desoxy-D-xylopyranosyl]-thymins gefunden⁸⁾. Dagegen fallen α - und β -1-[2-Desoxy-D-gluco-pyranosyl]-thymidin unter gleichen Kondensationsbedingungen im Verhältnis 2:1 an⁴⁾, und auch bei der analogen Darstellung von α - und β -Thymidin überwiegt die α -Form¹²⁾. Das Vorliegen einer endständigen acylierten CH₂OH-Gruppe in der Desoxyzucker-Komponente begünstigt demnach unter den hier gewählten Kondensationsbedingungen die Bildung der α -Anomeren.

Neben α -**2**/ β -**2** bzw. α -**9**/ β -**9** entsteht bei der Kondensation ein nicht näher untersuchtes Gemisch von zwei weniger polaren Nucleosiden, die nach dem UV-Spektrum ebenfalls Thymin-N-1-glykoside sein müssen. Produkte mit gleichen (D-Reihe) bzw. ähnlichen *R_f*-Werten (L-Reihe) wurden auch bei der Umsetzung von roher 1-Chlor-3.4-di-O-acetyl-2-desoxy-D-xylose (aus Diacetylxytal und HCl) mit Monoquecksilberthymidin oder Bis-trimethylsilyl-thymin erhalten⁸⁾. Dagegen wurden bei der Verwendung von 1-Chlor-3.4-bis-[*p*-nitrobenzoyl]-2-desoxy-D-ribose (aus 1.3.4-Tris-O-[*p*-nitrobenzoyl]-2-desoxy-D-ribofuranose und HCl) diese Verbindungen nicht beobachtet⁹⁾. Offenbar ist die HCl-Addition an Diacetyl-D- und -L-arabinal nur in geringem, die an Diacetyl-D-xytal dagegen in hohem Maße von Umlagerungen zu weniger polaren, aber weiterhin kupplungsfähigen Zucker-Derivaten begleitet.

α -**2** und β -**2** sowie α -**9** und β -**9** zeigen im sauren und alkalischen Bereich das für Thymin-N-1-nucleoside charakteristische UV-Spektrum mit einem Maximum bei 265 nm. Mit Acetanhydrid in Pyridin liefern α -**2** und β -**2** in guter Ausbeute die entsprechenden 3'.4'-Di-O-acetate (α -**3** und β -**3**), mit Methansulfochlorid die 3'.4'-Dimesyl-Derivate (α -**4** und β -**4**).

Die anomere Konfiguration der beschriebenen Nucleoside konnte — wie in der furanoiden Reihe¹⁵⁾ — auf chemischem Wege bewiesen werden: a) Das Dimesyl-Derivat β -**4** läßt sich durch Erhitzen in gepufferter wäßriger Lösung in ein O².3'-Cyclo-nucleosid überführen, während α -**4** nicht reagiert¹⁶⁾. b) Von den cyclischen 3'.4'-O-Carbonaten von α -**2** und β -**2** bzw. α -**9** und β -**9** lassen sich ebenfalls nur die beiden β -Formen in O².3'-Cyclo-nucleoside überführen^{16,17)}. Diese Brückenbildung beruht auf einer S_N2-Reaktion der Oxo-Gruppierung am C-2 des Pyrimidinringes mit dem C-3' des Zuckerrestes. Nach den Atommodellen ist dieser Reaktionsverlauf nur bei β -Konfiguration möglich.

Bei der optischen Rotationsdispersion zeigt α -**2** einen negativen, β -**2** einen positiven Cotton-Effekt. α - und β -1-[2-Desoxy-D-xylopyranosyl]-thymidin verhalten sich analog⁸⁾.

¹⁵⁾ A. M. Michelson, The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, S. 15, Academic Press, London 1963.

¹⁶⁾ G. Etzold, R. Hintsche und P. Langen, XXI. IUPAC-Kongreß in Prag 1967, Section Chemistry of Nucleic Acid Components, Abstracts of Papers, N-29.

¹⁷⁾ G. Etzold, R. Hintsche und P. Langen, Tetrahedron Letters [London], im Druck.

Mit Ausnahme der anomeren 1-D-Glucopyranosyl-thymine, die beide einen positiven Cotton-Effekt geben¹⁸⁾, zeichnet sich demnach bei *pyranoiden* Pyrimidin-nucleosiden ein ähnlicher Zusammenhang zwischen dem Vorzeichen des Cotton-Effektes und der anomeren Konfiguration ab, wie er für alle bisher untersuchten einfachen *furanoiden* Pyrimidin-nucleoside gefunden wurde^{18, 19)}.

Entgegen den Hudsonschen Isorotationsregeln ist in Wasser β -2 rechtsdrehend ($[\alpha]_D^{20}$: +27.0°) und α -2 linksdrehend ($[\alpha]_D^{20}$: -46.6°). Die entsprechenden Anomeren der α -Reihe, β -9 ($[\alpha]_D^{20}$: -27.4°) und α -9 ($[\alpha]_D^{20}$: +46.9°), besitzen erwartungsgemäß die gleichen Drehwerte mit entgegengesetzten Vorzeichen.

Soweit bei der Chromatographie an Celite, Kieselsigel oder Cellulose mit organischen Fließmitteln eine Trennung erfolgt, wandern die β -Formen von 2, 3, 4 und 9 stets schneller als die entsprechenden α -Formen (s. Tab. 1). Die Anomeren des 1-[2-Desoxy-D-xylopyranosyl]-thymins verhalten sich dagegen umgekehrt⁸⁾. Demzufolge hängt die Polarität dieser 2'-Desoxy-pentapyranoside vor allem von der räumlichen Stellung des Thyminrestes zur OH-Gruppe an C-3' ab (*cis* polarer als *trans*). Ein Zusammenhang zwischen der Polarität dieser Verbindungen und ihrer biochemischen Wirksamkeit konnte nicht festgestellt werden.

Perjodatoxydation

Da bei der Perjodatoxydation von 2-Desoxy-zuckern und ihren pyranoiden Glykosiden mit Überoxydation²⁰⁾ und Nebenreaktionen bei der jodometrischen Bestimmung²¹⁾ zu rechnen ist, wurde der Perjodatverbrauch der Nucleoside sowohl jodometrisch als auch spektroskopisch bestimmt. In Übereinstimmung mit Beobachtungen von *Overend* et al.²¹⁾ reagieren die bei der Oxydation gebildeten „Nucleosid-dialdehyde“ bei der üblichen jodometrischen Bestimmung des überschüssigen Perjodats rasch mit dem aus KJ freigesetzten Jod (bis zu 2.6 Äquivv.), wodurch ein überhöhter Perjodatverbrauch vorgetäuscht wird (s. Versuchsteil). Wird dagegen die Jodierungsreaktion durch sofortige Titration des Jods nach der Freisetzung unterbunden, so findet man für α -2, β -2, α -9 und β -9 einen Verbrauch von 1.1–1.2-Moläquivalenten Perjodat. Die UV-spektroskopische Bestimmung der Perjodatkonzentration bei 300 nm ergibt einen Verbrauch von 1.0 Moläquivalent.

Wie aus der Abbild. hervorgeht, wird β -2 etwa doppelt so schnell oxydiert wie α -2. β -9 und α -9 verhalten sich analog. Beide Anomerenpaare werden wesentlich langsamer gespalten als Uridin.

Zwischenprodukt der Perjodatoxydation ist ein cyclischer Perjodsäurediester, in dem die ursprünglichen OH-Gruppen an C-3'/C-4' mehr koplanar angeordnet sind²²⁾. Der dafür benötigte Energieaufwand sollte – eine ideale Sesselform vorausgesetzt – für die C1- und 1C-Konformation gleich groß sein, da in beiden Sesselformen die benachbarten OH-Gruppen axial-äquatorial zueinanderstehen²³⁾. Die geringere Oxydationsgeschwindigkeit von α -2

18) I. Frič, J. Šmejkal und J. Farkaš, *Tetrahedron Letters* [London] **1966**, 75.

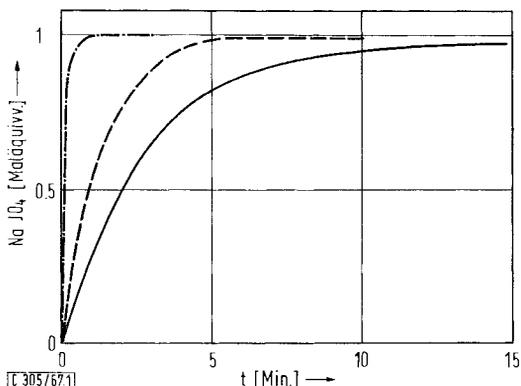
19) T. R. Emerson, R. J. Swan und T. L. V. Ulbricht, *Biochemistry* **6**, 843 (1967).

20) P. Szabó, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. **262**, 1103 (1966).

21) A. J. Cleaver, A. B. Foster, E. J. Hedgley und W. G. Overend, *J. chem. Soc.* [London] **1959**, 2578.

22) J. Honeyman und C. J. G. Shaw, *J. chem. Soc.* [London] **1959**, 2454.

23) Nach NMR-Untersuchungen von T. L. V. Ulbricht an Proben von α -2 und β -2 sollen die Anomeren in verschiedenen Konformationen vorliegen. Vgl. dazu i. c. ¹⁹⁾, und zwar S. 849.



Geschwindigkeit der Perjodatoxydation von α -2 (·-·-), β -2 (- - -) und Uridin (—) in 0.005 m NaJO₄ (UV-spektroskopische Bestimmung)

dürfte daher auf einer — besonders in der C1-Konformation ausgeprägten — sterischen Hinderung der Reaktion durch den sperrigen Thyminrest beruhen. Ähnliche Unterschiede in der Geschwindigkeit der Perjodatoxydation von anomeren Nucleosiden wurden z. B. bei verschiedenen *N*-Glykosiden des Benzimidazols festgestellt²⁴⁾.

Die bei der Perjodatoxydation von α -2 und β -9 bzw. β -2 und α -9 gebildeten Dialdehyde **6** bzw. **7** besitzen nur noch ein Asymmetriezentrum (C-1') und haben als optische Antipoden eine gleichgroße spezifische Drehung mit entgegengesetztem Vorzeichen (Tab. 2). Da für β -2 und β -9 die Konfiguration an C-1' auf chemischem Wege bewiesen wurde^{16,17)}, genügt für die eindeutige Zuordnung aller 1-[2-Desoxy-pentapyranosyl]-thymine zur α - oder β -Reihe die Bestimmung der optischen Drehung der nach der Perjodatoxydation erhaltenen Dialdehyde. Auf diese Weise konnte die Konfiguration der anomeren 1-[2-Desoxy-D-xylopyranosyl]-thymine an C-1' bestimmt werden^{8,16)}.

Biochemische Wirksamkeit

β -9 ist ein starker Hemmstoff der Uridin-Desoxyuridin-Phosphorylase (EC. 2.4.2.3) aus *Ehrlich*-Ascites-Tumorzellen. Seine Wirksamkeit entspricht der von 1-[2-Desoxy- β -D-glucopyranosyl]-³⁾ und 1-[2-Desoxy- β -D-xylopyranosyl]-thymine⁷⁾. α -9 zeigt keine Hemmwirkung. α -2 und β -2 haben sich diesem Enzym gegenüber ebenfalls als unwirksam erwiesen^{1,7)}.

Herrn Professor Dr. K. Repke danken wir für die ständige Förderung dieser Arbeit. Herrn Dr. T. L. V. Ulbricht, London, sind wir für die Aufnahme der ORD-Spektren und Herrn Dr. J. Malur für die Messung der UV-Spektren zu Dank verpflichtet.

²⁴⁾ H. Bräuniger und A. Koine, Arch. Pharmaz. **296**, 669 (1963); ebenda **298**, 641 (1965).

Beschreibung der Versuche

Die *Schmelzpunkte* wurden auf dem Mikroheiztisch nach Boëtius (korr. Werte) und die *optischen Drehungen* im 10-cm-Rohr visuell mit dem Kreispolarisimeter von Schmidt & Haensch bestimmt. Die *UV-Spektren* wurden mit dem selbstregistrierenden Spektralphotometer Beckman DK-2 aufgenommen. Der Nucleosidgehalt in den Eluatzen der Säulenchromatographie wurde durch kontinuierliche Aufzeichnung der UV-Absorption bei 254 nm mit dem Uvicord II (LKB-Produkte, Stockholm) verfolgt.

Fließmittelsysteme zur Chromatographie

A = wassergesättigter Essigester/Methanol (94 : 6)

B = Methyläthylketon/Isopropylalkohol/konz. Ammoniak (5 : 1 : 1)

C = Essigester/Isopropylalkohol/Essigsäure/Wasser (8 : 1 : 2 : 2)

D = Essigester/Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser (4 : 2 : 1 : 2)

E = Essigester/Isopropylalkohol/Wasser (12 : 1 : 6)

Dünnschichtchromatographie: Aufsteigend auf 0.25-mm-Schichten von Kieselgel HF₂₅₄ nach Stahl (E. Merck, Darmstadt), aktiviert bei 110°, oder Cellulosepulver MN 300 (Macherey, Nagel & Co., Düren, Westf.) bei Raumtemperatur unter Kammersättigung. Die Substanzen wurden durch Fluoreszenzlöschung im UV-Licht oder durch Besprühen mit konz. Schwefelsäure lokalisiert.

Tab. 1. *R_F*-Werte

Nucleosid	Kieselgel HF ₂₅₄			Cellulose D
	Fließmittel: A	B	C	
α -2	0.24	0.21	0.50	0.41
β -2	0.34	0.27	0.56	0.50
α -3	0.71	0.49	0.86	0.94
β -3	0.72	0.60	0.86	0.94
α -4	0.65	0.39	0.84	0.93
β -4	0.67	0.49	0.84	0.93
α -9	0.23	0.21	0.51	0.43
β -9	0.33	0.26	0.57	0.52

Perjodatodoxydation

a) *Jodometrische Bestimmung*: Von einer Lösung von 15 mg *Nucleosid* in 50 ccm $5 \cdot 10^{-3} M NaJO_4$ werden zu verschiedenen Zeiten Proben von 5 ccm abgenommen und mit 10 ccm gesätt. $NaHCO_3$ -Lösung und 2 ccm 20proz. KJ-Lösung versetzt. Nach der KJ-Zugabe wird das freigesetzte Jod *sofort* mit 0.01 *n* Na_3AsO_3 titriert²⁵.

Perjodatodoxydation von α -2 [Min.]	2	5	10	16	1440 (24 Stdn.)
Perjodatverbrauch [Moläquivv.]	0.49	0.99	1.18	1.22	1.22

Erfolgt die Jodtitration nicht unmittelbar nach der KJ-Zugabe, so wird wegen der Reaktion zwischen Nucleosid-dialdehyd und freiem Jod ein überhöhter Perjodatverbrauch vorgetäuscht. Beispielsweise wurden mit 2-ccm-Proben aus dem oben beschriebenen Ansatz (1stdg. Perjodatodoxydation), die verschieden lange Zeit mit KJ im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt waren, folgende Titrationsergebnisse erhalten:

²⁵ R. D. Guthrie in *Methods in Carbohydrate Chemistry* (Herausg. R. L. Whistler und M. L. Wolfrom), Bd. 1, S. 439, Academic Press, New York 1962.

Titrationenbeginn nach KJ-Zugabe [Min.]	1	15	30	60	90	120
Scheinbarer Perjodatverbrauch [Moläquiv.]	1.2	2.5	2.9	3.3	3.5	3.6

b) *UV-Spektroskopische Bestimmung*^{26,27}: 5 mg *Nucleosid* werden in 1 ccm Wasser gelöst. 0.5 ccm davon werden mit 0.5 ccm 0.2 *m NaJO₄* versetzt. Nach erschöpfender Oxydation (1 Stde.) wird die Absorption der Versuchslösung (1 : 40 mit Wasser verdünnt) gegen eine entsprechend konzentrierte, wäßrige *Nucleosid*-Lösung in 1-cm-Küvetten bei 300 nm gemessen. Die Abnahme der Absorption ist ein Maß für den Perjodatverbrauch, der aus der Absorption einer *NaJO₄*-Lösung bekannter Konzentration errechnet wird.

Der zeitliche Verlauf der Perjodatoxydation (Abbild. S. 230) wurde mit dem Time Drive Attachment zum Beckman DK-2 bei 300 nm aufgezeichnet. Dazu wurden 2 ccm einer Lösung von 5 mg *Nucleosid* in 5 ccm Wasser in der 1-cm-Küvette mit 2 ccm 0.01 *m NaJO₄* gemischt und gegen die entsprechend verdünnte *Nucleosid*-Lösung gemessen. Die Abnahme der Perjodatkonzentration wurde wie zuvor berechnet.

Tab. 2. Spezifische Drehung nach der Perjodatoxydation. Es wurde die an anderer Stelle beschriebene⁸⁾ Methodik benutzt. Bei Verwendung von 0.1 *m NaJO₄* statt 0.25 *m NaJO₄* liegen die Drehwerte um einige Grade tiefer als hier angegeben. Die Differenzen zwischen den Drehwerten der Dialdehyde verschiedener Herkunft liegen innerhalb der Fehlergrenze der Methode

Dialdehyd aus	$[\alpha]_D^{20}$	<i>c</i> in 0.25 <i>m NaJO₄</i>
α-2	−64°	0.515
β-2	+69°	1.08
α-9	+68°	0.795
β-9	−63°	0.960
2'-Desoxy-D-xylopyranosyl-thymin	α-Form	−68° ⁸⁾
	β-Form	+71° ⁸⁾

α- und *β*-1-[2-Desoxy-D-ribofuranosyl]-thymin (**α-2/β-2**): Eine eisgekühlte Lösung von 7 g (35 mMol) 3.4-Di-O-acetyl-D-arabinal²⁸⁾ in 30 ccm wasserfreiem Benzol wird in ca. 15 Min. mit trockenem Chlorwasserstoff gesättigt und nach 15 Min. i. Vak. bei max. 30° eingengt. Der Sirup wird in 15 ccm trockenem Benzol gelöst und erneut eingedampft. Diese Behandlung wird noch zweimal wiederholt und die rohe 1-Chlor-3.4-di-O-acetyl-2-desoxy-D-ribose (**1**) in 10 ccm Benzol aufgenommen.

Eine Suspension von 5.2 g (16 mMol) Monoquecksilberthymin (**5**)¹²⁾ in 40 ccm Dimethylformamid und 15 ccm Toluol wird durch Abdestillieren des Toluols bei Normaldruck unter Rühren azeotrop getrocknet und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur auf einmal mit der zuvor beschriebenen benzolischen Lösung von **1** versetzt, wobei unter exothermer Reaktion rasch eine klare Lösung entsteht. Nach 3stdg. Rühren unter Feuchtigkeitsausschluß wird die wieder leicht getrübe Lösung filtriert, mit 70 ccm Chloroform verdünnt und mit 170 ccm 15proz. wäßriger KJ-Lösung ausgeschüttelt. Die mit Na₂SO₄ getrocknete Chloroform-Phase wird i. Vak. eingengt. Der Rückstand wird zur Entacetylierung mit 60 ccm ammoniak-gesätt. Methanol über Nacht bei Raumtemperatur verschlossen aufbewahrt. Nach Abtreiben des Lösungsmittels i. Vak. wird das rohe sirupöse Anomerengemisch in 3 ccm unterer Phase von

²⁶⁾ J. S. Dixon und D. Lipkin, *Analytic. Chem.* **26**, 1092 (1954).

²⁷⁾ G. O. Aspinall und R. J. Ferrier, *Chem. and Ind.* **1957**, 1216.

²⁸⁾ L. Vargha und J. Kuszmann, *Chem. Ber.* **96**, 411 (1963).

Fließmittel E gelöst und an 10 g Celite 535²⁹⁾ adsorbiert. Das so beladene Celite wird auf eine Chromatographiesäule (Durchmesser 5 cm) aufgestampft, die nach früher beschriebener Methodik⁴⁾ mit 1000 g Celite 535 und 300 ccm unterer Phase von Fließmittelsystem E gepackt wurde. Eluiert wird mit der oberen Phase (ca. 1 ccm/Min.; 20 ccm/Fraktion)^{30,31)}.

Die Fraktionen 40–90 enthalten ein nicht näher untersuchtes Gemisch von zwei *N*-1-Nucleosiden (λ_{\max} in H₂O und 0.1 *n* NaOH: 265–267 nm) mit einer Extinktion von ca. 10% der des α -2/ β -2-Gemisches. Auf Kieselgel mit Fließmittel B zeigen die Nebenprodukte R_F -Werte von 0.38 und 0.43.

β -Form (β -2): Die Fraktionen 101–165 engt man i. Vak. zur Trockne ein, destilliert zweimal mit etwas absol. Äthanol nach und suspendiert den kristallinen Rückstand in Essigester. Ausb. 605 mg (16%, bez. auf 5). Schmp. vor und nach der Umkristallisation aus Isopropylalkohol 222–224°. $[\alpha]_D^{20}$: +27° (*c* 1.08, H₂O). UV-Absorption in H₂O: λ_{\max} 265 nm (ϵ 10300), λ_{\min} 232 nm (ϵ 2500), ϵ_{260} 9700; in 0.1 *n* NaOH: λ_{\max} 265 nm (ϵ 8200), λ_{\min} 243 nm (ϵ 5400). R_F -Werte s. Tab. 1.

α -Form (α -2): Die Fraktionen 220–325 werden wie bei β -2 aufgearbeitet. Der Rückstand, der nach Zugabe von 1 ccm Isopropylalkohol beim Anreiben kristallisiert, wird mit 10 ccm Essigester aufgenommen. Ausb. 585 mg (15%, bez. auf 5). Schmp. vor und nach Umkristallisation aus Isopropylalkohol 226° (Kristallumwandlung bei 215°). Misch-Schmp. mit β -2 210–215°. $[\alpha]_D^{20}$: –46.6° (*c* 1.2, H₂O). UV-Absorption in H₂O: λ_{\max} 265 nm (ϵ 10100), λ_{\min} 233 nm (ϵ 2500), ϵ_{260} 9600; in 0.1 *n* NaOH: λ_{\max} 265 nm (ϵ 8100), λ_{\min} 243 nm (ϵ 5300). R_F -Werte s. Tab. 1.

C₁₀H₁₄N₂O₅ (242.2) Ber. C 49.58 H 5.82 N 11.56 Gef. (β) C 49.59 H 5.78 N 11.46
Gef. (α) C 49.56 H 5.92 N 11.34

1-[3.4-Di-O-acetyl-2-desoxy- α -D-ribofuranosyl]-thymin (α -3): 242 mg (1 mMol) α -2 werden in 3 ccm absol. Pyridin mit 0.5 ccm Acetanhydrid über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Zugabe von 20 ccm Eiswasser wird 3 mal mit je 20 ccm Chloroform extrahiert. Die vereinigten Chloroform-Phasen werden bis zur bleibend sauren Reaktion mit 0.2 *n* H₂SO₄, dann mit 1proz. NaHCO₃-Lösung und schließlich mit Wasser ausgeschüttelt und über Na₂SO₄ getrocknet. Beim Einengen i. Vak. hinterbleibt α -3 als glasiger Schaum, der nicht kristallisiert. Ausb. 286 mg. Nach 8stdg. Trocknen (82°, 1 Torr, P₂O₅) Erweichungsbereich um 95°. $[\alpha]_D^{20}$: +0.4° (*c* 1.01, Pyridin). UV-Absorption in Methanol: λ_{\max} 262.5 nm, λ_{\min} 232 nm. R_F -Werte s. Tab. 1.

C₁₄H₁₈N₂O₇ (326.3) Ber. C 51.53 H 5.57 N 8.57 Gef. C 51.29 H 5.93 N 8.32

1-[3.4-Di-O-acetyl-2-desoxy- β -D-ribofuranosyl]-thymin (β -3): Wie für α -3 beschrieben, werden 242 mg (1 mMol) β -2 mit Acetanhydrid umgesetzt und aufgearbeitet. Nach dem Abtreiben des Chloroforms werden zur Kristallisationsbeschleunigung 2 mal einige ccm absol. Methanol zugesetzt und i. Vak. destilliert. Ausb. 324 mg. Beim Umkristallisieren aus wenig Methanol erhält man Stäbchen, die beim Trocknen (100°, 1 Torr, P₂O₅) verwittern. Schmp. 212° (um 200° sublimierend). $[\alpha]_D^{20}$: +25° (*c* 1.01, Pyridin). UV-Absorption in Methanol wie α -3. R_F -Werte s. Tab. 1.

C₁₄H₁₈N₂O₇ (326.3) Ber. N 8.57 Gef. N 8.33

²⁹⁾ Hersteller Johns-Manville Corporation. Zur Reinigung vgl. *H. M. Kissman, C. Pidacks und B. R. Baker, J. Amer. chem. Soc.* **77**, 18 (1955), l.c. 19).

³⁰⁾ Diese Säule kann ohne Beeinträchtigung des Trenneffektes für mehrere Ansätze benutzt werden.

³¹⁾ Bei Trennversuchen an Dowex- und Wofatit-Austauschersäulen (OH⁻, HCO₃⁻, Cl⁻) wurden acylierte und freie Nucleoside auch bei hoher Ionenkonzentration im Elutionsmittel in starkem Maße zurückgehalten.

1-[3.4-Bis-O-methansulfonyl-2-desoxy- α -D-ribofuranosyl]-thymidin (α -4): 242 mg (1 mMol) α -2 in 2,5 ccm absol. Pyridin werden mit 0,47 ccm *Methansulfochlorid* (6,1 mMol) versetzt und über Nacht bei 0° aufbewahrt. Man gibt ca. 2 g zerstoßenes Eis zu, gießt nach 1 Stde. unter Rühren in 25 ccm Eiswasser und wäscht den nach 2–3stdg. Rühren abgesaugten Niederschlag mit Wasser pyridinfrei. Ausb. 340 mg (85%). Aus Äthanol blaßgelbe Nadeln vom Schmp. 220° (Zers.). $[\alpha]_D^{20}$: $-29,9^\circ$ (c 1,0, Pyridin). UV-Absorption in Äthanol: λ_{\max} Äthanol 263 nm, λ_{\min} 232 nm. R_F -Werte s. Tab. 1.

$C_{12}H_{18}N_2O_9S_2$ (398,4) Ber. N 7,04 S 16,09 Gef. N 6,82 S 15,80

1-[3.4-Bis-O-methansulfonyl-2-desoxy- β -D-ribofuranosyl]-thymidin (β -4): Analog zur Darstellung von α -4 erhält man aus 242 mg (1 mMol) β -2 340 mg β -4 (85%). Aus Äthanol blaßgelbe Kristalle, die sich bei 218–219° unter partiellem Schmelzen in Nadelbüschel umwandeln, die bei höherer Temperatur sublimieren. $[\alpha]_D^{20}$: $+29,6^\circ$ (c 0,996, Pyridin). UV-Absorption in Äthanol wie α -4. R_F -Werte s. Tab. 1.

$C_{12}H_{18}N_2O_9S_2$ (398,4) Ber. N 7,04 S 16,09 Gef. N 7,07 S 15,93

α - und β -1-[2-Desoxy-L-ribofuranosyl]-thymidin (α -9/ β -9): Wie unter α -2/ β -2 beschrieben, werden 11 g (55 mMol) *3,4-Di-O-acetyl-L-arabinal*^{32,33} in 45 ccm wasserfreiem Benzol 30 Min. mit trockenem *Chlorwasserstoff* behandelt und nach weiteren 30 Min. aufgearbeitet.

Eine Mischung von 7,9 g (24 mMol) *Monoquecksilberthymidin* (5)¹², 60 ccm Dimethylformamid und 20 ccm Toluol wird azeotrop entwässert, mit der zuvor erhaltenen benzolischen Lösung der *1-Chlor-3,4-di-O-acetyl-2-desoxy-L-arabinose* (8) auf einmal versetzt, 3 Stdn. gerührt und filtriert. Nach Verdünnen des Filtrats mit 100 ccm Chloroform und Extraktion der Quecksilberionen mit 250 ccm 15proz. KJ-Lösung wird der rohe Sirup mit 60 ccm *ammoniak*-gesätt. Methanol entacetyliert. Wie für α -2/ β -2 beschrieben, wird das rohe Nucleosidgemisch mit Fließmittel E (ca. 1 ccm/Min; 20 ccm/Fraktion) an 1000 g Celite 535 (Säulendurchmesser 4,5 cm, Länge 130 cm) gereinigt und in die Anomeren getrennt³⁰.

Die Fraktionen 40–117 enthalten ein nicht näher untersuchtes Gemisch von zwei *N*-1-Nucleosiden (λ_{\max} in H₂O und 0,1 *n* NaOH: 265–267 nm), die der Absorption zufolge 7% des α -9/ β -9-Gemisches ausmachen. Auf Kieselgel mit Fließmittel B zeigen die Nebenprodukte R_F -Werte von 0,40 und 0,46.

β -Form (β -9): Die Fraktionen 122–220 werden i. Vak. eingengt und Lösungsmittelreste mit wenig Äthanol abgetrieben. Ausb. 1,68 g (29%, bez. auf 5). Durch Umkristallisation aus Äthanol farblose derbe Kristalle vom Schmp. 223–224°. $[\alpha]_D^{20}$: $-27,4^\circ$ (c 1,32, H₂O). UV-Absorption in H₂O: λ_{\max} 264–265 nm (ϵ 9400), λ_{\min} 233 nm (ϵ 2300), ϵ_{260} 9000; in 0,1 *n* NaOH: λ_{\max} 264–265 nm (ϵ 7000), λ_{\min} 244 nm (ϵ 4700). R_F -Werte s. Tab. 1.

α -Form (α -9): Die analoge Aufarbeitung der Fraktionen 260–450 ergibt 1,67 g (29%, bez. auf 5) farblose Kristalle, die nach Umkristallisation aus Äthanol bei 223–227° schmelzen. $[\alpha]_D^{20}$: $+46,9^\circ$ (c 1,14, H₂O). UV-Absorption in H₂O: λ_{\max} 264–265 nm (ϵ 9700), λ_{\min} 233 nm (ϵ 2300), ϵ_{260} 9200; in 0,1 *n* NaOH: λ_{\max} 264–265 nm (ϵ 7200), λ_{\min} 244 nm (ϵ 4800). R_F -Werte s. Tab. 1.

$C_{10}H_{14}N_2O_5$ (242,2) Ber. C 49,58 H 5,82 N 11,56 Gef. (β) C 49,87 H 5,81 N 11,61
Gef. (α) C 49,34 H 5,80 N 11,46

Hemmung der Uridin-Desoxyuridin-Phosphorylase: Die Hemmwirkung von α -9 und β -9 auf die Uridin-Desoxyuridin-Phosphorylase aus *Ehrlich-Ascites-Tumorzellen* wurde nach der früher beschriebenen Methodik³ getestet.

³² F. L. Humoller in l.c.²⁵, S. 83.

³³ J. Šmejkal und F. Šorm, Collect. czechoslov. chem. Commun. 29, 2809 (1964). [305/67]