

Nucleotide, I

## Synthese und Eigenschaften von Thymidylyl-(3' → 3')-, -(3' → 5')- und -(5' → 5')-thymidin

Arthur Myles<sup>\*)</sup>, Wolfgang Hutzenlaub, Gunther Reitz und  
Wolfgang Pfeleiderer\*

Fachbereich Chemie der Universität Konstanz,  
D-7750 Konstanz, Postfach 7733

Eingegangen am 26. Februar 1975

---

Die drei isomeren Thymidylyl-thymidine 7, 13 und 19 mit 3' → 5', 3' → 3'- und 5' → 5'-verknüpfen der Internucleotidbindung werden nach dem Triester-Verfahren über die entsprechend blockierten Phenylester 10, 11 und 18 dargestellt. Die alkalische Hydrolyse der ungeschützten Phenyltriesters 9, 12 und 17 lehrte, daß das Fehlen von alkalistabilen Schutzgruppen an den Zuckerhydroxylgruppen von einer partiellen Isomerisierung der Internucleotidbindung begleitet ist. Sämtliche synthetisierten Verbindungen werden durch UV-Spektren und Elementaranalysen charakterisiert. CD-Spektren sind wenig informativ.

Nucleotides, I

### Synthesis and Properties of Thymidylyl-(3' → 3'), -(3' → 5'), and -(5' → 5')-thymidine

The three isomeric thymidylyl-thymidines 7, 13, and 19 containing 3' → 5', 3' → 3', and 5' → 5'-internucleotid linkages are synthesised by the triester method *via* the corresponding blocked phenyl esters 10, 11, and 18. Alkaline hydrolysis of the unblocked phenyl triesters 9, 12, and 17 revealed that the absence of alkaline-stable blocking groups at the sugar hydroxyls gives rise to a partial isomerization of the internucleotidic linkage. The newly synthesized compounds are characterized by u. v. spectra and elementary analyses. C. d. spectra are less informative.

---

Eine interessante Alternative zur Knüpfung der Internucleotidbindung zu den im Laboratorium von Khorana entwickelten, klassischen Diester-Verfahren<sup>1,2)</sup> stellt die in neuerer Zeit in verschiedenen Arbeitskreisen praktizierte Triester-Methode<sup>3-19)</sup> dar. Die Problematik gezielter Oligonucleotid-Synthesen ist damit allerdings noch keineswegs befriedigend gelöst, wengleich sich bezüglich der Darstellung und Reinigung größerer Mengen an oligomeren Nucleotideinheiten für nachfolgende Blockkondensationen erfreuliche Fortschritte erzielen ließen.

<sup>\*)</sup> Alexander von Humboldt-Stipendiat 1970–1972.

<sup>1)</sup> H. G. Khorana, *Some Recent Developments in the Chemistry of Phosphate Esters of Biological Interest*, J. Wiley & Sons, Inc., New York 1961.

<sup>2)</sup> K. L. Agarwal, A. Yamazaki, P. S. Cashion und H. G. Khorana, *Angew. Chem.* **84**, 489 (1972); *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **11**, 451 (1972).

<sup>3)</sup> R. L. Letsinger und V. Mahadevan, *J. Amer. Chem. Soc.* **87**, 3526 (1965).

<sup>4)</sup> R. L. Letsinger und K. K. Ogilvie, *J. Amer. Chem. Soc.* **89**, 4801 (1967).

<sup>5)</sup> R. L. Letsinger und K. K. Ogilvie, *J. Amer. Chem. Soc.* **91**, 3350 (1969).

Bei eigenen Bemühungen um die Darstellungen präparativer Mengen an Thymidylyl-(3' → 5')-thymidin (TpT) (7) nach Reese und Saffhill<sup>8)</sup> war uns aufgefallen, daß der letzte Schritt der Synthese, die basenkatalysierte Hydrolyse der Phenyl-Schutzgruppe des Phosphorsäuretriesters (9) keineswegs einheitlich verläuft; vielmehr werden drei chromatographisch sehr ähnlich wandernde Reaktionsprodukte gebildet. Vor allem bei Verwendung von Cellulose-Dünnschichtplatten (Firma Merck oder Schleicher & Schüll) anstelle von Papier, im Laufmittel n-Butanol/5 N Essigsäure (2/1), tritt saubere Trennung ein; man muß aufgrund der ähnlichen  $R_f$ -Werte der drei Komponenten annehmen, daß bei der alkalischen Verseifung von 9 neben (3' → 5')-TpT (7) auch partielle Isomerisierung zum (3' → 3')-TpT (13) und (5' → 5')-TpT (19) stattfindet. Eine Stütze erhält diese Vermutung durch den in einer Fußnote formulierten Hinweis<sup>9)</sup>, daß bei fehlenden alkalistabilen Zuckerschutzgruppen die Abspaltung der *o*-Chlorphenylgruppe von einer 5proz. Isomerisierung von (3' → 5')-UpU zu (5' → 5')-UpU begleitet ist, während aber andererseits die Befunde von Letsinger et al.<sup>5)</sup> auch zeigen, daß eine chromatographische und elektro-phoretische Trennung von 7 und 13 nicht möglich ist.

Um den Sachverhalt experimentell zu klären, haben wir uns zunächst um die Synthese der drei isomeren Thymidylyl-thymidine 7, 13 und 19 bemüht. Die Darstellung von TpT mit der natürlichen 3' → 5'-Internucleotidbindung wurde schon mehrfach beschrieben und das Produkt auch mehr oder weniger eindeutig charakterisiert<sup>20, 21)</sup>. Dagegen sind die Angaben über das 3' → 3'-<sup>5)</sup> und 5' → 5'-Isomere<sup>22, 23)</sup> nur spärlich, und man muß sogar annehmen, daß aufgrund unserer hier dargelegten Beobachtungen das von Razzell<sup>22)</sup> synthetisierte 5' → 5'-TpT beträchtliche Mengen an 3' → 5'-Isomeren enthalten haben muß.

Als Ausgangsprodukt für Thymidylyl-(3' → 5')-thymidin (7) wählten wir 5'-*O*-(4-Methoxytetrahydropyran-4-yl)thymidin (1)<sup>24)</sup>, das mit 2-Cyanäthylphosphat und 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfochlorid (TPS) als Kondensationsmittel nach den Bedingungen von Letsinger<sup>5)</sup> zum Cyanäthylphosphat 2 phosphoryliert und mit 3'-*O*-(Methoxyacetyl)-thymidin (4) zum Triester 5 weiterkondensiert wurde. Ganz entsprechend reagiert Phenyl-

<sup>6)</sup> R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie und P. S. Miller, J. Amer. Chem. Soc. **91**, 3360 (1969).

<sup>7)</sup> G. W. Grams und R. L. Letsinger, J. Org. Chem. **35**, 868 (1970).

<sup>8)</sup> C. B. Reese und R. Saffhill, Chem. Commun. **1968**, 767.

<sup>9)</sup> J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, G. R. Owen, C. B. Reese und R. Saffhill, Chem. Commun. **1971**, 869.

<sup>10)</sup> N. J. Cusack, C. B. Reese und J. H. van Boom, Tetrahedron Lett. **1973**, 2209.

<sup>11)</sup> T. Neilson, Chem. Commun. **1969**, 1139.

<sup>12)</sup> T. Neilson und E. S. Werstiuk, Can. J. Chem. **49**, 3004 (1971).

<sup>13)</sup> F. Eckstein und I. Rizk, Angew. Chem. **79**, 684, 939 (1967); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **6**, 695, 949 (1967).

<sup>14)</sup> F. Eckstein und I. Rizk, Chem. Ber. **102**, 2362 (1969).

<sup>15)</sup> J. Smrt, Tetrahedron Lett. **1972**, 3437.

<sup>16)</sup> J. Smrt, Collect. Czechoslov. Chem. Commun. **37**, 846 (1972).

<sup>17)</sup> J. C. Catlin und F. Cramer, J. Org. Chemistry **38**, 245 (1973).

<sup>18)</sup> J. Smrt, Collect. Czech. Chem. Commun. **38**, 3642 (1973).

<sup>19)</sup> K. Itakura, C. P. Bahl, N. Katagiri, J. J. Michniewicz, R. H. Wightman und S. A. Narang, Can. J. Chem. **51**, 3649 (1973).

<sup>20)</sup> A. M. Michelson und A. R. Todd, J. Chem. Soc. **1955**, 2632.

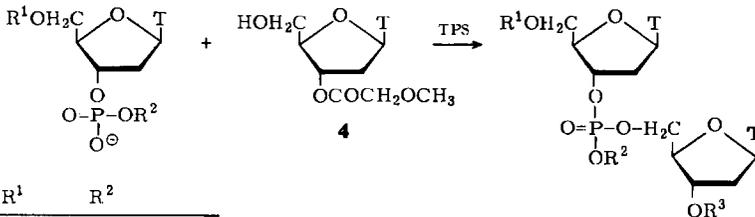
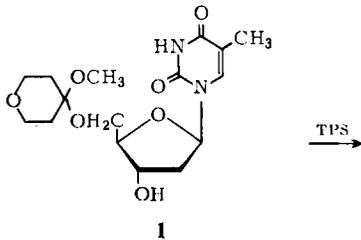
<sup>21)</sup> P. T. Gilham und H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. **80**, 6212 (1958).

<sup>22)</sup> W. E. Razzell und H. G. Khorana, J. Biol. Chem. **234**, 2105 (1959).

<sup>23)</sup> A. F. Cook, M. J. Holman und A. Nussbaum, J. Amer. Chem. Soc. **91**, 1522 (1969).

<sup>24)</sup> C. B. Reese, R. Saffhill und J. E. Sulston, J. Amer. Chem. Soc. **89**, 3366 (1967).

phosphat über **3** zum 5'-O-(4-Methoxytetrahydropyran-4-yl)thymidyl-(3' → 5')-3'-O-(methoxyacetyl)thymidin-phenylester (**6**) (92% Ausbeute).



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>2</b>	MTHP	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN
<b>3</b>	MTHP	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>

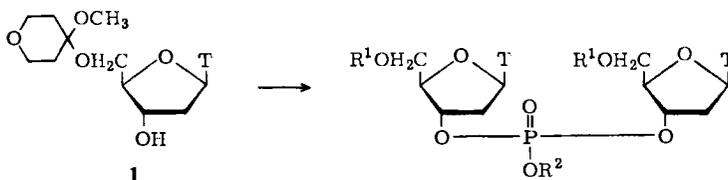
	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
<b>5</b>	MTHP	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CN	COCH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>
<b>6</b>	MTHP	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	COCH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>
<b>7</b>	H	H	H
<b>8</b>	MTHP	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H
<b>9</b>	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	H
<b>10</b>	MTHP	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	MTHP

TPS = Triisopropylbenzolsulfochlorid  
MTHP = 4-Methoxytetrahydropyran-4-yl

Milde ammoniakalische Verseifung von **5** gefolgt von saurer Hydrolyse kann, wie die chromatographische Verfolgung der Reaktion gezeigt hat, als Weg zur Darstellung von TpT (**7**) eingeschlagen werden. Behandelt man **6** kurz mit 0.1 N NaOH, so wird zunächst lediglich die Methoxyacetylgruppe abgespalten und der Triester **8** (80%) kann durch Säurebehandlung in den TpT-Phenylester **9** übergeführt werden, der in Form eines amorphen Feststoffes in 54-proz. Ausbeute anfiel. Soll **8** in TpT (**7**) umgewandelt werden, so muß zunächst die freie 3'-OH Gruppe durch eine alkalistabile Schutzgruppe blockiert werden, was wir durch die Einführung eines weiteren 4-Methoxytetrahydropyranylestes zu **10** (62%) bewerkstelligten. Verseifung dieses Triesters zuerst mit 0.5 N NaOH und abschließend durch einen sauren Ionenaustauscher liefert ebenfalls chromatographisch reines **7** in guter Ausbeute (62%). Wir haben auf diese Weise das Thymidyl-(3' → 5')-thymidin (**7**) in freier Form, wie es unseres Wissens nur einmal kurz in der Literatur<sup>25)</sup> erwähnt ist, aus Äthanol in mikrokristallinem Zustand erhalten können, wobei die Elementaranalyse und das NMR-Spektrum eine analytische Zusammensetzung mit je 1 mol Kristallwasser und Kristalläthanol anzeigt. Die physikalischen Daten unterscheiden

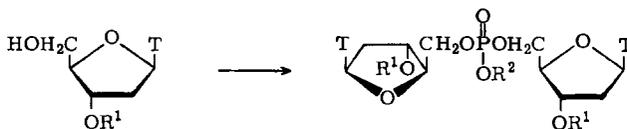
<sup>25)</sup> P. T. Gilham und H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. **80**, 6219 (1958).

sich von den bislang veröffentlichten Werten<sup>20, 21)</sup> insofern etwas, als es jetzt möglich ist, den genauen Extinktionskoeffizienten für das UV-Maximum bei 265 nm anzugeben. Dieselbe Substanz mit der gleichen analytischen Zusammensetzung resultiert aus der analogen Aufarbeitung der ammoniakalischen Verseifung des Thymidylyl-(3' → 5')-thymidin-2-cyanäthylesters nach *Letsinger*<sup>5)</sup>.



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>11</b>	MTHP	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
<b>12</b>	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
<b>13</b>	H	H

Für die Darstellung von (3' → 3')-TpT (**13**) gingen wir wiederum von 5'-*O*-(Methoxytetrahydropyryl)thymidin (**1**) aus, von dem 2 Äquivalente mit Phenyl-dichlorophosphat in Acetonitril nach dem von *Reese et al.*<sup>8, 9)</sup> praktizierten Verfahren mit 1-Äthyl-5-chlor-2-methylimidazol als empfohlener Base<sup>9)</sup> zur Reaktion gebracht wurden. Der völlig geschützte Triester **11** läßt sich leicht isolieren und durch Schichtchromatographie in analytisch reiner Form erhalten. Die Behandlung von **11** mit 75proz. Ameisensäure führt zum Thymidylyl-(3' → 3')-thymidin-phenylester (**12**) (55%), während für die Gewinnung von reinem (3' → 3')-TpT (**13**) **11** zunächst alkalisch mit 0.1 N NaOH in Dioxan/Wasser verseift wird und danach durch sauren Ionenaustauscher auch noch die säurelabilen Schutzgruppen abgespalten werden. Nach einem weiteren Reinigungsschritt durch Kieselgelchromatographie konnte das Thymidylyl-(3' → 3')-thymidin (**13**) (42%) unseres Wissens erstmals als definierter Feststoff sowohl in Form seines Mononatriumsalzdihydrates als auch der freien Säure gewonnen werden. Die Elementarzusammensetzung beider Verbindungen wurde durch C,H,N-Analysen gesichert.



	R <sup>1</sup>
<b>14</b>	COCH <sub>3</sub>
<b>4</b>	COCH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>
<b>15</b>	COCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
<b>16</b>	COCH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
<b>17</b>	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
<b>18</b>	MTHP	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
<b>19</b>	H	H

Den synthetischen Zugang zum Thymidyl-(5' → 5')-thymidin (**19**) realisierten wir in entsprechender Weise, ausgehend von 3'-*O*-Acetylthymidin (**14**) mittels Phenyl-dichlorophosphat, wobei die Kondensation zum Triester **15** wiederum in Acetonitril unter Verwendung verschiedener Basen optimiert wurde. Es zeigte sich, daß für die unter gleichen Bedingungen durchgeführten Untersuchungen aliphatische tertiäre Amine vom Typ der *Hünig*-Base keine Reaktion bewirken, während Pyridin und verschiedene seiner Derivate einen schon recht günstigen katalytischen Effekt ausüben. Übertroffen werden diese Basen aber von den Imidazolen, die sich als ganz besonders vorteilhaft für derartige Kondensationsreaktionen<sup>9)</sup> erwiesen haben. Nicht nur das von *Reese et al.*<sup>9)</sup> benützte 1-Äthyl-5-chlor-2-methylimidazol, sondern auch 1-Propyl-, 1-Benzyl- und 1,2-Dipropylimidazol gewährleisteten eine hohe Ausbeute an TpT-Phenylester **15**. Entsprechend reagiert das 3'-*O*-(Methoxyacetyl)thymidin (**4**) zum geschützten Triester **16**.

Tab. 1. Kondensation von 3'-*O*-Acetylthymidin (**14**) mit Phenyl-dichlorophosphat in Acetonitril bei 25°C

Base	pK-Wert	% Ausb. an (5' → 5')-TpT-Phenylester ( <b>15</b> )
<i>Hünig</i> -Base		0
Pyridin	5.11 – 5.44 <sup>a)</sup>	61
2,6-Lutidin	6.42 – 6.77 <sup>a)</sup>	68
2,6-Di- <i>tert</i> -butyl-4-methylpyridin		37
1-Methylimidazol	7.05 ± 0.02	60
1-Äthylimidazol	7.05 ± 0.03	65
1,2-Diäthylimidazol	7.77 ± 0.02	77
1-Propylimidazol	7.09 ± 0.03	91
1,2-Dipropylimidazol	7.85 ± 0.02	92
1-Benzylimidazol	6.56 ± 0.02	95
1-Äthyl-5-chlor-2-methylimidazol	6.04 ± 0.02	96

<sup>a)</sup> *D. D. Perrin*, Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution, Butterworths, London 1965.

Durch milde alkalische Hydrolyse lassen sich in **15** die Acetylgruppen selektiv zum (5' → 5')-TpT-Phenylester (**17**) (58 %) abspalten, wogegen etwas energiereichere Verseifungsbedingungen nicht ausschließlich zum freien (5' → 5')-TpT (**19**), sondern auch zu einer partiellen Isomerisierung der Internucleotidbindung führen. Für die Gewinnung von reinem **19** blockierten wir daher die 3'-OH Gruppen wiederum durch den alkalistabilen 4-Methoxytetrahydropyranylester und hydrolysierten dann in **18** die Schutzgruppen primär unter der Einwirkung von Alkali und sekundär von Säure. Ausgehend von **18** wurde auf diese Weise chromatographisch und analytisch reines (5' → 5')-TpT (**19**) in 57proz. Ausbeute erhalten.

Da die hier beschriebenen Synthesen der drei isomeren TpTs **7**, **13** und **19** sowie ihrer Vorprodukte unter dem Gesichtspunkt der Isolierung in Substanz und Ermittlung der genauen analytischen Zusammensetzung durch Elementaranalysen vorgenommen wurden, gelingt nunmehr auch eine weitere wichtige Charakterisierung der Substanzen durch quantitative, UV-spektrophotometrische Bestimmung der Extinktionskoeffizienten (Tab. 2).

Tab. 2. Physikalische Daten von Thymidin- und Thymidyl-thymidin-Derivaten

	pK-Werte in Wasser	UV-Absorptionsspektren $\lambda_{\max}$ (nm)	$\lg \epsilon$	pH-Wert Lösungs- mittel	Mole- kül- art	$\lambda$ (nm)	CD-Spektren in Methanol $\epsilon$
Thymidin		265 267 [225]	3.983 3.983 [3.940]	MeOH 6.0 12.0	0 0 -	217 230 243 275	- 7250 - 4400 - 4450 + 10100
5'-O-(4-Methoxytetrahydro- pyran-4-yl)thymi- din (1)	10.05 $\pm$ 0.1	264 264 212 [225]	3.964 3.987 4.125 [3.967]	MeOH 7.0 12.0	0 0 -	218 230 245 275	- 6300 - 4000 - 5670 + 7870
3'-O-(Methoxyacetyl)- thymidin (4)		264	3.972	MeOH	0	220 233 242 275	- 6900 - 4600 - 5450 + 9150
3'-O-Acetyl- thymidin (14)	9.96 $\pm$ 0.1	264 265 210 [224]	3.973 4.036 4.163 [4.004]	MeOH 6.0 12.0	0 0 -	218 230 244 274	- 5670 - 3000 - 5000 + 8800
(3' $\rightarrow$ 5')-TpT (7)	10.28 $\pm$ 0.06	265 266 265 265 217	4.256 4.263 4.263 4.166 4.280	MeOH -2.0 7.0 13.0	- 0 - - -	218 230 243 275	- 11000 - 7600 - 10100 + 16700
(3' $\rightarrow$ 3')-TpT (13)		265 265 265 265 217	4.263 4.257 4.270 4.158 4.298	MeOH -2.0 7.0 13.0	- 0 - - -	220 230 240 273	- 10100 - 6400 - 7900 + 14200

Tab. 2 (Fortsetzung)

	pK-Werte in Wasser	UV-Absorptionsspektren $\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$\lg \epsilon$	pH-Wert Lösungs- mittel	Mole- kül- art	$\lambda$ (nm)	CD-Spektren in Methanol ⑥
(5' → 5')-TpT (19)		265	4.240	MeOH	—	218 230 242 275	—10700 —5500 —6300 +14200
		267	4.236	—2.0	0		
		267	4.236	7.0	—		
(3' → 5')-TpT- Phenylester (9)		266	4.144	13.0	—		
		263	4.269	MeOH	0	218 230 241 272	—10400 —5600 —6600 +15750
(3' → 3')-TpT- Phenylester (12)		263	4.274	MeOH	0	218 233 240 272	—9450 —4400 —6000 +16700
		263	4.238	MeOH	0	218 235 242 273	—8700 —4400 —4500 +8800
(5' → 5')-TpT- Phenylester (17)		263	4.267	MeOH	0	215 231 245 274	—8800 —3800 —7250 +12000
	<b>5</b>	263	4.250	MeOH	0	219 230 245 275	—6400 —3750 —6300 +14800
<b>6</b>	262	4.269	MeOH	0	218 230 242 275	—8200 —4400 —8500 +14150	
<b>8</b>	263	4.276	MeOH	0	218 229 242 275	—6300 —4500 —6300 +16700	
<b>10</b>	263	4.294	MeOH	0	218 230 241 275	—9800 —5000 —6900 +13200	
<b>11</b>	263	4.243	MeOH	0	218 233 240 271	—8200 —4000 —5350 +7550	
<b>15</b>	263	4.254	MeOH	0	218 231 240 275	—9150 —4600 —5050 +8200	
<b>16</b>	263	4.237	MeOH	0	218 230 239 270	—6300 —2500 —2850 +10100	
<b>18</b>	263						

0 = Neutralelektil; — = Monoanion; — — — = Trianion  
 [] = Schulter.

Aus den UV-Spektren läßt sich ersehen, daß kein prinzipieller Unterschied im Absorptionsverhalten der  $3' \rightarrow 3'$ ,  $3' \rightarrow 5'$  und  $5' \rightarrow 5'$ -TpT-Reihe besteht. Vergleicht man einander entsprechende Verbindungen gleicher Molekülart wie **7**, **13** und **19** bzw. ihre Phenylester **9**, **12** und **17** oder die vollgeschützten Methoxytetrahydropyranylphenylester-Derivate **10**, **11** und **18**, so fällt auf, daß die  $3' \rightarrow 3'$ -Derivate jeweils die höchsten und die  $5' \rightarrow 5'$ -Verbindungen die niedrigsten Extinktionen aufweisen (Abb. 1 und 2).

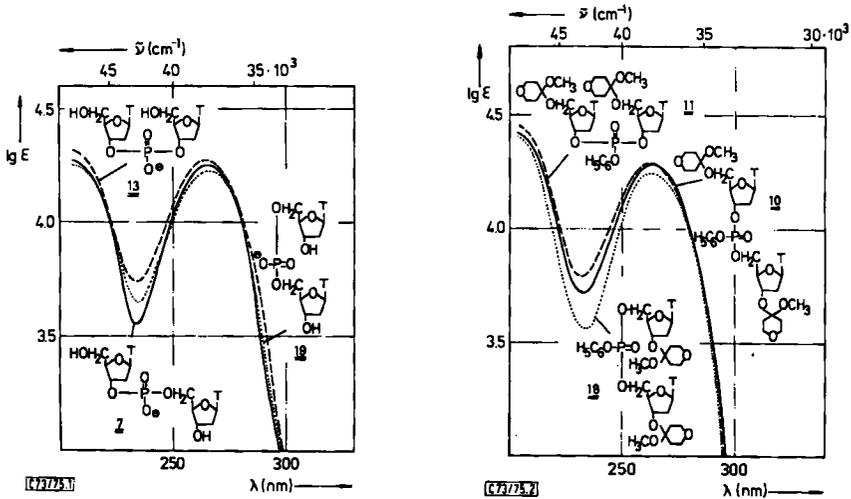


Abb. 1. UV-Absorptionsspektren der Monoanionen von  $3' \rightarrow 5'$  (**7**) ———,  $3' \rightarrow 3'$  (**13**) - - - - und  $5' \rightarrow 5'$ -TpT (**19**) ······ bei pH 7.0

Abb. 2. UV-Absorptionsspektren von **10** ———, **11** - - - - und **18** ······ in Methanol

Diese Abstufung kann als Ausdruck der gegenseitigen intramolekularen Beeinflussung der Thymin-Chromophore gewertet werden, die bei einer  $5' \rightarrow 5'$ -Verknüpfung aus sterischen Gründen am günstigsten ist und daher den größten Hypochromie-Effekt<sup>18, 26-28)</sup> zeigt. Im Vergleich zu 2 mol Thymidin liegen die Extinktionswerte der langwelligeren Bande der Monoanionen in wäßrigem Puffer pH 7 bei **13** um 3%, bei **7** um 5% und bei **19** um 11% niedriger. Noch ausgeprägter sind die Differenzen in der Reihe **10**, **11** und **18**. Aus den CD-Spektren schließlich läßt sich ablesen, daß die unterschiedliche Verknüpfung zweier Thymidine sowohl hinsichtlich der Phosphorsäure-di- bzw. triester-Struktur als auch den Positionen am Kohlenhydratteil der Moleküle keinen Einfluß auf die Polarisierung der verschiedenen Übergänge ausübt. Nur so ist zu verstehen, daß der Charakter der CD-Spektren aller hier untersuchten Verbindungen als gleich bzw. als dem Thymidin nahe verwandt angesehen werden müssen.

<sup>26)</sup> R. L. Sinsheimer, J. Biol. Chem. **208**, 445 (1954).

<sup>27)</sup> M. Privat de Garilhe und M. Laskowski, J. Biol. Chem. **223**, 661 (1956).

<sup>28)</sup> H. Shapiro und E. Chargaff, Biochim. Biophys. Acta **24**, 596, 608 (1957).

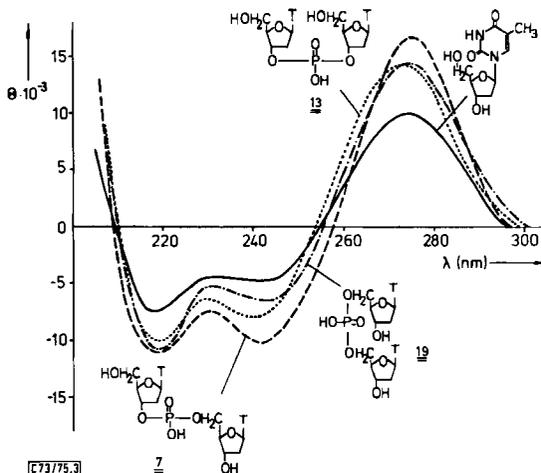


Abb. 3. CD-Spektren von Thymidin ———, 3' → 5'- (7) - - - - -, 3' → 3'- (13) ····· und 5' → 5'-TpT (19) - · - · - · in Methanol

Nach der Reindarstellung und eindeutigen Charakterisierung der drei isomeren TpT 7, 13 und 19 war es dann auch möglich, die eingangs geäußerte Vermutung einer partiellen Isomerisierung der Internucleotidbindung bei der alkalischen Hydrolyse des Thymidyl- (3' → 5')-thymidin-phenylesters (9) experimentell in der Weise zu bestätigen, daß der chromatographische Vergleich eine Mischung von 7, 13 und 19 im System *n*-Butanol/5 *N* Essigsäure (2 : 1) auf Dünnschicht-Cellulose mit dem Hydrolysegemisch als identisch erwies. Über eine quantitative Auswertung der Hydrolyseergebnisse wird in der nachfolgenden Arbeit berichtet.

Wir danken der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und dem *Fonds der Chemischen Industrie* für finanzielle Hilfe und der *Alexander von Humboldt-Stiftung* für die Gewährung eines Stipendiums. Ferner gilt unser Dank der chem.-techn. Assistentin Frau *M. Bischler* für die Bestimmung der physikalischen Daten.

## Experimenteller Teil

UV-Absorptionsspektren und CD-Spektren: Cary-Recording-Spectrometer, Modell 115/15 bzw. 1115/60, der Firma Applied Physics Corp. Für die chromatographischen Untersuchungen wurden Dünnschichtfolien Polygram SIL G/UV<sub>254</sub> von Macherey-Nagel, F1440 LS 254 von Schleicher & Schüll sowie Cellulosedünnschichtplatten von Merck verwendet. Die präparative Schichtchromatographie erfolgte auf Merck Silicagel PF<sub>254</sub> in 2 mm Schichtdicke und die Säulenchromatographie mit Merck Silicagel 0.05–0.2 mm Korngröße. Die Substanzen wurden im allgemeinen i. Vak. über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert.

3'-*O*-(Methoxyacetyl)thymidin (4)<sup>29)</sup>: 7.0 g 5'-*O*-Tritylthymidin<sup>30)</sup> in 50 ml absol. Pyridin werden mit 4 ml Methoxyessigsäureanhydrid versetzt und 3 h bei Raumtemp. gerührt. Man engt dann auf ca. 10 ml ein und tropft unter kräftigem Rühren in 500 ml Wasser ein. Es wird dreimal mit je 50 ml

<sup>29)</sup> Privatmitteil. Prof. Dr. C. B. Reese, King's College London.

<sup>30)</sup> W. W. Zorbach und R. S. Tipson, *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry*, Vol. 1, S. 321, Interscience Publ., New York, London 1968.

Chloroform extrahiert, die organische Phase mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und anschließend zur Trockene eingengt. Der sirupöse Rückstand wird in 50 ml 80proz. Essigsäure 15 min unter Rückfluß gekocht, die Lösung mit 50 ml Wasser verdünnt und nach Abkühlen das abgeschiedene Tritanol abgesaugt. Das Filtrat wird zur Trockene eingengt, zur Entfernung von Säurespuren noch dreimal mit je 20 ml Äthanol im Rotationsverdampfer eingengt, der Rückstand in 5 ml Aceton gelöst und dann bis zur Trübung langsam Petroläther zugesetzt. Über Nacht scheidet sich ein Niederschlag ab, der durch weitere Zugabe von Äther/Petroläther (1/1) vervollständigt wird. Man saugt scharf ab, wäscht mit Äther und trocknet bei 50°C (3.92 g; Schmp. 113–115°C). Umkristallisation aus 35 ml Essigester mit Aktivkohle lieferte 2.45 g (61%) farblose Kristalle vom Schmp. 117–118°C.

$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_7$  (314.3) Ber. C 49.68 H 5.77 N 8.91 Gef. C 49.60 H 5.54 N 8.74

*5'-O-(4-Methoxytetrahydropyran-4-yl)thymidylyl-(3' → 5')-3'-O-(methoxyacetyl)thymidin-2-cyanäthylester* (5): 0.315 g (1.1 mmol) Barium-2-cyanäthylphosphat werden in 11 ml Wasser mit 3.5 g feuchtem Dowex 50 X 4 (Pyridinium-Form) behandelt. Man filtriert den Ionenaustauscher ab, wäscht mit 5 ml 10proz. Pyridin und engt die vereinigten Filtrate im Rotationsverdampfer ein. Der Rückstand wird mit absol. Pyridin versetzt, erneut eingengt und dieser Prozeß mehrfach wiederholt, bis sämtliche Feuchtigkeitsspuren entfernt sind. Man löst nun in 20 ml absol. Pyridin, gibt 0.665 g 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfochlorid (TPS) zu und rührt 30 min, bis vollständige Lösung eingetreten ist. Nach Zugabe von 0.356 g (1.0 mmol) *5'-O-(4-Methoxytetrahydropyran-4-yl)thymidin* (1)<sup>24</sup> wird im geschlossenen Gefäß 2 Tage bei Raumtemp. gerührt, bis im Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel in den Systemen Chloroform/Methanol (6/1) bzw. Äthylacetat/Äthanol (3/1) kein Ausgangsmaterial mehr vorhanden ist.

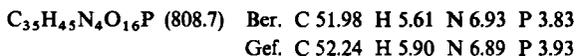
Danach werden erneut 0.332 g TPS zugegeben und nach weiteren 30 min 0.345 g *3'-O-(Methoxyacetyl)thymidin* (4) als zweite Nucleosidkomponente. Der Ansatz wird nach 4 Tagen aufgearbeitet: zunächst werden 5 g Eis zugesetzt und nach 30 min Rühren wird mit Methylenchlorid extrahiert. Man trennt die organische Phase ab, trocknet mit Natriumsulfat und engt nach Zugabe von etwas Toluol zur Entfernung von Pyridinspuren auf ein kleines Vol. ein. Das Konzentrat wird auf 3 präparative Kieselgelplatten (40 × 20 × 0.2 cm) aufgetragen und mit Äthylacetat/Äthanol (3/1) entwickelt. Die Hauptbande ( $R_F$  0.5) wird mit Chloroform/Äthanol (2/1) eluiert, eingengt, in wenig Chloroform aufgenommen, das Reaktionsprodukt sodann durch Zugabe von niedrigsiedendem Petroläther unter intensivem Rühren als amorpher Feststoff (0.455 g) abgeschieden. Da die Substanz in Äthylacetat/Äthanol (3/1) einheitlich aussah, in Chloroform/Methanol (6/1) jedoch eine Verunreinigung mit kleinerem  $R_F$ -Wert zeigte, wurde erneut eine Trennung auf präparativen Platten im letzteren System durchgeführt und analog aufgearbeitet. Es werden 0.247 g (32%) farbloser, amorpher Feststoff erhalten, der ab 90°C sintert.

$\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_{15}\text{P}$  (769.7) Ber. C 49.94 H 5.76 N 9.10 Gef. C 49.83 H 5.66 N 9.12

*5'-O-(4-Methoxytetrahydropyran-4-yl)thymidylyl-(3' → 5')-3'-O-(methoxyacetyl)thymidin-phenylester* (6): 0.191 g (1.1 mmol) Phenylphosphat werden zweimal mit je 20 ml absol. Pyridin eingengt, der Rückstand wird erneut in 20 ml absol. Pyridin gelöst. Man gibt 0.665 g TPS (2.2 mmol) zu, läßt 30 min stehen und versetzt mit 0.356 g (1.0 mmol) *5'-O-(4-Methoxytetrahydropyran-4-yl)thymidin* (1).

Unter Feuchtigkeitsausschluß wird 72 h bei Raumtemp. gerührt, dann erneut 0.332 g TPS zugegeben und nach weiteren 30 min schließlich als letzte Reaktionskomponente 0.345 g (1.1 mmol) *3'-O-(Methoxyacetyl)thymidin* (4). Man rührt 2.5 Tage bei Raumtemp. unter Ausschluß von Feuchtigkeit und Licht. Zur Aufarbeitung wird zunächst Eis zugesetzt, 30 min gerührt, mit Wasser etwas verdünnt und dann 3 mal mit Methylenchlorid ausgeschüttelt. Nach Waschen mit Wasser wird über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und unter Zugabe von etwas Toluol im Rotationsverdampfer im Ölpumpenvak. eingengt. Der Rückstand wird in wenig Chloroform gelöst und auf 4 präparative Kieselgelplatten (40 × 20 × 0.2 cm) aufgetragen. Nach Entwickeln mit Chloroform/Methanol

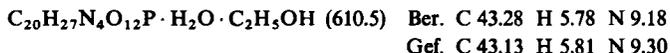
(6/1) wird das Hauptprodukt mit Chloroform/Äthanol (2/1) eluiert und dann erneut eingengt. Man löst den Rückstand in Chloroform, filtriert von etwas Kieselgel ab, konzentriert auf ein kleines Vol. und bringt dann das Reaktionsprodukt durch rasche Zugabe von destilliertem Petroläther (50–70°C) unter Rühren zur Abscheidung. Der amorphe Feststoff wird gesammelt, mit analytisch reinem n-Hexan (Uvasol Qualität) gewaschen und i. Hochvak. mehrere Stunden getrocknet bzw. von flüchtigen Bestandteilen befreit. Man erhält 0.74 g (92%) eines farblosen, amorphen Feststoffes, der ab 80°C sintert und schmilzt.



*Thymidylyl-(3' → 5')-thymidin (TpT) (7)*

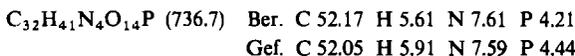
a) 0.1 g **10** in 4 ml Dioxan werden mit 3 ml 1 N NaOH versetzt und 2 h bei Raumtemp. gerührt. Die chromatographische Verfolgung der Reaktion zeigt an, daß nach dieser Zeit das Ausgangsprodukt vollkommen umgesetzt ist. Man verdünnt mit Wasser auf 25 ml, gibt 5 ml feuchten Ionenaustauscher Dowex 50 X 4 (H<sup>+</sup>-Form) zu und filtriert nach 30 min Rühren ab. Das Harz wird mit Wasser nachgewaschen, die vereinigten Filtrate werden im Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wird ebenso mehrfach mit absol. Äthanol eingengt und der verbleibende Feststoff aus wenig absol. Äthanol umkristallisiert. Bei langsamem Abkühlen und anschließendem Stehenlassen im Tiefkühlschrank scheidet sich ein farbloser mikrokristalliner Niederschlag ab (0.015 g). Er wird gesammelt und im Vakuumexsikkator über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> getrocknet. Das Filtrat wird unter Rühren mit n-Hexan versetzt, wobei sich ein amorpher Feststoff abscheidet, der nach Stehenlassen über Nacht im Eisschrank ebenfalls abgesaugt, mit Uvasol n-Hexan gewaschen und im Vakuumexsikkator getrocknet wird (0.026 g). Beide Fraktionen sind chromatographisch rein und zeigen im UV-Spektrum dieselben Extinktionswerte. Ausb. 0.041 g (62%) farbloser Feststoff, bei 185–195°C Sintern, bei 200–210°C beginnende Zers., bei 215–220°C Schmelzen unter Zers.

b) 0.116 g Thymidylyl-(3' → 5')-thymidin-2-cyanäthylester<sup>5)</sup> werden in 5 ml Methanol gelöst, mit 5 ml 1 N Ammoniak versetzt und bei Raumtemperatur gerührt. Der anfänglich auftretende Niederschlag löst sich nach kurzer Zeit erneut auf, und die chromatographische Verfolgung der Reaktion läßt erkennen, daß die Verseifung des Triesters rasch verläuft. Nach 5 h wird zur Trockene eingengt, der Rückstand in 15 ml Wasser gelöst, mit 3 ml feuchtem Ionenaustauscher Dowex 50 X 4 (H<sup>+</sup>-Form) versetzt und nach 30 min Rühren filtriert. Das Filtrat wird erneut eingengt, der Rückstand mit absol. Äthanol versetzt, wiederum im Rotationsverdampfer eingengt und der verbleibende Feststoff aus wenig absol. Äthanol umkristallisiert. Beim Stehenlassen im Eisschrank scheidet sich ein farbloser mikrokristalliner Niederschlag ab (0.036 g). Eine zweite Fraktion erhält man durch Ausfällen des restlichen Reaktionsproduktes mittels Petroläther aus dem Filtrat (0.04 g). Man trocknet beide Fraktionen, die sich chromatographisch und im UV-Spektrum nicht unterscheiden, über P<sub>4</sub>O<sub>10</sub> im Vakuumexsikkator. Ausb. 0.076 g (67%) farbloser Feststoff, bei 185 bis 200°C Sintern, bei 200–210°C leichtes Aufblähen, bei 215–220°C Schmelzen unter Zers.

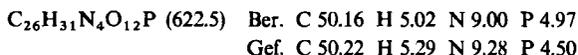


*5'-O-(4-Methoxytetrahydropyran-4-yl)thymidylyl-(3' → 5')-thymidin-phenylester (8)*: 0.404 g **6** in 8 ml Dioxan werden mit 32 ml 0.125 N NaOH versetzt und 1 min bei Raumtemp. gerührt. Man neutralisiert dann mit 10proz. Essigsäure auf pH 6–7, konzentriert im Rotationsverdampfer und entfernt Säurespuren sowie Feuchtigkeit durch Einengen mit Toluol. Der Rückstand wird in wenig Chloroform gelöst, auf 3 präparative Kieselgelplatten (40 × 20 × 0.2 cm) aufgetragen und mit Chloroform/Methanol (6/1) entwickelt. Die Hauptzone (R<sub>F</sub> 0.55) wird mit Chloroform/Äthanol (2/1) eluiert, eingengt, der Rückstand in Chloroform gelöst, von wenig Ungelöstem abfiltriert und erneut auf 2–3 ml konzentriert. Man bringt das Reaktionsprodukt durch schnelle Zugabe von

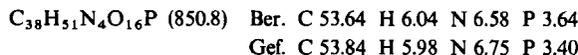
80 ml destilliertem Petroläther (50–70°C) unter Rühren zur Abscheidung. Der amorphe Feststoff wird gesammelt, mit Uvasol n-Hexan gewaschen und durch mehrstündiges Trocknen i. Hochvak. werden sämtliche flüchtigen Bestandteile entfernt. Man erhält so 0.295 g (80%) farblosen amorphen Feststoff vom Schmp. 99°C (Sintern unter Schäumen).



*Thymidylyl-(3' → 5')-thymidin-phenylester (9)*: 0.2 g **8** werden mit 20 ml 75proz. Ameisensäure 30 min bei Raumtemp. behandelt. Man engt zur Trockene ein und wiederholt diesen Prozeß noch zweimal durch Zugabe von etwas Wasser, bis alle Säurespuren entfernt sind. Sodann wird in wenig Methanol gelöst, auf 2 präparative Kieselgelplatten (40 × 20 × 0.2 cm) aufgetragen und mit Chloroform/Methanol (6/1) entwickelt. Das Hauptprodukt wird mit Chloroform/Äthanol (2/1) eluiert, eingengt und der Rückstand in Äthanol gelöst. Man konzentriert auf wenige ml und bringt durch rasche Zugabe von reinem Petroläther (50–70°C) unter Rühren das Reaktionsprodukt zur Abscheidung. Der Niederschlag wird gesammelt, mit Uvasol n-Hexan gewaschen und liefert nach mehrstündigem Trocknen i. Hochvak. 0.091 g (54%) farblosen, amorphen Feststoff der ab 88°C sintert, bei 118°C aufschäumt.



*5'-O-(4-Methoxytetrahydropyran-4-yl)thymidylyl-(3' → 5')-3'-O-(4-methoxytetrahydropyran-4-yl)thymidin-phenylester (10)*: 0.3 g **8** werden in 1.5 ml 4-Methoxy-5,6-dihydro-2H-pyran bei Gegenwart weniger mg *p*-Toluolsulfonsäure 20 min bei Raumtemp. gerührt. Man verdünnt etwas mit Methanol und neutralisiert mit verd. Natriummethylat-Lösung auf pH 7. Die Lösung wird eingengt, der Rückstand mit Chloroform/Wasser extrahiert und nach Trennung der Phasen das Chloroform mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Nach Konzentrieren auf ein kleines Vol. wird auf 2 präparative Kieselgelplatten aufgetragen und mit Chloroform/Methanol (6/1) entwickelt. Die Hauptzone wird mit Chloroform/Äthanol (2/1) eluiert, konzentriert und der Reinigungsprozeß durch entsprechende Chromatographie im System Äthylacetat/Äthanol (3/1) wiederholt. Die Hauptbande (R<sub>F</sub> 0.6) wird erneut mit Chloroform/Äthanol (2/1) eluiert, eingengt, der Rückstand in Chloroform gelöst und nach Filtrieren und Konzentrieren auf ein kleines Vol. das Reaktionsprodukt durch rasches Zugabe von reinem Petroläther (50–70°C) unter Rühren zur Abscheidung gebracht. Der Niederschlag wird gesammelt, mit Uvasol n-Hexan gewaschen und liefert nach Trocknen i. Hochvak. 0.345 g (62%) farblosen, amorphen Feststoff, ab 88°C Sintern, bei 118°C Schmelzen.



*5'-O-(4-Methoxytetrahydropyran-4-yl)thymidylyl-(3' → 3')-5'-O-(4-methoxytetrahydropyran-4-yl)thymidin-phenylester (11)*: In einem Schenkel eines H-förmigen Reaktionsgefäßes löst man 0.346 g 5'-O-(4-Methoxytetrahydropyran-4-yl)thymidin (**1**)<sup>22)</sup> in 2 ml absol. Acetonitril nahezu auf, während sich im zweiten Schenkel 0.09 ml Phenyl-dichlorophosphat und 0.26 ml 1-Äthyl-5-chlor-2-methylimidazol in 1 ml Acetonitril befinden. Nach 5 min wird das Phosphorylierungsgemisch mit dem Nucleosid vereinigt und 4 h bei Raumtemp. gerührt. Nach ca. 10 min ist klare Lösung eingetreten, nach 2.5 h ist das Ausgangsprodukt chromatographisch nicht mehr nachweisbar. Man gießt das Reaktionsgemisch in 25 ml 10proz. Phosphatpuffer von pH 5 und extrahiert anschließend durch dreimaliges Ausschütteln mit je 20 ml Chloroform. Nach Trocknen der organischen Phase mit MgSO<sub>4</sub> wird auf ca. 3 ml eingengt und durch rasche Zugabe von destilliertem Petroläther unter Rühren das Reaktionsprodukt zur Abscheidung gebracht (0.411 g, 97%). Zur Reinigung wird in wenig Chloroform gelöst, auf 4 präparative Kieselgelplatten (40 × 20 × 0.2 cm) aufgetragen und anschließend in Methylchlorid/Methanol (9/1) entwickelt. Die Hauptbande

wird mit Chloroform/Äthanol (2/1) eluiert, im Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand analog im System Chloroform/Methanol (9/1) noch einmal gereinigt. Der mit Petroläther ausgefällte amorphe Feststoff wird dann mit Uvasol n-Hexan gewaschen und liefert nach Trocknen i. Hochvak. 0.35 g (83%) farbloses Pulver vom Schmp. ab 92°C (Schäumen).

$C_{38}H_{51}N_4O_{16}P$  (850.8) Ber. C 53.65 H 6.04 N 6.59 P 3.64

Gef. C 53.47 H 6.22 N 6.58 P 3.86

*Thymidylyl-(3' → 3')-thymidin-phenylester (12)*: 0.2 g **11** werden in 20 ml 75proz. Ameisensäure 45 min bei Raumtemp. behandelt. Man engt im Rotationsverdampfer zur Trockene ein und wiederholt zur Entfernung von Säurespuren diesen Prozeß noch zweimal durch Zugabe von je 10 ml Wasser. Der durch Ölpumpenvakuum behandelte amorphe Schaum wird in wenig Methanol gelöst, auf 2 präparative Kieselgelplatten (40 × 20 × 0.2 cm) aufgetragen und in Chloroform/Methanol (6/1) entwickelt. Die Hauptzone ( $R_F$  0.4) wird mit Chloroform/Methanol (2/1) eluiert, eingengt und der Rückstand in wenig Äthanol gelöst. Nach Filtrieren wird durch rasche Zugabe von destilliertem Petroläther (50–70°C) unter Rühren das Reaktionsprodukt zur Abscheidung gebracht. Der farblose amorphe Feststoff wird gesammelt, mit Uvasol n-Hexan gewaschen und liefert nach Trocknen i. Hochvak. 0.081 g (55%) vom Schmp. ab 115°C (Sintern).

$C_{26}H_{31}N_4O_{12}P$  (622.5) Ber. C 50.16 H 5.02 N 9.01 P 4.97

Gef. C 50.06 H 5.25 N 9.16 P 4.78

*Thymidylyl-(3' → 3')-thymidin (13)*: 0.4 g **11** in 20 ml Dioxan werden mit 80 ml 0.125 N NaOH versetzt und 5 h bei Raumtemp. gerührt. Man gibt einen Überschuß an Dowex 50 X 4 ( $H^+$ -Form) zu, bis die Lösung pH 1–2 zeigt. Nach 1 h filtriert man vom Ionenaustauscher ab, wäscht ihn mit Wasser und engt die vereinigten Filtrate ein. Der Rückstand wird in 50 ml Äthanol + 2 ml Wasser gelöst, von wenig Ungelöstem wird abfiltriert und bis zur beginnenden Niederschlagsabscheidung eingengt. Die Fällung wird durch Zugabe von 50 ml Äther vervollständigt, der Niederschlag gesammelt, mit Äther gewaschen und getrocknet (0.19 g). Das Filtrat wird auf ein kleines Vol. eingengt, auf eine präparative Kieselgelplatte (40 × 20 × 0.2 cm) aufgetragen und mit Chloroform/Methanol (1/1) entwickelt. Aus der Hauptbande ( $R_F$  0.4) erhält man durch Elution und Einengen weitere 0.039 g farblosen Feststoff, der mit der ersten Fraktion chromatographisch identisch ist. Zur weiteren Reinigung werden die vereinigten Fraktionen nochmals einer Kieselgelchromatographie unterworfen. Man löst in 2 ml Wasser, verdünnt mit 20 ml Äthanol und zieht die Substanz durch Zugabe von 3 g Silicagel Woelm (neutral 0.05–0.2 mm) und Einengen zur Trockene im Rotationsverdampfer (Dampfdurchleitungsröhr mit Wattebausch verschließen) auf das Trägermaterial auf. Das beladene Kieselgel wird auf eine in Chloroform gepackte Kieselgelsäule (10 g Trägermaterial) gegeben, sodann zunächst mit 50 ml Chloroform/Methanol (4/1) und anschließend mit 1 : 1-Gemisch chromatographiert. Es werden Portionen von 15 ml gesammelt, wobei sich das chromatographisch reine (3' → 3')-TpT in den Fraktionen 8–16 befindet. Man engt auf ein kleineres Vol. ein, wodurch es zur Abscheidung eines mikrokristallinen Niederschlages kommt. Durch Zugabe von etwas Äther wird die Fällung vervollständigt, und man erhält nach Trocknen über Phosphorpentoxid i. Hochvak. 0.12 g (42%) farbloses Kristallpulver vom Schmp. 215–225°C (Zers.), das das Natrium-Na-Salz von **13** darstellt.

$[C_{20}H_{26}N_4O_{12}P]Na \cdot 2H_2O$  (604.5) Ber. C 39.71 H 5.00 N 9.26

Gef. C 39.71 H 5.37 N 9.27

*Freie Säure*: Zu 85 mg des Natriumsalzes in 15 ml Wasser wird 1 ml feuchter Ionenaustauscher Dowex 50 X 4 ( $H^+$ -Form) gegeben, kurz gerührt und dann filtriert. Das Harz wird mit Wasser gewaschen, die vereinigten Filtrate werden zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird zweimal mit absol. Äthanol im Rotationsverdampfer eingengt und dann aus wenig absol. Äthanol umkristallisiert. Beim Stehenlassen im Eisschrank scheidet sich zunächst ein mikrokristalliner, farbloser

Niederschlag ab (21 mg), und aus dem Filtrat läßt sich eine zweite Fraktion durch Zugabe von Petroläther ausfällen. Der amorphe Feststoff wird nach Stehenlassen in der Kälte gesammelt, mit Uvasol n-Hexan gewaschen und dann analog der ersten Fraktion im Vakuumexsikkator über  $P_4O_{10}$  getrocknet (31 mg). Ausb. 52 mg (66 %) farbloser Feststoff, bei 190–200°C leichtes Sintern, bei 200–210°C leichtes Aufblähen, bei 215–220°C Schmelzen unter Zers.

$C_{20}H_{27}N_4O_{12}P \cdot H_2O$  (564.5) Ber. C 42.56 H 5.18 N 9.93 Gef. C 42.72 H 5.56 N 10.11

*3'-O-Acetylthymidyl-(5' → 5')-3'-O-acetylthymidin-phenylester* (15): In einem Schenkel eines H-förmigen, völlig trockenen Reaktionsgefäßes werden 0.142 g *3'-O-Acetylthymidin* (14)<sup>31)</sup> zu 1 ml absol. Acetonitril gegeben, während im zweiten Schenkel 0.75 ml absol. Acetonitril, 0.25 ml 1-Äthyl-5-chlor-2-methylimidazol und 0.045 ml Phenyl-dichlorophosphat gemischt werden. Letzteres Reagenz wird 3 min gut gerührt und dann durch mehrfaches Hin- und Hergießen mit dem Nucleosid vereinigt. Die verschlossene Apparatur wird 20 h bei Raumtemp. gehalten und das Reaktionsgemisch magnetisch gerührt. Man stoppt die Reaktion durch Zugabe von 25 ml 10proz. Phosphatpuffer pH 5 und extrahiert dreimal durch intensives Ausschütteln mit je 25 ml Chloroform. Die vereinigten Chloroformextrakte werden nochmals mit 20 ml Wasser gewaschen und die organische Phase über  $MgSO_4$  getrocknet. Nach Filtrieren und Waschen des Trockenmittels mit 10 ml Chloroform wird eingengt, das verbleibende Öl in 2 ml Chloroform gelöst und durch rasches Zugeben von destilliertem, niedrigsiedendem Petroläther unter Rühren das Reaktionsprodukt zur Abscheidung gebracht. Man sammelt den amorphen Feststoff und reinigt durch Säulen- oder präparative Schichtchromatographie an Kieselgel durch Entwickeln mit Äthylacetat. Das konzentrierte Eluat wird erneut mit Petroläther gefällt, der amorphe Feststoff gesammelt und mit Uvasol n-Hexan gewaschen. Nach Trocknen i. Hochvak. erhält man 0.159 g (90 %) farbloses Pulver, das ab 90°C sintert, ab 140°C aufschäumt.

$C_{30}H_{35}N_4O_{14}P$  (706.6) Ber. C 51.00 H 4.99 N 7.93 P 4.38  
Gef. C 51.40 H 5.58 N 7.83 P 4.66

*3'-O-(Methoxyacetyl)thymidyl-(5' → 5')-3'-O-(methoxyacetyl)thymidin-phenylester* (16): 0.314 g *3'-O-(Methoxyacetyl)thymidin* (4) in 2 ml absol. Acetonitril werden mit einem Gemisch aus 0.5 ml 1-Äthyl-5-chlor-2-methylimidazol und 0.09 ml Phenyl-dichlorophosphat in 1.5 ml absol. Acetonitril versetzt und unter Feuchtigkeitsschutz 24 h bei Raumtemp. gerührt. Man stoppt die Reaktion durch Zugabe von 10proz. Phosphatpuffer pH 6 und extrahiert anschließend mehrfach durch Ausschütteln mit Chloroform. Der Chloroformextrakt wird über  $MgSO_4$  getrocknet, filtriert, auf ein kleines Vol. eingengt und auf 2 präparative Kieselgelplatten (40 × 20 × 0.2 cm) aufgetragen. Man entwickelt zweimal mit Äthylacetat, eluiert die Hauptzone mit Chloroform/Äthanol (2/1), konzentriert auf 2–3 ml und fällt das Reaktionsprodukt durch rasches Zugeben von destilliertem Petroläther (50–70°C) unter Rühren aus. Der farblose, amorphe Feststoff ergibt nach Waschen mit Uvasol n-Hexan und Trocknen i. Hochvak. 0.29 g (75 %) vom Schmp. ab 66°C (Sintern).

$C_{32}H_{39}N_4O_{16}P$  (766.6) Ber. C 50.13 H 5.13 N 7.31 P 4.04  
Gef. C 49.98 H 5.06 N 7.56 P 3.69

*Thymidyl-(5' → 5')-thymidin-phenylester* (17): 0.353 g 15 werden in 30 ml Dioxan/0.125 N NaOH (1/4) 30 min bei Raumtemp. behandelt. Man neutralisiert mit Dowex 50 X 4 ( $H^+$ -Form) bis pH 6, engt ein und nimmt den Rückstand in wenig Methanol auf. Nach Auftragen auf zwei präparative Kieselgelplatten (40 × 20 × 0.2 cm) wird mit Chloroform/Methanol (4/1) entwickelt und die Hauptbande mit Chloroform/Äthanol (1/1) eluiert. Man engt erneut ein, löst den Rückstand wiederum in Chloroform/Äthanol (1/1) und konzentriert nach Filtrieren von wenig Ungelöstem auf

<sup>31)</sup> l. c.<sup>30)</sup>, S. 386.

ca. 10 ml. Unter Rühren wird rasch destillierter Petroläther (50–70°C) zugegeben und das Reaktionsprodukt zur Abscheidung gebracht. Nach Absaugen, Waschen mit Uvasol n-Hexan und Trocknen i. Hochvak. erhält man 0.180 g (58%) farblosen, amorphen Feststoff vom Schmp. 167°C (nach leichtem Sintern ab 70°C).

$C_{26}H_{31}N_4O_{12}P$  (622.5) Ber. C 50.16 H 5.02 N 9.00 P 4.97  
Gef. C 50.44 H 5.21 N 9.13 P 5.22

3'-O-(4-Methoxytetrahydropyran-4-yl)thymidyl-(5' → 5')-3'-O-(methoxytetrahydropyran-4-yl)thymidin-phenylester (18): 0.311 g 17 werden in 1.5 ml 4-Methoxy-5,6-dihydro-2H-pyran mit einigen mg *p*-Toluolsulfonsäure versetzt und 20 min bei Raumtemp. gerührt, bis nach dem Dünnschichtchromatogramm sämtliches Ausgangsmaterial verschwunden ist. Man verdünnt mit Methanol und neutralisiert mit verd. Natriummethylat-Lösung. Nach Einengen wird mit Chloroform/Wasser behandelt und nach Trennung der Phasen sowie Trocknen des Chloroformextraktes mit  $MgSO_4$  auf ein kleines Vol. eingengt. Man trägt auf 2 präparative Kieselgelplatten (40 × 20 × 0.2 cm) auf, entwickelt mit Chloroform/Methanol (6/1) und eluiert die Hauptzone ( $R_F$  0.55) mit Chloroform/Äthanol (2/1). Dieser Reinigungsprozeß wird nochmals wiederholt, das Eluat sodann zum Öl eingengt, in wenig Chloroform aufgenommen und unter Rühren und raschem Zugeben von destilliertem Petroläther (50–70°C) das Reaktionsprodukt ausgefällt. Man sammelt den Niederschlag, wäscht mit Uvasol n-Hexan, trocknet i. Hochvak. und erhält so 0.333 g (78%) farblosen, amorphen Feststoff vom Schmp. 104°C (unter Schäumen).

$C_{38}H_{51}N_4O_{16}P$  (850.8) Ber. C 53.64 H 6.04 N 6.58 Gef. C 53.88 H 6.09 N 6.69

Thymidyl-(5' → 5')-thymidin (19): 0.212 g 18 werden bei Raumtemp. 7 h mit 17 ml 0.125 N NaOH und 4 ml Dioxan behandelt. Man versetzt mit einem Überschuß an Dowex 50 X 4 ( $H^{\oplus}$ -Form) bis zur stark sauren Reaktion, rührt 30 min, filtriert und engt zum Öl ein. Der Rückstand, der chromatographisch nicht völlig rein ist, wird in 1 ml Wasser gelöst und über eine Austauschersäule (20 × 1 cm) an Dowex 50 X 4 ( $H^{\oplus}$ -Form) chromatographiert. Das gesuchte Produkt befindet sich in der zweiten Fraktion (100 Tropfen), die eingengt wird. Der Rückstand wird in überschüssigem Äthanol gelöst, nach Abfiltrieren von wenig Ungelöstem wird erneut auf 2–3 ml konzentriert. Das gesuchte Reaktionsprodukt wird unter Rühren durch langsames Zugeben von destilliertem Petroläther (50–70°C) abgeschieden. Man saugt scharf ab, wäscht mit Uvasol n-Hexan, trocknet i. Hochvak. und erhält 0.076 g (57%) farblosen, amorphen Feststoff vom Schmp. 150°C (unter Schäumen).

$C_{20}H_{27}N_4O_{12}P \cdot H_2O$  (564.5) Ber. C 42.56 H 5.18 N 9.93 Gef. C 42.67 H 5.83 N 9.76

[73/75]