

Nucleotide, III¹⁾

Synthese und Eigenschaften von *O'*-benzyl-substituierten Diuridylphosphaten

Gunther Reitz^{1a)} und Wolfgang Pfeleiderer*

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

Eingegangen am 26. Februar 1975

Ausgehend von 2'-*O*-Benzyl- (2) bzw. 3'-*O*-Benzyl-5'-*O*-trityluridin (3) und Mono-*O'*-acetyl-mono-*O'*-benzyluridinen (7, 8) werden nach der Phosphorsäure-triester-Methode verschiedenartig verknüpfte Diuridylphosphate 12, 15, 18, 21, 26 und 32 dargestellt. Durch partielle Schutzgruppenabspaltung werden eine Reihe interessanter Derivate erhalten, wobei es in einzelnen Fällen gelang, die Phosphorsäuretriester in zwei diastereomere Verbindungen aufzutrennen. Die *O'*-Benzyl-Schutzgruppe bewährt sich als säure- und alkalistabile Funktion, bereitet aber bei der hydrogenolytischen Abspaltung noch gewisse Schwierigkeiten.

Nucleotides, III¹⁾

Synthesis and Properties of *O'*-Benzyl-substituted Diuridylphosphates

A series of differently interconnected diuridylphosphates 12, 15, 18, 21, 26, and 32 has been synthesised from 2'-*O*-benzyl- (2) or 3'-*O*-benzyl-5'-*O*-trityluridine (3) and mono-*O'*-acetyl-mono-*O'*-benzyluridines (7, 8) via the phosphotriester method. Partial deblocking of protecting groups leads to interesting new derivatives of which various phosphotriesters could be separated into two diastereoisomers. The *O'*-benzyl protecting group shows some advantages due to its inert character in basic and acidic hydrolyses but creates problems on cleavage by hydrogenolysis.

Die erfolgreiche Synthese von Oligoribonucleotiden ist in erster Linie ein Schutzgruppenproblem, das sich zum wesentlichen Teil auf die 2'-OH-Gruppe konzentriert. Diese Aufgabe wurde in verschiedenen Arbeitskreisen²⁻³⁹⁾ auf unterschiedliche Weise partiell gelöst, wobei nach wie vor jedoch noch gewisse Schwierigkeiten, die 3' → 2'-Isomerisierung der Internucleotidbindung betreffend, zu beseitigen blieben. Das Fehlen einer idealen Schutzgruppe für die 2'-OH-Position und ihre experimentell aufwendigen Blockierungsverfahren dürften letztlich dafür verantwortlich sein, daß die Oligonucleotidsynthese in

¹⁾ II. Mitteil.: H. Rokos, A. Myles, W. Hutzenlaub und W. Pfeleiderer, Chem. Ber. 108, 2872 (1975), vorstehend. — ^{1a)} Teil der Dissertation G. Reitz, Univ. Konstanz 1973.

²⁾ H. G. Khorana, Pure Appl. Chem. 17, 349 (1968).

³⁾ D. H. Rammler, Y. Lapidot und H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 85, 1989 (1963).

⁴⁾ R. Lohrmann und H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 86, 4188 (1964).

⁵⁾ D. Söll und H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 87, 350 (1965).

⁶⁾ R. Lohrmann, D. Söll, H. Hayatsu, E. Ohtsuka und H. G. Khorana, J. Amer. Chem. Soc. 88, 819 (1966).

⁷⁾ J. Smrt und F. Sorm, Collect. Czech. Chem. Commun. 28, 61, 887, 2415 (1963).

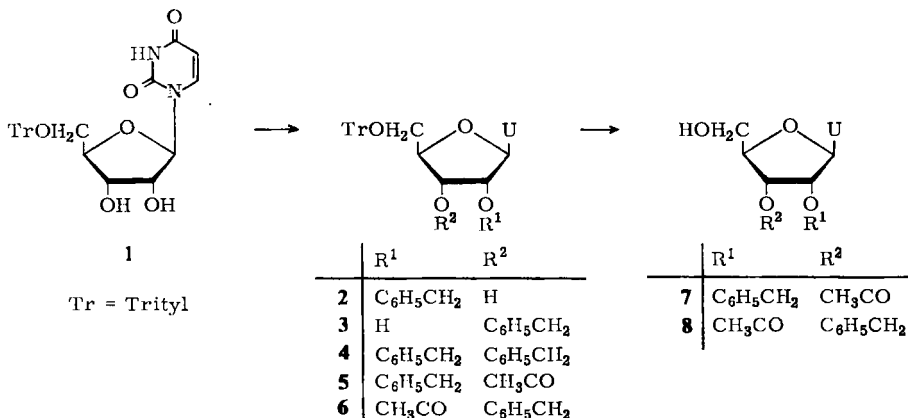
⁸⁾ S. Chladek und J. Smrt, Collect. Czech. Chem. Commun. 29, 214 (1964).

der Riboreihe nicht so weit vorangeschritten ist, wie bei den Desoxyribonucleotiden⁴⁰⁾. Einen Ausweg bietet vielleicht die Einführung der bisher nur selten verwendeten Benzyl-Schutzgruppe, die gegen saure und alkalische Einflüsse völlig stabil ist, womit 2'-O-benzyl-substituierte Nucleoside entsprechend den Desoxyribonucleosiden gehandhabt werden können. Die Abspaltung der O'-Benzylgruppe geschieht hydrogenolytisch. Reese⁴¹⁾ hat als erster die Synthese von UpU über ein 2'-O-benzyl-geschütztes Uridin beschrieben, jedoch diesen Weg in neuerer Zeit nicht weiter verfolgt.

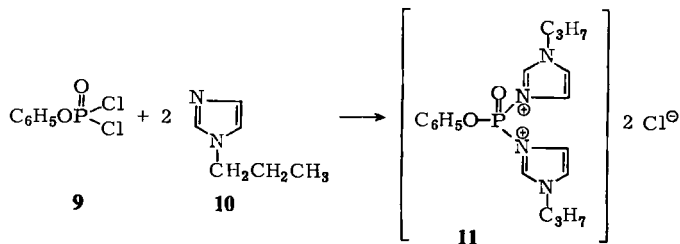
Da durch unsere eigenen Arbeiten⁴²⁻⁴⁶⁾ O'-benzyl-substituierte Uridin-, Cytidin- und Adenosin-Derivate präparativ leichter zugänglich geworden sind, haben wir auf dieser Basis zunächst durch Benzilylierung mit Benzylchlorid/NaH in Benzol/Dioxan die für diese Untersuchungen erforderlichen Ausgangssubstanzen dargestellt. Es zeigte sich, daß das 5'-O-Trityluridin (1) bei Verwendung von genau 2 Äquivalenten Natriumhydrid zu einem beträchtlichen Prozentsatz auch monobenzyliert werden kann, wobei ein Gemisch von 19% 2'-O-Benzyl- (2), 23% 3'-O-Benzyl- (3) neben 15% 2',3'-Di-O-benzyl- (4) und 31% 5'-O-Trityluridin (1) erhalten wird, dessen Trennung auf einer präparativen Kieselgel-

- ⁹⁾ S. Chladek, J. Zemlicka und F. Sorm, Collect. Czech. Chem. Commun. **31**, 1785 (1966).
¹⁰⁾ S. Chladek und J. Zemlicka, Collect. Czech. Chem. Commun. **32**, 1776 (1967).
¹¹⁾ A. Holy, J. Smrt und F. Sorm, Collect. Czech. Chem. Commun. **32**, 3809 (1967).
¹²⁾ A. Holy, Collect. Czech. Chem. Commun. **35**, 3686 (1970).
¹³⁾ J. Smrt, Collect. Czech. Chem. Commun. **37**, 846, 1870 (1972).
¹⁴⁾ J. Smrt, Tetrahedron Lett. **1972**, 3457.
¹⁵⁾ J. Smrt, Collect. Czech. Chem. Commun. **38**, 3642, 3932 (1973).
¹⁶⁾ F. Cramer und K. H. Scheit, Liebigs Ann. Chem. **679**, 150 (1964).
¹⁷⁾ F. Cramer, W. Saenger, K. H. Scheit und J. Tennigkeit, Liebigs Ann. Chem. **679**, 156 (1964).
¹⁸⁾ F. Cramer, H. J. Rhaese, S. Rittner und K. H. Scheit, Liebigs Ann. Chem. **683**, 199 (1965).
¹⁹⁾ F. Cramer, Angew. Chem. **78**, 186 (1966); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **5**, 173 (1966).
²⁰⁾ F. Cramer, K. H. Scheit und H. J. Rhaese, Liebigs Ann. Chem. **693**, 244 (1966).
²¹⁾ H. J. Rhaese, W. Siehr und F. Cramer, Liebigs Ann. Chem. **703**, 215 (1967).
²²⁾ F. Cramer und G. Schneider, Liebigs Ann. Chem. **717**, 193 (1968).
²³⁾ B. E. Griffin, M. Jarman und C. B. Reese, Tetrahedron **24**, 639 (1968).
²⁴⁾ B. E. Griffin und C. B. Reese, Tetrahedron **24**, 2537 (1968).
²⁵⁾ B. E. Griffin und C. B. Reese, Tetrahedron **25**, 4057 (1969).
²⁶⁾ J. H. van Boom, D. M. J. Burgers, G. R. Owen, C. B. Reese und R. Saffhill, J. C. S. Chem. Commun. **1971**, 869.
²⁷⁾ N. J. Cusack, C. B. Reese und J. H. van Boom, Tetrahedron Lett. **1973**, 2209.
²⁸⁾ T. Neilson, J. C. S. Chem. Commun. **1969**, 1139.
²⁹⁾ E. S. Werstiuk und T. Neilson, Can. J. Chem. **50**, 1283 (1972).
³⁰⁾ T. Neilson, E. V. Wastrowowski und E. S. Werstiuk, Can. J. Chem. **51**, 1068 (1973).
³¹⁾ E. S. Werstiuk und T. Neilson, Can. J. Chem. **51**, 1889 (1973).
³²⁾ T. Neilson und E. S. Werstiuk, J. Amer. Chem. Soc. **96**, 2295 (1974).
³³⁾ E. Ohtsuka, K. Murao, M. Ubasawa und M. Ikehara, J. Amer. Chem. Soc. **91**, 1537 (1969).
³⁴⁾ E. Ohtsuka, K. Murao, M. Ubasawa und M. Ikehara, J. Amer. Chem. Soc. **92**, 3441 (1970).
³⁵⁾ E. Ohtsuka, M. Ubasawa und M. Ikehara, J. Amer. Chem. Soc. **92**, 3445 (1970).
³⁶⁾ E. Ohtsuka, M. Ubasawa und M. Ikehara, J. Amer. Chem. Soc. **93**, 2296 (1971).
³⁷⁾ E. Ohtsuka, S. Morioka und M. Ikehara, J. Amer. Chem. Soc. **94**, 3229 (1972).
³⁸⁾ E. Ohtsuka, M. Ubasawa, S. Morioka und M. Ikehara, J. Amer. Chem. Soc. **95**, 4725 (1973).
³⁹⁾ M. Ikehara, Accounts Chem. Res. **7**, 92 (1974).
⁴⁰⁾ K. L. Agarwal, A. Yamazaki, R. J. Cashion und H. G. Khorana, Angew. Chem. **84**, 489 (1972); Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **11**, 451 (1972).
⁴¹⁾ B. E. Griffin, C. B. Reese, G. F. Stephenson und D. R. Trentham, Tetrahedron Lett. **1966**, 4349.
⁴²⁾ H. U. Blank und W. Pfeleiderer, Liebigs Ann. Chem. **742**, 1 (1971).
⁴³⁾ H. U. Blank und W. Pfeleiderer, Liebigs Ann. Chem. **742**, 16 (1971).
⁴⁴⁾ H. U. Blank, D. Frahne, A. Myles und W. Pfeleiderer, Liebigs Ann. Chem. **742**, 34 (1971).
⁴⁵⁾ A. Myles und W. Pfeleiderer, Chem. Ber. **105**, 3327 (1972).
⁴⁶⁾ W. Hutzenlaub und W. Pfeleiderer, Chem. Ber. **106**, 665 (1973).

Trockensäule sehr gut gelingt. Die Anwendung eines Überschusses an NaH führt, wie früher schon festgestellt⁴²⁾, zur ausschließlichen Bildung von 4. 2 und 3 sind nicht nur wertvolle Komponenten für Oligonucleotidsynthesen, sondern dienen auch als Ausgangsverbindungen für die Gewinnung entsprechender Verbindungen mit freier 5'-OH-Gruppe. Hierzu wurde zunächst mit Acetanhydrid in Pyridin zu 5 und 6 acyliert und anschließend durch Detritylierung in 80proz. Essigsäure 7 und 8 in guten Ausbeuten gewonnen.



Die Verknüpfung von zwei Uridineinheiten zu Diuridylphosphaten haben wir nach der Triester-Methode⁴⁷⁾ vorgenommen, um die Vorteile der chromatographischen Trennung und Reinigung auf Kieselgel nutzen zu können. Aus der Vielzahl der Phosphorylierungsreaktionen erwies sich für die gleichartige Verknüpfung zweier Nucleosidbausteine das Phenyl-dichlorophosphat (9) nach den Erfahrungen von Reese und Miarrb.^{26, 48)} als am besten. Die für die Kondensation erforderliche Base übt dabei auf den Reaktionsverlauf einen großen Einfluß aus. So haben Gulland und Smith⁴⁹⁾ die ersten Dinucleosidphosphate mit 9 und Pyridin synthetisiert, während Reese⁴⁸⁾ später zunächst 2,6-Lutidin als Base vorschlug, dieses dann jedoch aufgrund der schlechteren Ausbeuten in der Ribonucleotidreihe²⁶⁾ durch 1-Äthyl-5-chlor-2-methyl- bzw. 5-Chlor-1-methylimidazol ersetzt. Eigene Untersuchungen mit einer Reihe substituierter Imidazole⁴⁷⁾ lehrten, daß das 1-Propyl-derivat 10 die besten Ausbeuten liefert, wobei sich in Acetonitril aus den beiden Kompo-



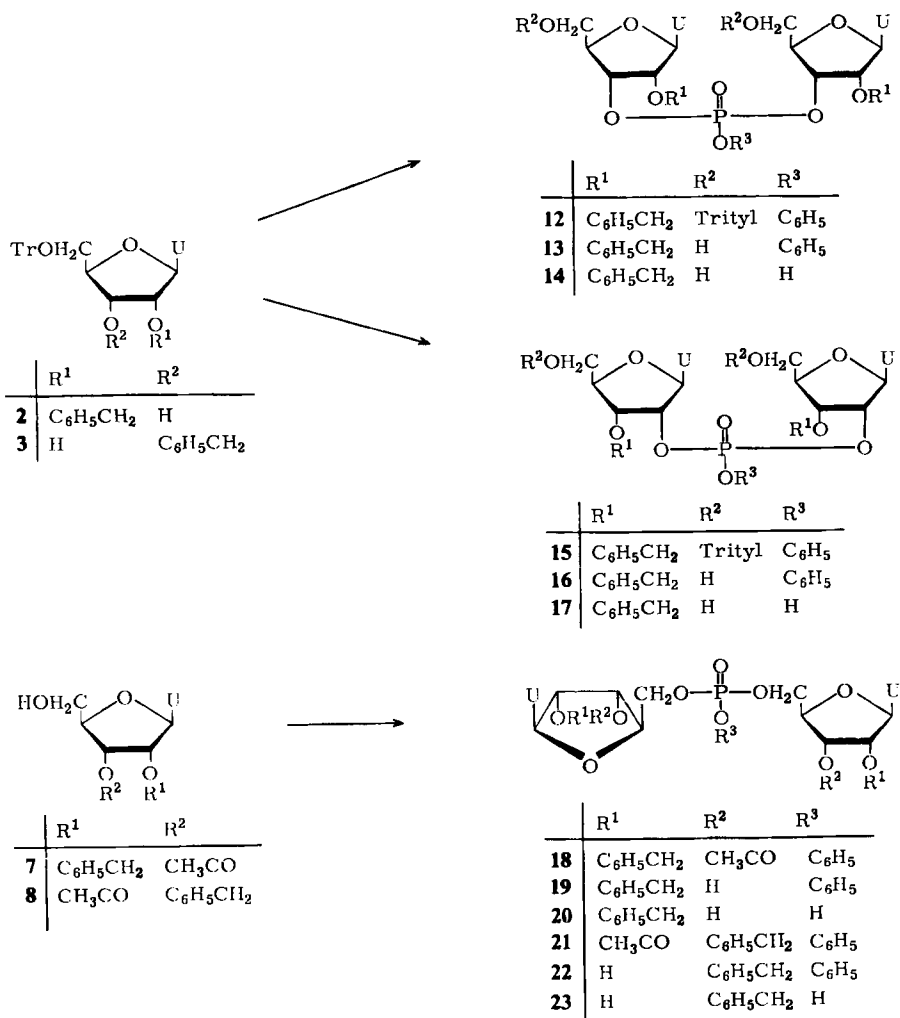
⁴⁷⁾ A. Myles, W. Hutzenlaub, G. Reitz und W. Pfeleiderer, Chem. Ber. 108, 2857 (1975).

⁴⁸⁾ C. B. Reese und R. Saffhill, J. C. S. Chem. Commun. 1968, 767.

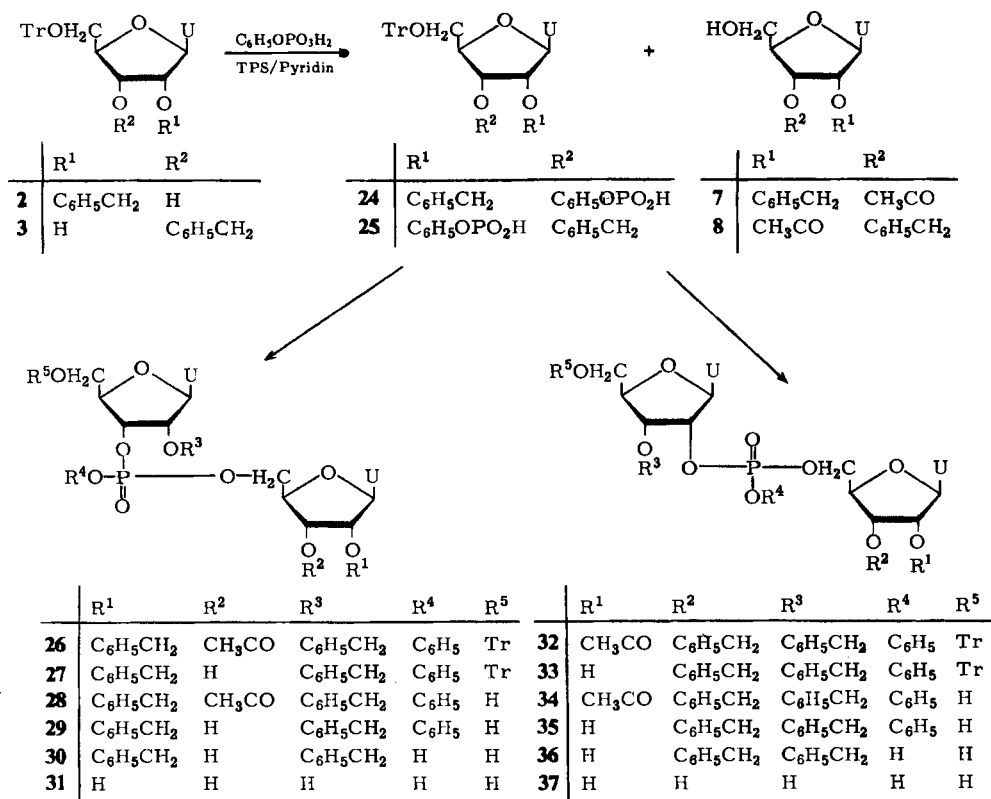
⁴⁹⁾ J. M. Gulland und H. J. Smith, J. Chem. Soc. 1948, 1532.

nenten im Phosphorsäure-phenylester-bis(1-propyl-3-imidazolium)-dichlorid (11) zunächst das eigentliche Phosphorylierungsgagens bildet. Es scheidet sich in Form eines sehr hygroskopischen Feststoffes ab, dessen analytische Zusammensetzung sich aus der Elementaranalyse und die Struktur aus dem NMR-Spektrum ergibt.

Nach dieser Phosphorylierungsmethode wurden, ausgehend vom 2'-*O*-Benzyl- (2) bzw. 3'-*O*-Benzyl-5'-*O*-trityluridin (3) und 3'-*O*-Acetyl-2'-*O*-benzyl- (7) bzw. 2'-*O*-Acetyl-3'-*O*-benzyluridin (8), die Di-uridyl-phenyl-phosphorsäuretriester 12, 15, 18 und 21 dargestellt. Es wird dabei so verfahren, daß man 2 Äquivalente Nucleosid zu dem vorgelegten Addukt 11 gibt und ein bis mehrere Tage bei Raumtemp. rührt.



15 scheidet sich hierbei kristallin aus der Reaktionslösung ab, während **12** erst nach schichtchromatographischer Reinigung und Behandlung mit Essigester in Kristallen erhalten werden konnte. Obwohl die Reaktionszeiten recht lang waren, blieben die Ausbeuten vermutlich als Ausdruck einer gewissen sterischen Hinderung durch die großen Schutzgruppen relativ niedrig. Für die Synthese ungleichartig d. h. 2' → 5'- und 3' → 5'-verknüpfter Diuridylphosphate erwies sich dann die Kondensation mit 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfochlorid (TPS) in Pyridin⁴⁾ wie schon *Reese et al.*²⁶⁾ bei der Darstellung ähnlicher Verbindungen gefunden haben, als überlegen. Hierbei wird **2** bzw. **3** zunächst mit Phenylphosphat und TPS in die Phenyl-diester **24** und **25** übergeführt, die ohne Isolierung mit einem Überschuß an den Komponenten **7** bzw. **8** zu den Triestern **26** und **32** weiterkondensiert werden. Die Ausbeuten liegen bei 60% und man findet daneben in geringen Mengen die Selbstkondensationsprodukte **12** und **18** bzw. **15** und **21**.



Die Verbindungen **26** und **32** stellen jeweils Gemische zweier diastereomerer Triester dar, die bei der Synthese durch die Bildung eines neuen Chiralitätszentrums am Phosphor entstehen. Ihre präparative Trennung ist uns auf dieser Stufe noch nicht gelungen, wohl aber nach Abspaltung bestimmter Schutzgruppen in einzelnen Fällen, wie weiter unten berichtet wird.

Die verschiedenen vollgeschützten Triester wurden dann zur partiellen Schutzgruppenabspaltung in bekannter Weise alkalisch und sauer hydrolysiert. **18**, **21**, **26** und **32** werden in einem Dioxan/0.1 N NaOH-Gemisch innerhalb von 5 min vollständig zu **19**, **22**, **27** und **33** entacetyliert. Für die Detritylierung von **12**, **15**, **26** und **32** benötigt man in Dioxan/Ameisensäure/Wasser (3/6/1) im allgemeinen 4 h, wobei man chromatographisch Nebenprodukte beobachten kann, die sich allerdings bei der Auftrennung und Reinigung der Verbindungen **13**, **16**, **28** und **34** an Kieselgel wieder zersetzen. Die Natur dieser Substanzen wurde bisher noch nicht untersucht.

Aufeinanderfolgende Entacetylierung und Detritylierung von **26** und **32** liefert **29** und **35**, die sich analog den Ausgangssubstanzen sowie **27** und **28** bzw. **33** und **34** aus Gemischen zweier diastereomerer Phosphorsäuretrieste zusammensetzen müssen. Es gelingt schließlich auch, die Verbindungen **28**, **29** und **33** durch präparative Schichtchromatographie auf Kieselgel jeweils in die beiden Diastereomeren, die in nachfolgender Arbeit näher charakterisiert werden, aufzutrennen und mit ihrer Isolierung einen Beweis für dieses stereochemische Phänomen zu liefern. Unseres Wissens ist eine entsprechende Trennung bislang nur *Scheit*⁵⁰⁾ beim 5'-O-(Monomethoxytrityl)desoxyadenylyl-(3' → 5')-thymidinbenzylester geglückt, ohne daß dort jedoch die speziellen Strukturverhältnisse näher kommentiert wurden, während *Ts'o* et al.^{51, 52)} das Vorliegen von Diastereomerenpaaren bei Phosphotriester-Derivaten der Nucleotidreihe NMR-spektroskopisch nachgewiesen haben.

Die Hydrolyse der Phosphorsäurephenylestergruppierung wird in bekannter Weise durch verlängerte Einwirkung von 0.1 N NaOH in Wasser/Dioxan bewirkt, wobei man die Verbindungen **14**, **17**, **20**, **23**, **30** und **36** erhält. In Analogie zu den Befunden in der Thymidylthymidin-Reihe ist diese alkalische Verseifung von **19**, **29** und vermutlich auch **13** von einer partiellen Isomerisierung der Internucleotid-Bindung begleitet, denn man findet bei der Chromatographie auf Celluloseplatten aus **19** neben **20** eine kleine Menge an **30**, das als Hauptprodukt aus **29** neben einer Spur **20** gebildet wird. Ob bei der Entphenylierung von **13** zu **14** ebenfalls Isomerisierung zu **30** eintritt, läßt sich aufgrund der sehr ähnlichen R_F -Werte von **14** und **30** nicht mit Sicherheit sagen, jedoch aus mechanistischen Überlegungen heraus vermuten.

Damit steht auch in Einklang, daß 3'-O-benzyl-substituierte Derivate wie **16**, **22** und **35** bei der alkalischen Verseifung zu **17**, **23** und **36** keine Isomerisierung zu erkennen geben, da dies die unwahrscheinliche Bildung eines (2' → 5')-Cyclophosphates, d. h. eines Siebenring-Intermediären, voraussetzen würde.

Für die Abspaltung der Benzylgruppen mit Pd/H₂ in Wasser konnten wir aus Substanzmangel noch nicht die optimalen Reaktionsbedingungen finden, so daß neben der Debenzilylierung auch partielle Hydrierung des Aglycons in Kauf genommen werden muß. Aus **30** und **36** waren somit nur Substanzgemische erhältlich, in denen das 3' → 5'- (**31**) bzw. 2' → 5'-UpU (**37**) nur chromatographisch nachgewiesen werden konnte.

Diese Resultate lassen erkennen, daß die Problematik der Benzylschutzgruppe nach wie vor in ihrer vollständigen, selektiven Abspaltung beruht, ein Ziel das möglicherweise in künftigen Untersuchungen erreicht werden kann.

⁵⁰⁾ K. H. Scheit, *Tetrahedron Lett.* **1967**, 3243.

⁵¹⁾ P. S. Miller, K. N. Fang, N. S. Kondo und P. O. P. Ts'o, *J. Amer. Chem. Soc.* **93**, 6657 (1971).

⁵²⁾ L. S. Kan, J. C. Barrett, P. S. Miller und P. O. P. Ts'o, *Biopolymers* **12**, 2225 (1973).

Physikalische Daten von Uridin-Derivaten

	UV-Spektren in Methanol λ_{\max} (nm)	lg ϵ	Dünnschichtchromatogramme ^{a)}			Papierchromatogramme ^{b)}			
			Äthyl- acetat	Äthanol/ Chloroform/ (19/1)	Chloroform/ Äthanol (9/1)	n-Butanol/ 5 N AcOH (2/1)	Isopropylalkohol konz. NH ₃ /H ₂ O (7/1/2)	(R _F -Werte)	
1	262	3.98							
2	262	3.94	0.78	0.76	0.89				
3	262	3.99	0.62	0.53	0.76				
4	263	3.98							
5	259	4.00							
6	259	4.00							
7	259	4.01	0.35	0.21	0.52				
8	258	4.03	0.32	0.17	0.47				
12	259	4.26							
13	258	4.27	0.02	0.05	0.33				
14	261	4.24							
15	259	4.27	0.70	0.60	0.94	0.39	0.67	0.75	0.80
16	258	4.26	0.03	0.04	0.30				
17	259	4.24							
18	258	4.23	0.16	0.19	0.57	0.44	0.70	0.77	0.77
19	260	4.23	0.03	0.09	0.42				
20	261	4.14				0.40	0.63	0.75	0.81
21	257	4.29	0.12	0.16	0.53				
22	259	4.28	0.02	0.04	0.26				

Papierchromatogramme^{b)}(R_F-Werte)

Isopropylalkohol

4proz. Natrium-

citrat

(7/1/2)

Ammonium-

chlorid

3proz.

Ammonium-

chlorid

0.80

0.75

0.77

0.77

0.75

0.81

0.81

0.81

0.81

0.81

0.81

0.81

0.81

0.81

0.81

0.81

0.81

Tab. (Fortsetzung)

λ_{max} (nm)	UV-Spektren in Methanol lg ϵ	Dünnschichtchromatogramme ^{a)}		Papierchromatogramme ^{b)}				
		Äthyl- acetat	Chloroform/ Äthanol (19/1)	Chloroform/ Äthanol (9/1)	n-Butanol/ 5 N AcOH (2/1)	Isopropylalkohol konz. NH ₃ /H ₂ O (7/1/2)	(R _F -Werte)	
23	260				0.38	0.58	0.75	0.78
26	258	0.48	0.40	0.78				
27	258	0.24	0.22	0.60				
28 a ^{c)}	258	0.07	0.10	0.44				
28 b	258	0.05	0.08	0.42				
29 a	260	0.03	0.09	0.44				
29 b	260	0.02	0.05	0.33				
30	260				0.39	0.67	0.75	0.80
32	258	0.35	0.28	0.67				
33 a	259	0.20	0.18	0.54				
33 b	260	0.12	0.14	0.49				
34	258	0.05	0.08	0.42				
35	259	0.01	0.03	0.20				
36	260				0.40	0.65	0.77	0.78

a) Fertigfolien der Fa. Schleicher & Schüll, F 1500 LS 254.

b) Chromatographiepapier der Fa. Schleicher & Schüll, 2043b Mgl.

c) Die Buchstaben a und b bezeichnen die Diastereomeren.

Die Charakterisierung der synthetisierten Verbindungen gründet sich im allgemeinen auf UV-Spektren und chromatographische Vergleiche (Tab.) sowie Elementaranalysen.

Diese Arbeit wurde durch Mittel der *Deutschen Forschungsgemeinschaft* und des *Fonds der Chemischen Industrie* unterstützt.

Experimenteller Teil

Analytische Dünnschicht- und Papierchromatographie: auf Fertigfolien der Firma C. Schleicher & Schüll F 1500 LS 254 bzw. 2043 b Mgl. Für die präparative Dünnschichtchromatographie dienten selbst gestrichene Platten (40 × 20 × 0.2 cm) mit „Kieselgel Merck PF 254 für die präparative Schichtchromatographie“. Zur Trockensäulenchromatographie wurde „Kieselgel Merck für die Säulenchromatographie“ (0.05–0.2 mm) mit 10 Gew.-% H_2O und 0.5% Fluoreszenzindikator Merck F 254 gut vermischt und dann unter ständigem Schütteln in Nyloenschläuche gefüllt. UV-Spektren: Cary-Recording Spektralphotometer, Modell 1115/15. Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

5'-O-Trityluridin (1): Nach der Vorschrift von *Michelson* und *Todd*⁵³⁾ werden 22 g Uridin mit 25 g Tritylchlorid (aus C_6H_6 umkrist.) in 250 ml absol. Pyridin über Nacht stehengelassen. Dann wird 2 h unter Rückfluß gekocht, nach dem Abkühlen unter starkem Rühren in 2 Liter Eiswasser eingetropt, der ausgefallene Niederschlag abgesaugt und im Exsikkator getrocknet. Nach Lösen in ca. 200 ml $CHCl_3$ wird auf eine Kieselgelsäule (22 × 7 cm) in Chloroform gegeben und zunächst mit 3 Liter Chloroform/Äthylacetat (9/1) voreluert und dann die Titelsubstanz mit Äthylacetat von der Säule gewaschen. Nach Umkristallisieren aus Äthanol erhält man 35 g (80%) farblose Kristalle, die bei 80°C i. Vak. getrocknet, Schmp. 195–197°C zeigen. Lit.⁵³⁾ Schmp. 200°C.

*2'-O-Benzyl-5'-O-trityluridin (2)*⁴¹⁾ und *3'-O-Benzyl-5'-O-trityluridin (3)*: In einem gut getrockneten 2-Liter-Dreihalskolben mit Rückflußkühler und KPG-Rührer werden 37 g **1** (76 mmol) in 350 ml absol. Dioxan und 350 ml absol. Benzol unter Rühren gelöst. Dann setzt man 3.65 g NaH (152 mmol) (6.95 g NaH in Öl, 52.4proz.) und 0.69 ml Wasser (38 mmol) zu, erhitzt die viskose Lösung anschließend im Ölbad auf 90°C und tropft unter intensivem Rühren 27.9 g Benzylchlorid (228 mmol) zu. Es wird 16 h bei dieser Temp. benzyliert, wobei sich im Chromatogramm (Fertigfolien, Chloroform/Äthylacetat = 3/2) die beiden Monobenzyl-Derivate **2** und **3**, das 2',3'-Di-O-benzyl- (**4**) und 5'-O-Trityluridin (**1**) in etwa gleichen Mengen zeigen. Die Reaktion wird durch Zugabe von 500 ml Wasser abgebrochen, mit Eisessig neutralisiert, die wäßrige und organische Phase sodann getrennt. Die organische Phase wird nochmals mit 200 ml Wasser gewaschen und die beiden vereinigten wäßrigen Phasen anschließend mit 200 ml $CHCl_3$ behandelt. Die organischen Phasen werden vereinigt, im Rotationsverdampfer eingeeengt, in 100 ml $CHCl_3$ gelöst und auf drei Trockensäulen⁵⁴⁾ (110 × 4.7 cm) zu gleichen Teilen aufgetragen. Man entwickelt jeweils von oben mit 1200 ml Chloroform/Äthylacetat, wobei das auslaufende Eluat, das die schnell wandernden Verunreinigungen enthält, verworfen wird. Die interessierenden Substanzen sind in vier mit der UV-Lampe (254 nm) sichtbare Zonen aufgetrennt, und zwar in der Reihenfolge **1**, **3**, **2** und **4**. Die Zonen werden ausgeschnitten und jeweils mit Chloroform/Äthanol (2/1) eluiert und eingeeengt. Man erhält 7.6 g (15%) amorphes farbloses 2',3'-Di-O-benzyl-5'-O-trityluridin (**4**) vom Schmp. 85–90°C.

⁵³⁾ A. M. Michelson und A. R. Todd, J. Chem. Soc. 1956, 3459.

⁵⁴⁾ B. Loev und M. M. Goodman, Chem. Ind. (London) 1967, 2026.

Das 2'-*O*-Benzyl-5'-*O*-trityluridin (2) wird in ca. 300 ml Benzol siedend gelöst und mit Cyclohexan bis zur beginnenden Opaleszenz versetzt. Nach Animpfen und Abkühlen erhält man 8.35 g (19%) farblose Kristalle vom Schmp. 110–112°C.

$C_{35}H_{32}N_2O_6$ (576.7) Ber. C 72.91 H 5.59 N 4.86 Gef. C 72.84 H 5.68 N 4.71

Das 3'-*O*-Benzyl-5'-*O*-trityluridin (3) liefert, aus Essigester umkristallisiert, 10.1 g (23%) farblose Kristalle vom Schmp. 172–173°C.

$C_{35}H_{32}N_2O_6$ (576.7) Ber. C 72.91 H 5.59 N 4.86 Gef. C 72.88 H 5.59 N 4.96

Ferner lassen sich noch 11.8 g (31%) 5'-*O*-Trityluridin (1) gewinnen.

3'-*O*-Acetyl-2'-*O*-benzyl-5'-*O*-trityluridin (5): 1.0 g 2 in 10 ml absol. Pyridin werden mit 2.0 g Acetanhydrid versetzt und 24 h bei Raumtemp. gerührt. Die Reaktionslösung wird in 200 ml Eiswasser eingetroppt, der Niederschlag filtriert und getrocknet. Anschließend wird in wenig $CHCl_3$ gelöst und auf zwei Kieselgelplatten (40 × 20 × 0.2 cm) zur präparativen Auftrennung aufgetragen. Es wird mehrfach mit Chloroform/Äthylacetat (5/1) entwickelt, die Hauptfraktion mit Essigester eluiert und im Rotationsverdampfer eingengt (0.81 g). Die Reinigung über die Platte wird wiederholt, die Substanz nach Eluieren und Einengen in wenig $CHCl_3$ gelöst und durch Eintropfen in 200 ml dest. Petroläther (50–70°C) ausgefällt. Das amorphe Produkt wird scharf abgesaugt, mit Hexan p. a. gewaschen und liefert nach Trocknen im Vakuumexsikkator 0.71 g (67%) farbloses Pulver vom Schmelzintervall 90–130°C.

$C_{37}H_{34}N_2O_7$ (618.7) Ber. C 71.83 H 5.54 N 4.53 Gef. C 71.63 H 5.53 N 4.58

2'-*O*-Acetyl-3'-*O*-benzyl-5'-*O*-trityluridin (6): Analog erhält man aus 1 g 3 0.79 g (74%) amorphes, farbloses Pulver vom Schmelzintervall 84–120°C.

$C_{37}H_{34}N_2O_7$ (618.7) Ber. C 71.83 H 5.54 N 4.53 Gef. C 71.63 H 5.53 N 4.58

3'-*O*-Acetyl-2'-*O*-benzyluridin (7): 8.0 g 2 werden in 100 ml absol. Pyridin mit 18 ml Acetanhydrid durch 24stdg. Rühren bei Raumtemp. acetyliert. Anschließend wird in 1.5 Liter Eiswasser eingetroppt, filtriert und der Niederschlag im Exsikkator getrocknet. Zur Abspaltung des Tritylrestes wird in 80 ml Eisessig gelöst, mit 20 ml Wasser versetzt und 15 min zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen und Stehenlassen im Kühlschrank wird das abgeschiedene Tritanol abfiltriert und das Filtrat im Rotationsverdampfer eingengt. Zur Entfernung der Essigsäure wird zweimal mit Wasser nachgedampft, dann in 20 ml Chloroform gelöst und auf 12 Platten (40 × 20 × 0.2 cm) aufgetragen. Dreifachentwicklung mit Chloroform/Äthylacetat (1/1) und Eluieren der Hauptzone mit Chloroform/Äthanol (2/1) ergibt 4.8 g Rohprodukt. Man löst in Äthylacetat, filtriert durch Kieselgur, engt auf ca. 15 ml ein und tropft in 750 ml Petroläther (50–70°C). Der Niederschlag wird gesammelt, getrocknet (4.4 g), dann in 200 ml Essigester gelöst und soviel Petroläther zugegeben, daß die Substanz gerade noch nicht ausfällt. Nach Zugabe von Impfkristallen scheiden sich 3.77 g (73%) farblose Kristalle vom Schmp. 140–141°C aus.

$C_{18}H_{20}N_2O_7$ (376.4) Ber. C 57.44 H 5.35 N 7.44 Gef. C 57.58 H 5.39 N 7.49

2'-*O*-Acetyl-3'-*O*-benzyluridin (8): Wie vorstehend aus 5 g 3 in 50 ml Pyridin mit 9.5 ml Acetanhydrid. Das acetylierte Produkt (6) wird in 100 ml siedender 80proz. Essigsäure in 15 min detriptyliert. Es wird auf sechs Platten (40 × 20 × 0.2 cm) mit Chloroform/Äthylacetat (3/2) mehrfach entwickelt, mit Essigester eluiert und aus Äthanol zweimal umkristallisiert, wodurch 2.34 g (72%) farblose Kristalle vom Schmp. 186–187°C erhalten werden.

$C_{18}H_{20}N_2O_7$ (376.4) Ber. C 57.44 H 5.35 N 7.44 Gef. C 57.55 H 5.32 N 7.63

Phosphorsäure-phenylester-bis(1-propyl-3-imidazolium)-dichlorid (11): 0.42 g Phenyl-dichlorophosphat (9) und 0.48 g 1-Propylimidazol (10) werden in einer Zweischenkelapparatur in je 3 ml absol. Acetonitril gelöst, dann vereinigt und bei Raumtemp. gerührt. Die Lösung färbt sich gelb, nach kurzer Zeit beginnt die Abscheidung eines farblosen Niederschlages. Nach einigen Stunden

Rühren wird zentrifugiert, dekantiert und dann noch zweimal mit wenigen ml kaltem absol. Acetonitril durch Aufschäumen und erneutes Zentrifugieren gewaschen, bis die überstehende Lösung farblos geworden ist. Der sehr hygroskopische Rückstand wird i. Hochvak. über P_4O_{10} getrocknet. Die Substanz zerfließt sofort an der Luft und ist schwer zu handhaben. Die Ausbeute an isoliertem Feststoff hängt stark von den Reinigungsoperationen ab.

$C_{18}H_{25}Cl_2N_4O_2P$ (431.3) Ber. C 50.13 H 5.84 Cl 16.44 N 12.99 P 7.18
Gef. C 51.24 H 7.25 Cl 15.93 N 13.09 P 7.92

2'-O-Benzyl-5'-O-trityluridylyl-(3' → 3')-2'-O-benzyl-5'-O-trityluridin-phenylester (**12**): 4.0 g (6.93 mmol) **2** werden in 20 ml absol. CH_3CN mit 1 ml 1-Propylimidazol (**10**) und 0.6 ml **9** umgesetzt. Es wird 4 Tage bei Raumtemp. gerührt, mit 50 ml Phosphatpuffer pH 5 hydrolysiert, dreimal mit 20 ml Chloroform ausgeschüttelt, eingengt und auf zehn Kieselgelplatten (40 × 20 × 0.2 cm) mit Chloroform/Äthylacetat (4/1) mehrfach entwickelt. Die starke mittlere Zone wird abgekratzt und eluiert. Nach Einengen erhält man 2.4 g, die nach Umkristallisation aus 20 ml Äthylacetat 2.1 g (47%) farblose Kristalle vom Schmp. 227–228°C liefern.

$C_{76}H_{67}N_4O_{14}P$ (1291.4) Ber. C 70.69 H 5.23 N 4.34 P 2.40
Gef. C 70.69 H 5.17 N 4.25 P 2.68

Allgemeine Vorschrift zur Detritylierung mit Dioxan/Wasser/Ameisensäure (3/1/6)

0.25 mmol **12**, **15**, **26** und **32** in 30 ml Dioxan werden mit 10 ml Wasser sowie 60 ml Ameisensäure versetzt und 4 h bei Raumtemp. gerührt. Anschließend wird im Rotationsverdampfer eingengt und zweimal mit Wasser nachgedampft, bis kein Geruch von Ameisensäure mehr wahrnehmbar ist. Der Rückstand wird in 2–4 ml Chloroform/Äthanol aufgenommen, auf eine präparative Kieselgelplatte (40 × 20 × 0.2 cm) aufgetragen und mehrfach entwickelt. Die Hauptzone, die meist infolge der Mehrfachentwicklung in mehrere Unterzonen weiter aufgespalten erscheint, wird gemeinsam mit Chloroform/Äthanol (2/1) eluiert, eingengt, erneut in Aceton/Chloroform gelöst und zur Entfernung von Kieselspuren durch Kieselgur filtriert. Nach Einengen auf wenige ml wird die Substanz mit Petroläther ausgefällt. Der Niederschlag wird scharf abgesaugt, mit n-Hexan p. a. gewaschen und über P_4O_{10} und Paraffin i. Vak. getrocknet.

2'-O-Benzyluridylyl-(3' → 3')-2'-O-benzyluridin-phenylester (**13**): 0.32 g (0.25 mmol) **12** werden wie vorstehend detrityliert. Die chromatographische Trennung wird durch Mehrfachentwicklung mit Äthylacetat auf einer Kieselgelplatte vorgenommen. Man gewinnt 0.14 g (69%) amorphes, farbloses Pulver vom Schmp. 105–115°C.

$C_{38}H_{39}N_4O_{14}P$ (806.7) Ber. C 56.58 H 4.87 N 6.95 P 3.84
Gef. C 56.51 H 5.08 N 7.14 P 3.78

Ein abweichender Analysenwert für Stickstoff wird bei derartigen Substanzen häufiger beobachtet, was vermutlich in der Bestimmungsmethode selbst begründet liegt.

Allgemeine Vorschrift zur Triester-Verseifung

0.25 mmol Triester in 60 ml Dioxan werden mit 30 ml 0.3 N NaOH versetzt und 7 h bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit Dowex 50 (H^+ -Form) behandelt, im Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand umkristallisiert. Falls Umkristallisation nicht möglich ist, muß durch präparative Schichtchromatographie gereinigt werden. Man löst hierzu die Substanz in wenig Methanol oder Wasser, trägt auf zwei Kieselgelplatten (40 × 20 × 0.2 cm) auf und entwickelt je nach Aktivität der Schicht mit Äthylacetat/Äthanol (4/1 bzw. 3/1), Äthylacetat/Isopropylalkohol (2/1) oder reinem Isopropylalkohol drei- bis viermal. Man eluiert die Hauptzone mehrfach mit reinem Äthanol, engt ein, löst in Wasser und gibt über eine Säule (10 × 2.5 cm) mit Dowex 50 (H^+ -Form). Nach erneutem Einengen des Eluates wird in Methanol gelöst und langsam unter Rühren in Äther eingetropf. Der Niederschlag wird gesammelt, mit n-Hexan p. a. unter Feuchtigkeitsausschluß gewaschen und über P_4O_{10} i. Vak. getrocknet.

2'-O-Benzyluridylyl-(3' → 3')-2'-O-benzyluridin (14): 0.32 g **12** (0.25 mmol) werden nach den allgemeinen Vorschriften zunächst verseift, dann detrityliert und zur Auftrennung auf zwei Kieselgelplatten in wenig C₂H₅OH gelöst. Es wird dreifach mit Äthylacetat/Äthanol (7/3) entwickelt. Nach Elution der Hauptzone und Behandlung mit Ionenaustauscher (H[⊕]-Form) wird in 20 ml Methanol heiß gelöst. Nach Abkühlen und Stehenlassen im Kühlschrank erhält man 0.105 g (58 %) mikrokristallines, farbloses Pulver, das ab 110°C sintert, bei 235°C schmilzt.

C₃₂H₃₅N₄O₁₄P (730.6) Ber. C 52.60 H 4.83 N 7.67 P 4.24
Gef. C 52.73 H 4.58 N 7.58 P 3.90

3'-O-Benzyl-5'-O-trityluridylyl-(2' → 2')-3'-O-benzyl-5'-O-trityluridin-phenylester (15): 4.0 g **3** in 20 ml absol. CH₃CN werden mit 1 ml 1-Propylimidazol (**10**) und 0.6 ml **9** umgesetzt. Schon nach einigen Stunden fällt ein farbloses Produkt aus. Es wird 4 Tage gerührt, dann von 1.9 g kristalliner Substanz abfiltriert, die nach Umkristallisation aus 100 ml CH₃CN (Kühlschrank) 1.65 g (37 %) farblose Nadeln vom Schmp. 160–162°C liefert.

C₇₆H₆₇N₄O₁₄P (1291.4) Ber. C 70.69 H 5.23 N 4.34 P 2.40
Gef. C 70.80 H 5.53 N 4.40 P 2.69

3'-O-Benzyluridylyl-(2' → 2')-3'-O-benzyluridin-phenylester (16): 0.32 g (0.25 mmol) **15** werden gemäß der allgemeinen Vorschrift detrityliert. Bei der Chromatographie mit Äthylacetat/Chloroform (7/3) zeigen sich nach vierfacher Entwicklung mehrere nahe beieinanderliegende Zonen, deren Substanzen sich nach Elution als chromatographisch identisch erwiesen. Man erhält 0.145 g (72 %) amorphen, farblosen Feststoff vom Schmp. 105–120°C.

C₃₈H₃₉N₄O₁₄P · 2H₂O (842.7) Ber. C 54.16 H 5.14 N 6.65 Gef. C 54.30 H 5.12 N 6.97

3'-O-Benzyluridylyl-(2' → 2')-3'-O-benzyluridin (17): 0.25 g **15** werden nach der allgemeinen Vorschrift zunächst detrityliert. Beim präparativen Chromatographieren auf einer 40-cm-Kieselgelplatte mit Äthylacetat (Einfachentwicklung) zeigen sich außer dem vorlaufenden Tritanol drei Zonen, die gemeinsam eluiert, eingengt und in 60 ml Dioxan + 30 ml 0.3 N NaOH verseift werden. Nach Behandlung mit Dowex 50(H[⊕]-Form) und Einengen wird in absol. Äthanol gelöst, auf 2–3 ml konzentriert und sehr langsam 30 ml Petroläther (50–70°C) zugetropft. Nach Filtrieren, Waschen mit Hexan p. a. und Trocknen bleiben 0.09 g (63 %) farbloser, amorpher Feststoff, der ab 105°C sintert, bei 155°C schmilzt.

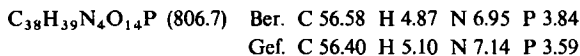
C₃₂H₃₅N₄O₁₄P (730.6) Ber. C 52.60 H 4.83 N 7.67 P 4.24
Gef. C 52.21 H 5.05 N 7.15 P 3.5

3'-O-Acetyl-2'-O-benzyluridylyl-(5' → 5')-3'-O-acetyl-2'-O-benzyluridin-phenylester (18): 1.8 g **7** werden nach der allgemeinen Vorschrift in 20 ml absol. Acetonitril mit 0.69 ml 1-Propylimidazol (**10**) und 0.40 ml **9** umgesetzt. Es wird 5 Tage gerührt und über vier Kieselgelplatten mit Äthylacetat aufgearbeitet. Die wandernde Hauptzone wird eluiert (0.16 g), eingengt und der Rückstand in Chloroform gelöst. Nach Filtrieren durch Kieselgur wird auf wenige ml konzentriert und durch Eintropfen in Petroläther die Substanz gefällt. Es scheiden sich 1.41 g (66 %) amorpher, farbloser Feststoff ab, der ab 84°C langsam sintert.

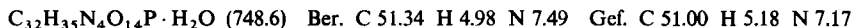
C₄₂H₄₃N₄O₁₆P (890.8) Ber. C 56.63 H 4.87 N 6.29 P 3.48
Gef. C 56.40 H 4.77 N 6.41 P 3.68

2'-O-Benzyluridylyl-(5' → 5')-2'-O-benzyluridin-phenylester (19): 0.2 g **18** werden in 80 ml einer Lösung aus Dioxan/0.2 N NaOH (1/1) 8 min bei Raumtemp. gerührt. Die Substanz löst sich im Verlauf der Reaktion auf. Nach Neutralisation (Dowex 50, H[⊕]-Form) und Einengen im Rotationsverdampfer wird auf einer Kieselgelplatte (40 × 20 × 0.2 cm) mit Äthylacetat zweifach entwickelt. Die Hauptzone wird eluiert, eingengt, der Rückstand in wenig Chloroform gelöst und durch Zu-

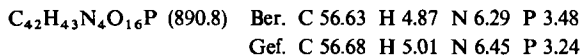
gabe von Petroläther unter Rühren 0.10 g (55%) amorphes, farbloses Festprodukt vom Schmp. 85–100°C ausgefällt.



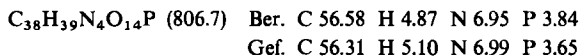
2'-O-Benzyluridylyl-(5' → 5')-2'-O-benzyluridin (20): Aus 0.15 g **18** werden gemäß der allgemeinen Vorschrift durch Behandlung mit 0.3 N NaOH die alkalilabilen Schutzgruppen entfernt. Sodann wird mit Dowex 50 (H⁺-Form) in das Neutralkmolekül übergeführt, eingeengt, der Rückstand in 3 ml Methanol gelöst und das Produkt durch Eintropfen in Äther ausgefällt. Nach Trocknen i. Vak. erhält man 0.070 g (57%) farblosen, amorphen Feststoff, der ab 120°C sintert, bei 160°C schmilzt. Das Material ist chromatographisch nicht einheitlich, sondern zeigt auf Cellulosefolien im System Isopropylalkohol/1proz. Ammoniak (3/1) eine zweite, durch Isomerisierung entstandene und mit **30** identische Komponente.



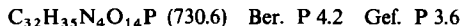
2'-O-Acetyl-3'-O-benzyluridylyl-(5' → 5')-2'-O-acetyl-3'-O-benzyluridin-phenylester (21): 2.0 g **8** werden in 30 ml absol. CH₃CN mit 0.76 ml 1-Propylimidazol (**10**) und 0.45 ml **9** umgesetzt. Nach 2 Tagen wird wie üblich aufgearbeitet. Die Trennung auf fünf Kieselgelplatten durch Dreifachentwicklung mit Chloroform/Äthylacetat (1/1) liefert neben 0.21 g (10.5%) Ausgangssubstanz **8** zunächst 1.8 g Reaktionsprodukt. Es muß erneut über vier Kieselgelplatten mit Chloroform/Äthanol (19/1) durch Mehrfachentwicklung gereinigt werden. Nach Eluieren der Hauptzone, Einengen und Ausfällen mit Petroläther verbleiben 1.61 g (68%) amorpher, farbloser Feststoff vom Schmp. ab 78°C (beginnendes Erweichen).



3'-O-Benzyluridylyl-(5' → 5')-3'-O-benzyluridin-phenylester (22): 0.20 g **21** werden in 60 ml einer Lösung aus Dioxan/0.2 N NaOH (1/1) 8 min bei Raumtemp. gerührt. Es wird mit Dowex 50 (H⁺-Form) neutralisiert, eingeengt und der Rückstand auf einer Platte mit Äthylacetat zweifach entwickelt. Die Hauptzone wird eluiert, mit Petroläther ausgefällt und liefert nach Trocknen i. Vak. 0.105 g (58%) amorphes, farbloses Feststoff vom Schmp. 85–98°C.



3'-O-Benzyluridylyl-(5' → 5')-3'-O-benzyluridin (23): 0.050 g (0.0561 mmol) **21** werden mit 15 ml Dioxan + 7.5 ml 0.3 N NaOH versetzt und in 7 h entacetyliert und entphenyliert. Nach Einengen im Rotationsverdampfer wird mit Dowex 50 (H⁺-Form) behandelt, eingeengt, der Rückstand in ca. 2 ml Methanol gelöst und auf einer Kieselgelplatte (40 × 20 × 0.2 cm) einmal mit Äthylacetat und dreimal mit Isopropylalkohol entwickelt. Die Hauptzone wird mit 4 mal 100 ml Äthanol eluiert und ergibt nach Einengen 0.035 g Rückstand. Man löst in wenig Methanol und fällt mit Petroläther 0.026 g (63%) farblosen, amorphen Feststoff, der bei 70°C sintert, bei 150°C schmilzt.



Allgemeine Vorschrift zur Synthese ungleichartig verknüpfter Diuridylyl-phosphate

a) In einen trockenen 100-ml-Dreihalskolben wird das Ausgangsuridin **2** oder **3** gegeben. Dann wird unter schwachem N₂-Strom vorsichtig ausgeheizt, bevor das absol. Acetonitril, 2.2 Äquivalente 1-Propylimidazol (**10**) und 1.1 Äquivalente **9** unter schwachem N₂-Strom zugegeben werden. Es wird 30 min bis 1 h gerührt, bis sich im Dünnschichtchromatogramm (Äthylacetat) keine Ausgangssubstanz mehr zeigt. Dann setzt man 1.1 Äquivalente 5'-OH-Komponente (**7** bzw. **8**) zu.

Man rührt 8 Tage unter völligem Feuchtigkeitsausschluß, hydrolysiert dann mit 50 ml Phosphatpuffer pH 5 und schüttelt dreimal mit insgesamt 60 ml Chloroform. Das qualitative Dünnschicht-

chromatogramm zeigt neben dem Hauptprodukt ($3' \rightarrow 5'$ - bzw. $2' \rightarrow 5'$ -Verbindung) viel Ausgangssubstanz **7** bzw. **8** sowie ($2' \rightarrow 2'$), ($5' \rightarrow 5'$) bzw. ($3' \rightarrow 3'$) und ($5' \rightarrow 5'$)-verknüpfte Verbindungen. Es wird auf mehrere Kieselgelplatten in Chloroform-Lösung aufgetragen und mehrfach entwickelt. Die Hauptzone wird eluiert und nochmals präparativ schichtchromatographisch nachgereinigt. Anschließend wird in Chloroform gelöst, durch Kieselgur filtriert, mit Petroläther ausgefällt, filtriert, mit p. a. Hexan gewaschen und über P_4O_{10} + Paraffin i. Vak. getrocknet.

b) Ein 100-ml-Dreihalskolben wird ausgeheizt, mit trockenem Stickstoff gespült, sodann über Calciumhydrid destilliertes absol. Pyridin über einen Tropftrichter mit Druckausgleich und Volumenskala in den Kolben gegeben. Unter schwachem N_2 -Strom werden anschließend ein Äquivalent trockenes Phenylphosphat und zwei Äquivalente 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfochlorid (TPS) zugesetzt und 1 h bei Raumtemp. gerührt. Nach Zugabe von einem Äquivalent $2'$ - bzw. $3'$ -OH-Komponente (**2** bzw. **3**) wird 12 h gerührt, bis nach dem Dünnschichtchromatogramm alles reagiert hat. Die Lösung hat sich inzwischen dunkelrotbraun verfärbt. Nun wird die $5'$ -OH-Komponente (**7** bzw. **8**) (1.1 Äquivalente) sowie ein weiteres Äquivalent TPS zugefügt. Nach 3 Tagen Reaktionszeit versetzt man mit einem weiteren halben Äquivalent **7** bzw. **8** sowie einem Äquivalent TPS. Die Reaktion erfordert nach weiteren vier Tagen erneut ein Äquivalent TPS und ist nach insgesamt 11 Tagen beendet. Man stoppt durch Eintropfen der Reaktionslösung in Eiswasser, filtriert den Niederschlag entweder ab oder engt die gesamte Lösung ein. Im Dünnschichtchromatogramm zeigt sich neben einem großen am Start sitzenden Fleck von Triisopropylbenzolsulfonsäure und Monophosphat von **2** bzw. **3** als größerer wandernder Fleck das gesuchte Reaktionsprodukt, sowie ($2' \rightarrow 2'$), ($3' \rightarrow 3'$) und ($5' \rightarrow 5'$)-Dimere und weitere unbekanntete Verbindungen in geringen Mengen. Für die präparative Trennung wird getrocknet, in Chloroform gelöst, auf mehrere Kieselgelplatten ($40 \times 20 \times 0.2$ cm) aufgetragen und mehrfach entwickelt. Die Hauptzone wird eluiert, durch Kieselgur filtriert und nach Einengen auf ein kleines Vol. mit Petroläther ($50 - 70^\circ C$) ausgefällt.

2'-O-Benzyl-5'-O-trityluridylyl-(3' → 5')-3'-O-acetyl-2'-O-benzyluridin-phenylester (26)

a) Nach der allgemeinen Vorschrift werden 1.25 g (2.18 mmol) **2** in 20 ml absol. Acetonitril mit 0.7 ml 1-Propylimidazol (**10**) und 0.42 ml **9** (2.4 mmol) zusammengegeben. Nach 1 h setzt man 0.91 g (2.42 mmol) **7** zu und rührt 8 Tage bei Raumtemp. Durch Zugabe von 50 ml Phosphatpuffer pH 5 wird abgebrochen, zweimal mit 30 ml Chloroform ausgeschüttelt, eingengt und auf sechs $40 \times 20 \times 0.2$ cm Kieselgelplatten mit Chloroform/Äthylacetat aufgetrennt. Die Hauptzone liefert 0.920 g (38 %) amorphes, farbloses Feststoff.

b) 0.38 g (2.2 mmol) trockenes Phenylphosphat und 1.3 g TPS (4.3 mmol) werden zunächst in 20 ml absol. Pyridin zusammengegeben. Nach 1 h setzt man 1.25 g (2.2 mmol) **2** zu und nach 12 h 0.905 g (2.4 mmol) **7** sowie weitere 0.65 g TPS. Nach 3 Tagen Reaktionszeit werden weitere 0.376 g (1 mmol) **7** und 0.65 g TPS, 4 Tage danach nochmals 0.65 g TPS zugefügt, nach insgesamt 11 Tagen ist die Reaktion beendet. Man tropft in Eiswasser ein, engt im Rotationsverdampfer ein, trägt auf 8 Kieselgelplatten ($40 \times 20 \times 0.2$ cm) auf und entwickelt mehrfach mit Chloroform/Äthylacetat (1/1). Eluieren der Hauptzone, Kieselgurfiltration und Ausfällen mit Petroläther liefern 1.52 g (63 %) farblose, amorphe Substanz vom Schmp. $102 - 110^\circ C$.

$C_{59}H_{55}N_4O_{15}P$ (1091.1) Ber. C 64.95 H 5.08 N 5.14 P 2.84

Gef. C 64.74 H 5.19 N 5.41 P 2.62

2'-O-Benzyl-5'-O-trityluridylyl-(3' → 5')-2'-O-benzyluridin-phenylester (27): 0.20 g **26** in 60 ml Dioxan werden mit 30 ml 0.3 N NaOH versetzt. Nach 5 min wird mit Dowex 50 (H^+ -Form) neutralisiert und nach Einengen auf Kieselgel mit Chloroform/Äthylacetat (1/1) chromatographiert. Die weitwandernde Hauptzone wird eluiert, auf ein kleines Vol. eingengt und dann mit Petroläther ausgefällt. Nach Trocknen gewinnt man 0.12 g (63 %) amorphe, farblose Substanz vom Schmp. $105 - 120^\circ C$.

$C_{57}H_{53}N_4O_{14}P$ (1049.1) Ber. C 65.26 H 5.09 N 5.34 Gef. C 65.11 H 5.35 N 5.41

2'-*O*-Benzyluridylyl-(3' → 5')-3'-*O*-acetyl-2'-*O*-benzyluridin-phenylester (**28**): 0.273 g **26** werden nach der allgemeinen Vorschrift detrityliert und aufgearbeitet. Auf der Kieselgelplatte zeigen sich nach Entwickeln mit Äthylacetat drei Substanzzonen, von denen sich zwei nur wenig unterscheiden und sich nach Eluieren, Einengen und Ausfällen mit Petroläther als die beiden Diastereomeren erweisen.

28a: Aus der weiterlaufenden Zone werden 50 mg (23%) amorpher, farbloser Feststoff vom Schmp. 95–105°C erhalten.

28b: Die etwas kürzer wandernde Zone liefert zunächst 0.118 g Rohprodukt, das aus 5 ml absol. Äthanol und partiellem Eindunsten kristallin erhalten wird. Es scheiden sich 0.11 g (52%) farblose Kristalle vom Schmp. 197–200°C ab.

$C_{40}H_{41}N_4O_{15}P$ (848.8) Ber. C 56.61 H 4.87 N 6.60

28a: Gef. C 56.48 H 5.64 N 6.08

28b: Gef. C 56.48 H 5.13 N 6.71

2'-*O*-Benzyluridylyl-(3' → 5')-2'-*O*-benzyluridin-phenylester (**29**): 0.27 g **26** in 60 ml Dioxan werden mit 30 ml 0.3 N NaOH versetzt und 5 min gerührt. Man neutralisiert mit Dowex 50 (H⁺-Form) und engt ein. Der Rückstand wird nach der allgemeinen Vorschrift mit 15 ml Dioxan, 5 ml H₂O und 30 ml Ameisensäure in 4 h detrityliert. Das so gewonnene Produkt besteht aus zwei chromatographisch sehr ähnlichen, aber verschiedenen Substanzen, die sich durch Chromatographie auf 3 Kieselgelplatten (40 × 20 × 0.2 cm) mit Äthylacetat trennen lassen. Die beiden Zonen werden getrennt eluiert, eingengt, der Rückstand in wenig Chloroform gelöst, die Diastereomeren **29a** und **29b** sodann mit Petroläther ausgefällt. An **29a** werden 0.037 g (18%) amorpher, farbloser Feststoff vom Schmp. 95–105°C,

$C_{38}H_{39}N_4O_{14}P \cdot 2H_2O$ (842.8) Ber. C 54.16 H 5.14 N 6.65 Gef. C 54.28 H 5.48 N 7.31 und an **29b** 0.080 g (38%) amorphes, farbloses Produkt vom Schmp. 90–100°C erhalten.

$C_{38}H_{39}N_4O_{14}P$ (806.8) Ber. C 56.58 H 4.87 N 6.95 Gef. C 56.67 H 5.02 N 6.81

2'-*O*-Benzyluridylyl-(3' → 5')-2'-*O*-benzyluridin (**30**): 0.27 g **26** werden zunächst nach der allgemeinen Vorschrift der Triester-Verseifung und dann der Detritylierung unterworfen. Zur Reinigung wird auf drei Kieselgelplatten mit Äthylacetat/Äthanol (4/1) bzw. (7/3) entwickelt. Die Elution der Hauptzone geschieht mit Äthanol/Wasser. Man engt zur Trockne ein, löst in Äthanol, konzentriert auf 3 ml, verdünnt mit 10 ml Chloroform und gibt dann auf eine Kieselgelsäule (25 × 1.3 cm) in Chloroform. Es wird mit Chloroform/Äthanol (1/1) entwickelt, die Hauptfraktion aufgefangen, im Rotationsverdampfer eingengt, in Wasser gelöst und mit Dowex 50 (H⁺-Form) behandelt. Nach erneutem Einengen wird in absol. Äthanol gelöst und mit Petroläther ausgefällt. Nach Trocknen erhält man 0.104 g (58%) farblosen, amorphen Feststoff vom Schmp. 130°C (Sintern), 170°C (Schmelzen).

$C_{32}H_{35}N_4O_{14}P$ (730.6) Ber. P 4.2 Gef. P 3.9

Uridylyl-(3' → 5')-uridin (**31**)^{55, 56}: 0.1 g Palladium-Schwarz (puriss. Fluka AG, Schweiz) werden in 25 ml Wasser suspendiert und in der Schüttelente mit Wasserstoff gesättigt. Man setzt dann 0.038 g **30** zu und hydriert, bis sich nach ca. 2 h kein Ausgangsprodukt mehr chromatographisch nachweisen läßt. Es wird vom Katalysator abfiltriert, eingengt, der Rückstand in wenig Wasser gelöst, auf eine Kieselgelplatte (40 × 20 × 0.2 cm) aufgetragen und zweimal mit Äthylacetat/Äthanol (4/1) sowie einmal mit Äthylacetat/Äthanol (7/3) entwickelt. Die Hauptzone wird mit Äthanol/Wasser (1/1) eluiert, eingengt und im System Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser (7/1/2) auf Cellulose chromatographiert. Es zeigt sich, daß das Material, das nach der

⁵⁵ J. Smrt, Collect. Czech. Chem. Commun. **29**, 2049 (1964).

⁵⁶ H. Pischel und A. Holy, Collect. Czech. Chem. Commun. **34**, 89 (1969).

optischen Dichte eine Ausbeute von 43 % liefert, nicht einheitlich ist, sondern nach den R_F -Werten und Vergleichen mit authentischen Substanzen aus Uridin (0.49), vermutlich Monobenzyl-UpU (0.34), Gemisch aus 5,6-Dihydrouridylyl-(3' → 5')-uridin und Uridylyl-(3' → 5')-5,6-dihydrouridin (0.23), UpU^{54,55} (0.18) und U(2',3')MP (0.13) besteht.

3'-O-Benzyl-5'-O-trityluridylyl-(2' → 5')-2'-O-acetyl-3'-O-benzyluridin-phenylester (32)

a) 1.25 g (2.18 mmol) **3** werden in 30 ml absol. Acetonitril mit 0.7 ml 1-Propylimidazol (**10**) und 0.42 ml (2.4 mmol) **9** versetzt und bei Raumtemp. gerührt. Nach 30 min werden 0.91 g (2.42 mmol) 2'-O-Acetyl-3'-O-benzyluridin (**8**) zugegeben, 8 Tage unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt, auf Eis gegossen und mit Chloroform extrahiert. Man engt auf ein kleines Vol. ein, gibt auf 5 Kieselgelplatten (40 × 20 × 0.2 cm) und entwickelt mit Chloroform/Äthanol (19/1). Die Hauptzone (1.09 g), die aus zwei sehr eng zusammenlaufenden Zonen besteht, wird eluiert und nochmals auf 7 Kieselgelplatten mit Chloroform/Äthanol (19/1) zehnfach entwickelt. Die vorlaufende Substanz (0.12 g) konnte nicht identifiziert werden, während aus der Hauptbande 0.8 g (34 %) **32** erhalten wurden.

b) Es wird analog der Darstellung von **26** verfahren, indem zunächst 0.38 g (2.2 mmol) Phenylphosphat und 1.3 g TPS (4.3 mmol) 1 h in 20 ml absol. Pyridin umgesetzt und mit 1.25 g (2.2 mmol) **3** versetzt werden. Nach 12 h gibt man 0.905 g (2.4 mmol) **8** und weitere 0.65 g TPS zu und nach 3 weiteren Tagen nochmals 0.376 g (1 mmol) **8** sowie 0.65 g TPS. 4 Tage später werden nochmals 0.65 g TPS zugefügt und nach insgesamt 11 Tagen wird, wie beschrieben, abgebrochen und aufgearbeitet. Die Trennung erfolgt auf 8 Kieselgelplatten (40 × 20 × 0.2 cm) durch Mehrfachentwicklung in Chloroform/Äthanol (19/1). Die Hauptzone wird eluiert und das Konzentrat durch Petroläther ausgefällt. Nach Filtrieren und Trocknen erhält man 1.43 g (60 %) amorphen, farblosen Feststoff vom Schmp. 108 – 120°C.

$C_{59}H_{55}N_4O_{15}P$ (1091.1) Ber. C 64.95 H 5.08 N 5.14 P 2.84
Gef. C 65.22 H 5.18 N 5.42 P 3.09

3'-O-Benzyl-5'-O-trityluridylyl-(2' → 5')-3'-O-benzyluridin-phenylester (33): Zu 0.273 g **32** in 60 ml Dioxan werden 30 ml 0.3 N NaOH gegeben. Nach 6 min wird mit Dowex 50 (H⁺-Form) neutralisiert und im Rotationsverdampfer eingengt. Man löst in wenig Chloroform, trägt auf eine Kieselgelplatte auf und entwickelt viermal mit Chloroform/Äthylacetat (1/1). Neben der am Start sitzenden Zone zeigen sich zwei nahe beieinanderlaufende Zonen, die den aufgetrennten Diastereomeren entsprechen. Nach Eluieren und Ausfällen mit Petroläther werden 0.035 g (13 %) vom vorlaufenden Diastereomeren **33a**, 0.145 g (55 %) vom Diastereomeren **33b** in Form amorpher, farbloser Feststoffe vom Schmp. 100 – 115°C erhalten.

$C_{57}H_{53}N_4O_{14}P$ (1049.1) Ber. C 65.26 H 5.09 N 5.34
33a: Gef. C 65.47 H 5.18 N 5.62
33b: Gef. C 65.29 H 5.35 N 5.40

3'-O-Benzyluridylyl-(2' → 5')-2'-O-acetyl-3'-O-benzyluridin-phenylester (34): 0.273 g **32** werden gemäß der allgemeinen Vorschrift detriptyliert. Nach Einengen im Rotationsverdampfer wird in 5 ml Aceton gelöst und auf einer Kieselgelplatte mit Chloroform/Äthylacetat (1/4) dreimal entwickelt. Die breite Hauptzone wird eluiert, auf ein kleines Vol. eingengt und mit Petroläther ausgefällt. Nach Trocknen i. Vak. erhält man 0.15 g (71 %) amorphes, farbloses Festprodukt vom Schmp. 100 – 115°C.

$C_{40}H_{41}N_4O_{15}P$ (848.8) Ber. C 56.61 H 4.87 N 6.60 Gef. C 56.73 H 5.14 N 6.82

3'-O-Benzyluridylyl-(2' → 5')-3'-O-benzyluridin-phenylester (35): 0.27 g **32** werden nach der allgemeinen Vorschrift detriptyliert. Es wird nicht chromatographisch aufgetrennt, sondern der im Rotationsverdampfer durch mehrfaches Nachdampfen mit Wasser von Ameisensäure befreite Rückstand in 60 ml Dioxan gelöst und mit 30 ml 0.3 N NaOH versetzt. Nach 5 min Rühren wird

mit Dowex 50 (H⁺-Form) neutralisiert, filtriert, eingeeengt, in ca. 8 ml Aceton gelöst, auf zwei Kieselgelplatten (40 × 20 × 0.2 cm) aufgetragen und mit Äthylacetat entwickelt. Nach Abkratzen, Eluieren und Eindampfen löst man in 20 ml heißem Äthanol, läßt abkühlen und taucht dann bis zur beginnenden Kristallisation in flüssigen Stickstoff ein. Es werden 0.11 g (55%) farblose Kristalle vom Schmp. 218–220°C erhalten.

C₃₈H₃₉N₄O₁₄P (806.7) Ber. C 56.58 H 4.87 N 6.95 Gef. C 56.66 H 4.77 N 7.03

3'-O-Benzyluridylyl-(2' → 5')-3'-O-benzyluridin (36): 0.27 g 32 werden zunächst detriptyliert und nach Einengen und Nachdampfen mit Wasser (Rotationsverdampfer) in ca. 8 ml Aceton gelöst. Auf Kieselgelplatten wird mit Chloroform/Äthylacetat (1/4) chromatographiert und vom Tritanol abgetrennt. 34 wird eluiert und die Verseifung der alkalilabilen Schutzgruppen in Dioxan mit 0.3 N NaOH nach der allgemeinen Vorschrift vorgenommen. Nach Einengen wird das Hydrolyseprodukt in 6 ml Wasser gelöst, auf 2 Kieselgelplatten aufgetragen und mit Äthylacetat/Äthanol (4/1) einmal entwickelt. Die Hauptzone wird mit 200 ml Äthanol/Wasser (1/1) eluiert, auf 100 ml eingeeengt und durch eine Säule (30 × 1.5 cm) Dowex 50 (H⁺-Form) gegeben. Nach Einengen des Eluates wird in 10 ml absol. Äthanol heiß gelöst, erneut auf 1–2 ml eingeeengt und sehr langsam ca. 15 ml Petroläther zugetropft. Der abgeschiedene Niederschlag wird gesammelt, mit Hexan p. a. gewaschen, i. Vak. getrocknet und liefert 0.11 g (60%) farblosen, amorphen Feststoff vom Schmp. 218–220°C.

C₃₂H₃₅N₄O₁₄P (730.6) Ber. C 52.60 H 4.83 N 7.67 P 4.24
Gef. C 51.40 H 5.36 N 7.36 P 3.50

Uridylyl-(2' → 5')-uridin (37): 0.038 g 36 werden, wie bei 31 beschrieben, katalytisch hydrogenolytisch und durch Kieselgelchromatographie aufgearbeitet. Die Hauptzone wird eluiert und erweist sich im Papierchromatogramm mit Isopropylalkohol/konz. Ammoniak/Wasser (7/1/2) als Gemisch zweier Substanzen mit den R_F-Werten 0.17 und 0.22. Während erstere dem Uridylyl-(2' → 5')-uridin entsprechen dürfte, liegt bei der zweiten vermutlich wieder ein Gemisch partiell in 5,6-Stellung hydrierter Derivate vor.

[75/75]