

159. Nucleotide. XIV¹⁾. Substituierte β -Phenyläthyl-Gruppen. Neue Schutzgruppen für Oligonucleotid-Synthesen nach dem Phosphorsäuretriester-Verfahren

von Eugen Uhlmann und Wolfgang Pfeleiderer

Fakultät für Chemie der Universität Konstanz, Postfach 5560, D-7750 Konstanz

Herrn Prof. Dr. *Conrad Hans Eugster* in Verbundenheit zum 60. Geburtstag gewidmet

(3. III. 81)

XIV. Substituted β -Phenyl-ethyl Groups. New Blocking Groups for Oligonucleotide Syntheses by the Phosphotriester Approach

Summary

Various *o*- and *p*-substituted β -phenylethanol (**2–10**) have been synthesized and investigated as blocking groups in the phosphotriester approach. A large number of 5'-*O*-tritylated thymidine-3'-phosphotriesters (**13–36**) with two different phosphate protecting groups have been prepared, characterized, and studied according to their chemical stability and usefulness for oligonucleotide syntheses. The combination of a 5'-*O*-monomethoxytrityl- and a 3'-(2,5-dichlorophenyl, *p*-nitrophenylethyl)-phosphate function as in **18** turned out to possess optimal properties as a monomeric nucleotide building block due to the fact that these blocking groups can be quantitatively and selectively be removed without harming each other by trifluoroacetic acid in chloroform to **41**, by oximate to **42**, and by DBU to **43**. The base-catalyzed removal of the monosubstituted phenylethyl groups by DBU or DBN respectively as well as the disubstituted phenylethyl groups by triethylamine in aprotic solvents is a β -elimination process leading to phosphodiester without attack on the P-center.

1. Einleitung. – Die bis 1977 für den chemischen Aufbau von Oligonucleotiden [2–7] entwickelten Phosphat-Schutz-Methoden weisen Schwächen auf, so dass es uns notwendig erschien, einen neuartigen Schutzgruppentyp [8] [9] zu entwickeln. Die Phosphorsäuretriester-Methode kennt eine grosse Zahl von Schutzgruppen, von denen sich die Cyanoäthyl-Gruppe [10], die die Basis der Arbeiten von *Leisinger* [11–14] bildet, die von *Eckstein* propagierte Trichloräthyl-Gruppe [15–20], die Tribromäthyl-Gruppe [21] [22], der Phenylrest [23–27] und in jüngster Zeit vor allem die substituierten Phenylgruppen [28] [29] einer breiten Anwendung erfreuen. Die experimentellen Probleme offenbaren sich in der grossen Basenlabilität der Cyanoäthyl-Gruppe, den Schwierigkeiten bei der Entblockierung der

¹⁾ Teil XIII: [1].

Trihaloäthyl-Gruppe [30-33] und der möglichen Isomerisierung [34-36] und Spaltung [37] [38] der C(3'), C(5')-verknüpften Internucleotidbindung unter stark basischen Hydrolyse-Bedingungen. Lediglich die elegante Oximat-Methode von Reese [39] [40] zur Abspaltung der substituierten Phenylgruppen stellt vom synthetischen Standpunkt aus eine befriedigende Lösung dar.

Ordnet man die verschiedenartigen Schutzgruppen für die Phosphorsäure-triester-Methode nach dem Mechanismus ihrer Abspaltung, so ergeben sich, abgesehen von der Methylgruppe [41] [42], die einer Alkyl-, *O*-Spaltung unter Quatärnierung einer Base wie Pyridin unterliegt, zwei Gruppen, von denen die eine mit der Cyanoäthyl-, Trichloräthyl- und Tribromäthyl-Gruppe durch einen β -Eliminierungsmechanismus und die andere mit den Phenylgruppen durch einen Additions-Eliminierungsmechanismus charakterisiert sind. Dem β -Eliminierungstyp muss dabei aus prinzipiellen Gründen der Vorzug gegeben werden, da bei der angestrebten Überführung eines Phosphorsäuretri- in den Diester weder das P-Atom angegriffen noch eine der vier *P*, *O*-Bindungen gelöst werden muss.

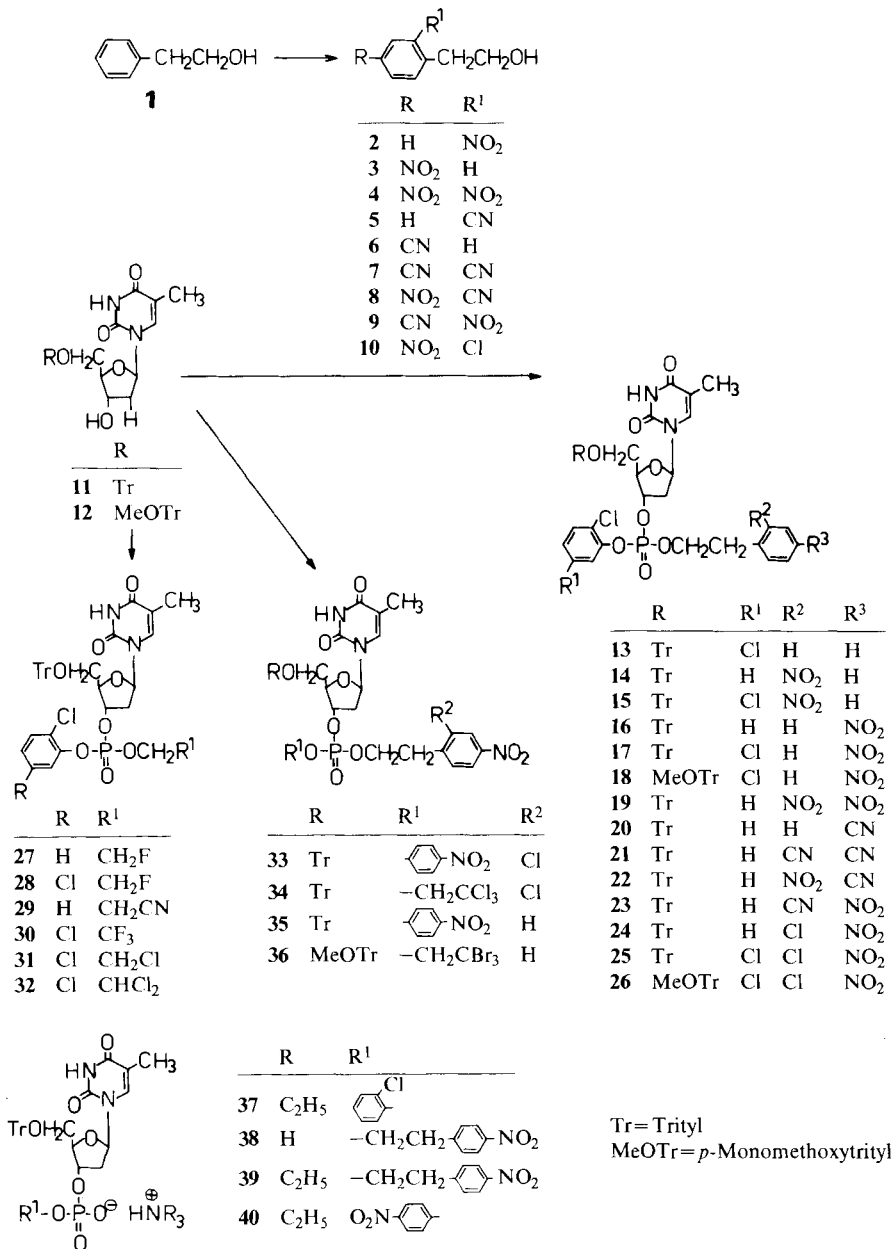
Unser Konzept strebt demzufolge den Ersatz des zu labilen Cyanoäthyl- durch den substituierten β -Phenyläthyl-Rest an, dessen β -H-Atome durch die vielfältigen Substituentenvariationen am Phenylteil beliebig aktivierbar sind und der nach Knüpfung an eine gute Austrittsgruppe in analoger Weise einer β -Eliminierung zugänglich sein sollte.

2. Synthesen. - Wir synthetisierten ausgehend von β -Phenyläthanol (**1**) zunächst die bekannten *o*-Nitro-(**2**) [43], *p*-Nitro-(**3**) [44] und 2,4-Dinitro-Derivate (**4**) [45] und erweiterten dann diese Liste durch die Herstellung des 2-Cyano-(**5**), 4-Cyano-(**6**), 2,4-Dicyano-(**7**), 2-Cyano-4-nitro-(**8**), 4-Cyano-2-nitro-(**9**) und des 2-Chlor-4-nitrophenyläthanol (**10**). Die Cyano-Derivate wurden aus den entsprechenden Nitrophenyläthanol durch Reduktion, Diazotierung und Sandmeyer-Reaktion gewonnen, während die Synthese der Cyanonitro-Verbindungen **8** und **9** durch Nitrierung der Essigsäure-2 (*o*- bzw. *p*-cyanophenyl)äthylester und **10** durch Chlorierung des Essigsäure-2-(*p*-nitrophenyl)äthylesters in Gegenwart von Ag[⊕]-Ionen gelang.

Für die Herstellung verschiedener gemischter Nucleotidtriestere wurde auf ein modifiziertes Verfahren von Narang [29] zurückgegriffen und das 5'-*O*-Trityl-(**11**) und das 5'-*O*-Monomethoxytrityl-thymidin (**12**) als Ausgangsnucleoside der Phosphorylierung mit 2-Chlor- und 2,5-Dichlorphenylphosphorsäure-dichlorid in Gegenwart von Triazol in Pyridin unterworfen. Es wird hierzu aus dem Phosphorsäurephenyldichlorid als effizientes Phosphorylierungsmittel zunächst das Bis(triazolid) gebildet, das in einer schnellen Reaktion die freie HO-C(3')-Gruppe in **11** bzw. **12** verestert und dann nach Zugabe der zweiten Alkoholkomponente in einem langsameren Schritt zum gemischten Thymidin-3'-phosphorsäuretriester (**13-32**) weiterreagiert. Die Ausbeuten dieser Eintopfreaktionen liegen nach Isolierung und chromatographischer Reinigung zwischen 50 und 95%.

Die allgemeine Anwendung des Verfahrens lässt sich dadurch demonstrieren, dass sich in gleicher Weise auch die Triester mit einem Fluoräthyl-(**28**), Cyanoäthyl-(**29**), Trifluoräthyl-(**30**), Chloräthyl-(**31**) und Dichloräthyl-Rest (**32**) herstellen lassen und bei Verwendung von *p*-Nitrophenyl- bzw. Trichloräthyl- und Tribrom-

Schema 1



äthylphosphorsäure-dichlorid mit *p*-Nitrophenyläthanol bzw. 2-Chlor-4-nitrophenyläthanol ferner die entsprechend substituierten gemischten Phosphorsäure-triester 33–36 in hohen Ausbeuten zugänglich sind.

Bei Aktivierung mit 4-Nitroimidazol fiel die Ausbeute an Triester auf *ca.* die Hälfte und mit Tetrazol wurden komplexe Substanzgemische erhalten, deren Trennung sich nicht lohnte.

Bei der Kieselgel-Chromatographie in Chloroform/Methanol erscheinen die Triester meist als einheitliche Substanz, während in Essigester/Benzol zum Teil recht gute Auftrennung in die beiden Diastereomeren erfolgt.

Die Phosphorylierung von **11** bzw. **12** mit dem bifunktionellen Phosphorylierungsreagens muss in der Kälte durch Zutropfen des in Pyridin gelösten Nucleosids zur Reagenslösung erfolgen, weil so die Bildung von (3'→3')-verknüpften Dinucleosidmonophosphatriestern auf ein Minimum reduziert werden kann. Der Versuch, dieser unerwünschten Nebenreaktion durch einen grossen Überschuss an Phosphorylierungsreagens entgegenzuwirken, schlägt zumindest bei Nucleosidbasen mit freien Säureamidfunktionen (Thymidin, Guanosin und Uridin) fehl, da die Säureamid-Gruppe durch überschüssiges Reagens ebenfalls phosphoryliert und danach durch Hilfsbasen wie 1,2,4-Triazol substituiert wird, wobei man im Falle des Thymidins zu 4-Triazolyl-Derivaten [46] gelangt, wie sie analog auch bei der Umsetzung von Uridin- und Guanosinnucleosiden mit Mesitylensäure-nitrotriazoliden gefunden wurden [47]. Es wurde daher ferner versucht, aus dem *o*-Chlorphenylphosphorsäure-dichlorid mit einem Mol-Äquiv. *p*-Nitrophenyläthanol bei -10° in Äther und bei Gegenwart von Triäthylamin als neues, monofunktionelles Phosphorylierungsreagens das *o*-Chlorphenyl-*p*-nitrophenyläthylphosphorsäuremonochlorid herzustellen, das jedoch bislang lediglich als nicht destillierbares Rohprodukt gewonnen werden konnte. Es war nur in beschränkter Masse für Phosphorylierungen einsetzbar und ergab mit **11** den Phosphorsäuretriester **16** in nur 21% Ausbeute, die bei Aktivierung mit Triazol auf mässige 37% gesteigert wurde.

3. Abspaltungen. - Da das Ziel unserer Untersuchungen in der Entwicklung einer neuen Schutzgruppe für die Phosphorsäure-Triester-Methode zu sehen ist, die sich weniger basenlabil als der Cyanoäthylrest erweist, sich aber doch unter relativ milden Bedingungen quantitativ abspalten lässt, wurde eine Reihe der hergestellten gemischten Thymidin-3'-phosphorsäuretriester der Spaltung durch β -Eliminierung unterworfen. Die Cyanoäthyl-Gruppe lässt sich in 0,1N NaOH in Dioxan/Wasser 4:1 bei Raumtemperatur schon innert 30 Sekunden [48] eliminieren und entsprechend bietet abs. Pyridin/Triäthylamin 1:1 [49] eine alternative Möglichkeit, denn unter beiden Bedingungen ist die Chlorphenyl-Einheit stabil. Der Nachteil, den das Pyridin/Triäthylamin-System bei der qualitativen dünn-schicht-chromatographischen Verfolgung der Entblockierungsreaktion bildet, veranlasste uns, auf die Mischung abs. Acetonitril/Triäthylamin 1:1 erfolgreich auszuweichen. Der (5'-*O*-Trityl-thymidin-3')(4-nitrophenyl-2-äthyl)(2-chlorphenyl)-phosphorsäureester (**16**) ist in beiden Systemen bei Raumtemperatur stabil und erst durch 6 Stunden Erhitzen in abs. Triäthylamin läuft als Hauptreaktion die β -Eliminierung des *p*-Nitrophenyläthyl-Restes ab, wie durch Trennung des Reaktionsgemisches und NMR.-Charakterisierung des Triäthylammonium-(5'-*O*-tritylthymidin-3')(*o*-chlorphenyl)phosphats (**37**) und *p*-Nitrostyrols gesichert wurde. Wird **16** mit 1N NH₃ in Dioxan/Wasser 2:1 bzw. Triäthylamin/Wasser bei

Raumtemperatur behandelt, so wird die *o*-Chlorphenyl-Gruppe verseift und das Ammonium (**38**) bzw. Triäthylammonium (5'-*O*-tritylthymidin-3') (*p*-nitrophenyläthyl)phosphat (**39**) in über 90% Ausbeute erhalten.

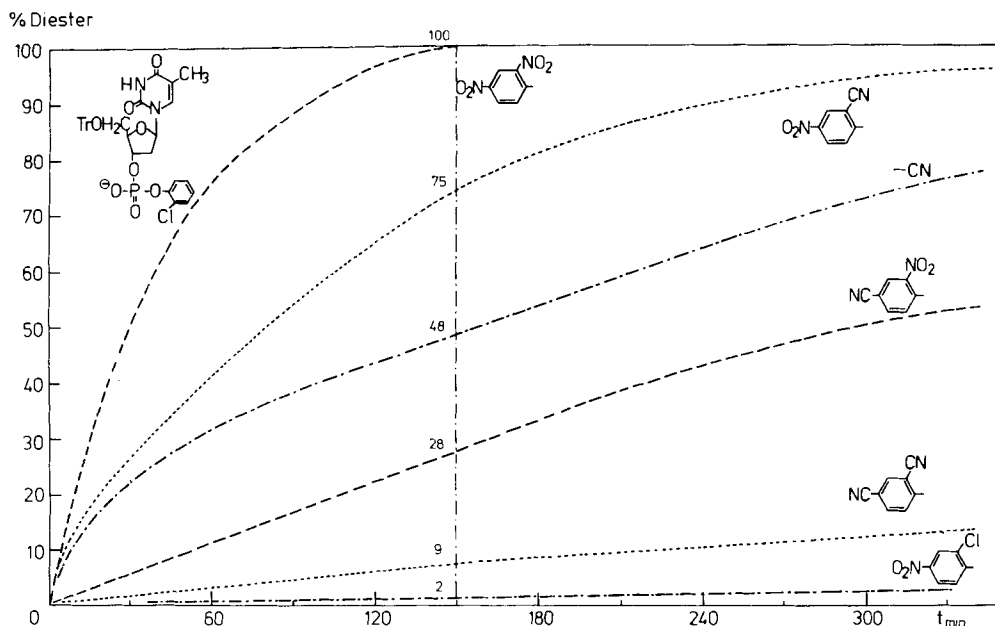
Der *o*-Nitrophenyläthylester **14** und das Cyanophenyläthyl-Derivat **20** sind in Triäthylamin/Pyridin bzw. Acetonitril bei Raumtemperatur tagelang stabile Verbindungen. Der (5'-*O*-Tritylthymidin-3') (2-chlorphenyl) (2,4-dinitrophenyläthyl)phosphorsäureester (**19**) ergibt jedoch unter denselben Bedingungen schon nach 4 Stunden den Diester **37** und 2,4-Dinitrostyrol. Die grosse Labilität des 2,4-Dinitrophenyläthyl-Restes kommt auch dadurch zum Ausdruck, dass **19** selbst beim Stehen in Pyridin langsam einer β -Eliminierung unterliegt. Es kann schliesslich generell festgehalten werden, dass in sämtlichen hergestellten Phosphorsäuretriestern die disubstituierten Phenyläthyl-Reste in Triäthylamin/Acetonitril sehr rasch, aber auch - mit Ausnahme der 2-Chlor-4-nitrophenyläthyl-Derivate - in konz. Ammoniak/Dioxan 3:2 abgespalten werden. Die Verbindungen **24-26** und die monosubstituierten Phenyläthylphosphorsäuretriestere erleiden unter der Einwirkung des letzteren Reagens eine normale Abspaltung der 2-Chlor- bzw. 2,5-Dichlorphenyl-Reste.

Quantitative Aussagen über die relative Stabilität dieser Schutzgruppen im Vergleich zur β -Cyanoäthyl-Gruppe lassen sich aus der zeitlichen Verfolgung der Abspaltungsgeschwindigkeit gewinnen. Da die korrespondierenden Tri- und Diester im UV.-Bereich bei derselben Wellenlänge absorbieren, mussten die Ester zunächst dünnschicht-chromatographisch quantitativ getrennt und ihr Gehalt nach Eluierung über ihre Extinktion ermittelt werden. Mit dem *Camag*-Eluierungsgerät liess sich diese Bestimmung sehr gut durchführen, wobei aus praktischen Gründen die Triester der Einwirkung von Triäthylamin/Acetonitril 2:98 (v/v) bei 0° unterworfen wurden (Tab. 1).

Tab. 1. Stabilität und NMR.-Daten von (Thymidin-3')-di-*X*-phosphorsäureestern bzw. substituierten 2-Phenyläthanol (X = substituierter Alkyl- bzw. Phenylrest)^{a)}

(5'- <i>O</i> -Tritylthymidin-3') (<i>o</i> -chlorphenyl X)phosphor- säureester	2proz. Et ₃ N in CH ₃ CN bei 0°C		NMR.-Spektren in CDCl ₃ (δ in ppm)			Art der Abspaltung	
	Halb- werts- zeit t _{1/2} in Min.	% Spal- tung nach 150 Min.	Phos- phor- säure- triester	subst.		Pyridin Et ₃ N/ CH ₃ CN	konz. NH ₃ / Dioxan 3:2
				H- C(β)	H- C(β)		
2,4-Dinitrophenyläthyl (19)	30	100	3,42	3,27	35,88	β -Elim.	β -Elim.
2-Cyano-4-nitrophenyläthyl (23)	70	75	3,35	3,22	37,74	β -Elim.	β -Elim.
β -Cyanoäthyl (29)	155	48	2,78	2,62	-	β -Elim.	β -Elim.
4-Cyano-2-nitrophenyläthyl (22)	300	28	3,34	3,20	35,94	β -Elim.	β -Elim.
2,4-Dicyanophenyläthyl (21)	> 600	9	3,28	3,15	37,90	β -Elim.	β -Elim.
2-Chlor-4-nitrophenyläthyl (24)	∞	2	3,20	3,10	36,82	β -Elim.	Verseifung
4-Nitrophenyläthyl (16)	∞	0	3,05	2,95	38,93	stabil	Verseifung
2-Nitrophenyläthyl (14)	∞	0	3,30	3,10	36,14	stabil	Verseifung
4-Cyanophenyläthyl (20)	∞	0	3,02	2,88	39,19	stabil	Verseifung

^{a)} Die abgespaltene Schutzgruppe ist X = Y - CH₂CH₂; bei jeder Kurve wird Y angegeben.



Figur. Kinetik der Schutzgruppenabspaltung aus (Thymidin-3')-di-X-phosphorsäureestern (X = subst. Alkyl- bzw. Phenylrest)

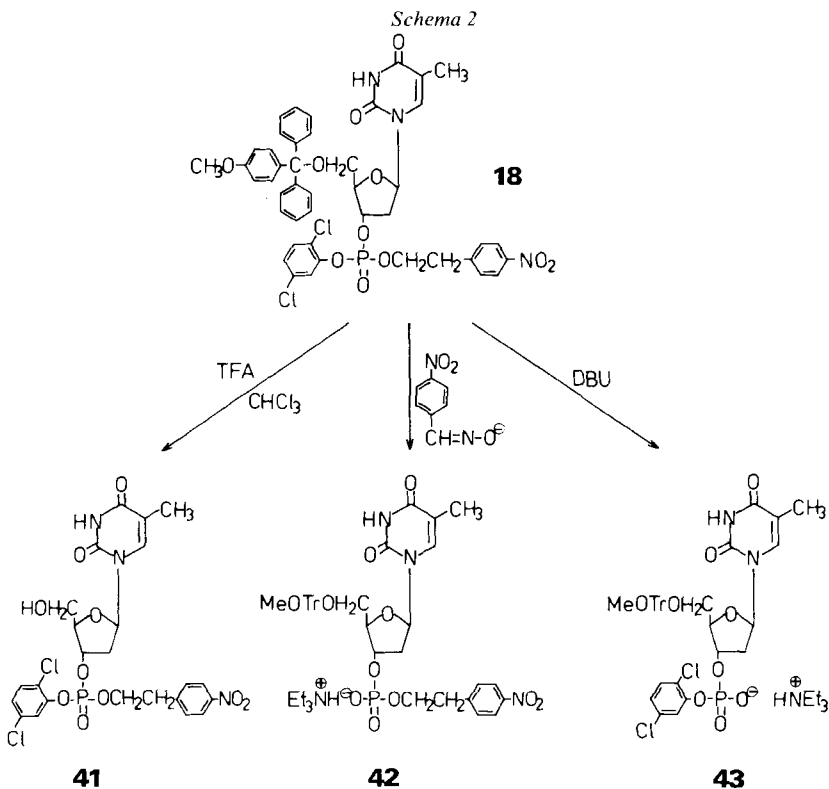
Es zeigt sich anhand der Halbwertszeiten bzw. der prozentualen Abspaltung nach 150 Minuten (Fig.), dass die Stabilität mit den elektronischen Effekten der verschiedenen Phenylsubstituenten im erwarteten Sinne korreliert und gemäss der Reihenfolge p -Nitro < o -Nitro < CN < Cl zunimmt. Das gleiche Resultat kann auch aus den ^1H - und ^{13}C -NMR.-Spektren abgelesen werden, denn die chemische Verschiebung der H_β - und $^{13}\text{C}_\beta$ -Atome ordnet sich im allgemeinen sowohl im freien Alkohol als auch dem komplexen Triester nach den acidifizierenden Einflüssen dieser Substituenten auf die genannten Zentren an. Lediglich bei Gegenwart eines o -Nitro-Substituenten fallen die NMR.-Daten etwas aus der Reihe, was vermutlich auf einen grösseren Anisotropie-Effekt dieser Funktion auf die nahe liegenden H_β - und $^{13}\text{C}_\beta$ -Zentren zurückzuführen ist. Neue substituierte Phenyläthanoole können somit relativ leicht anhand der NMR.-Daten ihrer H_β - und $^{13}\text{C}_\beta$ -Atome bezüglich ihrer relativen Stabilität im Phosphorsäuretriester-Verband eingestuft und auf ihre synthetische Verwendbarkeit hin geprüft werden.

Diese Ergebnisse liessen zunächst die (Thymidin-3')-(2-chlor- bzw. 2,5-dichlorphenyl) (2-chlor-4-nitrophenyläthyl)phosphorsäureester aufgrund ihrer beträchtlich gesteigerten Stabilität gegenüber dem Cyanoäthyl-Analogon und der doch recht raschen β -Eliminierung in Triäthylamin/Acetonitril 1:1 als geeignete monomere Bausteine für Oligonucleotid-Synthesen nach dem Triesterverfahren erscheinen.

Vertiefte Studien in dieser Richtung gaben dann aber zu erkennen, dass der 2-Chlor-4-nitrophenyläthyl-Rest doch noch etwas zu empfindlich ist, um die unterschiedlichen Reaktionsschritte im Zusammenhang mit dem systematischen Aufbau

einer Oligonucleotidkette unbeschadet zu überstehen. Wir haben uns daraufhin dann doch den monosubstituierten Phenyläthyl-phosphorsäuretriestern zugewandt und sie mit stärkeren Basen als Triäthylamin auf ihre Spaltungstendenz nach dem β -Eliminierungs-Mechanismus untersucht. Diazabicyclo[4.3.0]nonen (DBN) und Diazabicyclo[5.4.0]-undecen (DBU) stellen die überlegenen Basen für diese Abspaltung in Acetonitril dar und liefern bei den *p*-Nitrophenyläthyl-phosphorsäuretriestern **16-18** die besten Resultate. Am Beispiel des (5'-*O*-Monomethoxytritylthymidin-3') (2,5-dichlorphenyl) (*p*-nitrophenyläthyl) phosphorsäureesters (**18**) kann nun gezeigt werden, dass in diesem voll geschützten Nucleotid-triester eine solche Substitutionskombination vorliegt, die trotz der hohen Stabilität dieser Molekel eine selektive Spaltung jeder Schutzgruppe in nahezu quantitativer Ausbeute gewährleistet.

Bei der Behandlung von **18** mit einproz. Trifluoressigsäure in Chloroform [32] wird der Monomethoxytrityl-Rest abgespalten und in 94% Ausbeute der Phosphotriester **41** mit freiem HO-C(5') erhalten. Der 2,5-Dichlorphenyl-Rest wird am zweckmässigsten mit *p*-Nitrobenzaldoxim in Triäthylamin/Dioxan/Wasser entblockiert, wobei der Phosphorsäurediester **42** in 96% Ausbeute in analysenreiner Form anfällt, entsprechend entsteht der 2,5-Dichlorphenyl-geschützte Phosphorsäurediester **43** aus **18** mit DBU in einer eleganten β -Eliminierungsreaktion in 93% Ausbeute an isoliertem Produkt.



Zu diesem interessanten Ergebnis haben schliesslich auch die Untersuchungen beigetragen, die nicht allein auf dem substituierten Phenyläthyl-Rest, sondern auch auf anderen Schutzgruppen (27-32) basierten. So erwies sich der β -Fluoräthyl-Rest in 27 trotz des starken (-I)-Effekts als stabil gegenüber Triäthylamin/Acetonitril, während die β -Cyanoäthyl-Gruppe unter diesen Bedingungen leicht abgeht, was im letzteren Falle möglicherweise auf einen Elcb-Mechanismus aufgrund der Mesomeriestabilisierung des Carbanions durch die Cyanogruppe hindeutet. Entsprechend stabil waren auch die Trifluoräthyl-(30), 2-Chloräthyl-(31) und 2,2-Dichloräthyl-phosphorsäuretriester (32), in denen lediglich der 2,5-Dichlorphenyl-Rest problemlos nach der Oximat-Methode [39] verseift werden konnte. Die Entblockierung der 2,2,2-Trichloräthylgruppe im (5'-O-Tritylthymidin-3')(2,2,2-trichloräthyl)(2-chlor-4-nitrophenyläthyl)phosphorsäureester (34) mit aktiviertem Zinkstaub in Pyridin bei Gegenwart von 2,4,6-Triisopropylbenzolsulfonsäure nach van Boom [50] ist nicht gelungen, wogegen sich die 2,2,2-Tribromäthyl-Gruppe in 36 schnell eliminieren liess.

Die *p*-Nitrophenyl-Schutzgruppe in Phosphorsäuretriestern der Art 33 und 35 ist mit Hilfe der Oximat-Methode bzw. der normalen alkalischen Verseifung ebenfalls schnell spaltbar und darüber hinaus besteht nach den Befunden von Reese [51] die Möglichkeit zu einer direkten nucleophilen aromatischen Substitution mit Thiophenolat-Ionen am C(1)-Atom des Phenylrestes, wodurch es wiederum zu dem angestrebten C, O-Bindungsbruch kommen würde. Bei der Behandlung des (5'-O-Tritylthymidin-3')(2-chlor-4-nitrophenyläthyl)(4-nitrophenyl)phosphorsäureester (33) mit *p*-Thiokresol und Triäthylamin in Acetonitril bei Raumtemperatur stellten wir fest, 1) dass die Reaktion wesentlich langsamer als bei den von Reese verwendeten Phenyl-(*p*-nitrophenyl)phosphorsäuretriestern ist und 2) dass der basenkatalysierten β -Eliminierung des 2-Chlor-4-nitrophenyläthyl-Restes der Vorrang gebührt. Der isolierte *p*-Nitrophenylphosphorsäurediester 40 konnte leicht durch sein NMR.-Spektrum charakterisiert werden und das Auftreten von nur geringen Mengen an 2-Chlor-4-nitrostyrol bei der chromatographischen Verfolgung der Reaktion findet ihre Erklärung durch die Isolierung und Identifizierung des 2-Chlor-4-nitrophenyläthyl-*p*-tolylthioäthers, ein Folgeprodukt des Styrol-Derivates mit dem Thiokresolat. Verschärfte Reaktionsbedingungen mit N,N,N',N'-Tetramethylguanidin als stärkere Base und *p*-Thiokresol ergaben dasselbe Resultat bei lediglich verkürzter Reaktionszeit.

4. Physikalische Daten. - Die auf chromatographischem Wege isolierten Thymidin-3'-phosphorsäuretriester 13-36 werden meist in Form amorpher Feststoffe erhalten, die, nach mehrfacher dünnschicht-chromatographischer Prüfung auf Reinheit, der C, H, N-Elementaranalyse unterworfen wurden. Zur weiteren Charakterisierung dienten die UV.- und NMR.-Spektren, wobei von letzteren nur die typischen Signale in *Tabelle 2* festgehalten sind.

5. Schlussfolgerungen. - Die substituierten β -Phenyläthyl-Gruppen stellen eine neue, vielfältig verwendbare Klasse von Schutzgruppen dar, die speziell günstige Eigenschaften zur Blockierung der Phosphorsäure-Funktion besitzen. Für chemische Oligonucleotid-Synthesen erweist sich die *p*-Nitrophenyläthyl-Gruppe als sehr geeignet, da sie zum einen die Herstellung von stabilen Nucleosid-phosphotriestern

Tab. 2. Physikalische Daten von (Thymidin-3')-di-X-phosphorsäureestern (X = subst. Alkyl- bzw. Phenylrest)

RF-Werte ^{a)} auf Kieselgel		UV.-Spektren in CH ₃ OH ¹ H-NMR.-Spektren in CDCl ₃ (δ in ppm) ^{b)}									
CHCl ₃ / CH ₃ OH 95:5	Essigsäure/ Benzol 7:3	λ_{\max} (nm)	$\log \epsilon$	H-N (1)	H-C(1') (1)	P-OCH ₂ CR ₃ (2)	P-OCH ₂ - CH ₂ (2)	O-CH ₃ (3)	H ₃ C-C(5) (3)		
13	0.69	0.70	4.04	9.89s	6.42pt	4.36m	2.92t	-	1.40s		
14	0.42	0.43	4.25	9.74s	6.44pt	4.49m	3.26t	-	1.42s		
15	0.37	0.62	4.16	10.07s	6.44pt	4.48m	3.26t	-	1.43s		
16	0.47	0.39; 0.30	4.29	9.64s	6.43pt	4.44m	3.05t	-	1.42s		
17	0.37	0.54; 0.41	4.29	9.94s	6.45pt	4.45m	3.08t	-	1.44s		
18	0.33	0.54; 0.41	4.29	10.09s	6.44pt	4.44m	3.05t	3.71s	1.42s		
19	0.45	0.42	4.31	9.74s	6.42pt	4.52m	3.42t	-	1.43s		
20	0.37	0.37; 0.32	4.04	9.60s	6.44pt	4.40m	3.02t	-	1.44s		
21	0.32	0.27	4.03	9.72s	6.36pt	4.44m	3.28t	-	1.43s		
22	0.38	0.36	4.11	9.34s	6.44pt	4.52m	3.34t	-	1.44s		
23	0.33	0.31	4.27	9.45s	6.38pt	4.51m	3.35t	-	1.43s		
24	0.40	0.44; 0.39	4.27	9.24s	6.48pt	4.48m	3.20t	-	1.43s		
25	0.42	0.63; 0.55	4.26	9.54s	6.42pt	4.41m	3.18t	-	1.42s		
26	0.55	0.63; 0.52	4.24	9.57s	6.42pt	4.44m	3.19t	3.72s	1.43s		
27	0.30	0.40	3.97	9.66s	6.46pt	4.76m (1)	4.30m	-	1.43s		
28	0.25	0.53; 0.39	4.02	9.75s	6.42pt	4.52m (1)	4.30m	-	1.44s		
29	0.20	0.34	3.99	9.66s	6.44pt	4.74m (1)	4.30m	-	1.43s		
30	0.61	0.73	3.98	9.90s	6.50pt	4.96m	2.78t	-	1.44s		
31	0.56	0.60; 0.51	3.99	10.04s	6.46pt	4.49m	-	-	1.44s		
32	0.59	0.70	3.99	9.92s	6.48pt	4.44m	3.62t	-	1.42s		
33	0.38	0.48; 0.39	4.25	10.23s	6.44pt	4.48m	5.8t (1)	-	1.44s		
34	0.42	0.48; 0.38	4.27	9.95s	6.38pt	4.32m (4)	3.26t	-	1.42s		
35	0.31	0.37; 0.26	4.29	10.09s	6.39pt	4.46m	3.22t	-	1.43s		
36	0.30	0.37; 0.26	4.31	10.07s	6.45pt	4.50m	3.10t	3.75s	1.44s		
									1.42s		

a) Bezogen auf 5'-O-Monomethoxytritylthymidin (12) 0.16 bzw. 0.21.

b) s = Singulett; t = Triplett; pt = Pseudotriplett; m = Multiplett. () = Zahl der Protonen.

als allgemein verwendbare Synthesebausteine gewährleistet und zum andern durch starke Basen der Art von DBN oder DBU in aprotischen Lösungsmitteln problemlos unter β -Eliminierung wieder abgespalten werden kann. Mit diesem Abspaltungstyp wird erreicht, dass der durch das Phosphorsäuretriester-Verfahren gebildete formale Trialkylphosphorsäureester eine sehr spezifische Umwandlung in den gewünschten Phosphorsäurediester unter Erhaltung der Internucleotid-Bindungen erfährt.

Wir danken dem *Fonds der Chemischen Industrie* für ein Doktoranden-Stipendium und finanzielle Hilfe und Herrn *E. Krienitz* für die Aufnahme der NMR.-Spektren.

Experimenteller Teil

1. Allgemeines. – Substanzen: Abs. Pyridin wurde durch Kochen unter Rückfluss mit *p*-Toluolsulfochlorid, Destillation, Behandlung mit Calciumhydrid und Aufbewahren über Molekularsieb hergestellt. Das abs. Acetonitril wurde über Calciumhydrid absolutiert und dann abdestilliert. Die chromatographischen Untersuchungen erfolgten auf Dünnschichtfolien Kieselgel F 1500 LS 254 der Fa. *Schleicher & Schüll*. Die schichtchromatographischen Trennungen wurden auf präparativen Kieselgelplatten (40×20×0,2 cm) mit Kieselgel PF₂₅₄ der Fa. *Merck* als Trägermaterial durchgeführt und für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel (Korngrösse 0,05–0,2 mm, *Merck*) verwendet. Für die quantitativen chromatographischen Bestimmungen wurde ein *Camag*-Eluierungsgerät verwendet. Zum Trocknen der Substanzen bei Raum- bzw. erhöhter Temperatur über P₂O₅ im Vakuum diente das Gerät TO-50 der Fa. *Büchi*. Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert. Die UV.-Spektren wurden mit einem *Cary*-Recording-Spectrometer, Modell 118 der Fa. *Appl. Physics* und die NMR.-Spektren mit den Geräten *Jeol JNM-MH-100* bzw. *Bruker HFX-90* aufgenommen. Abkürzungen: RT. = Raumtemperatur, i.HV. = im Hochvakuum, RV. = Rotationsverdampfer.

2. Synthesen von substituierten β -Phenyläthanol 2–10. – 2.1. 2-(*o*-Nitrophenyl)-(2) und 2-(*p*-Nitrophenyl)äthanol (3). In einem 1-l-Erlenmeyer-Kolben werden 164 g Essigsäure-(β -phenyläthyl)ester in 150 ml Acetanhydrid gelöst und mit 5 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Das Gemisch wird in einem 2-Propanol/Trockeneis-Bad auf -15° abgekühlt, dann werden innert 1 Std. bei dieser Temp. und unter starkem Rühren in der Reihenfolge 30,6 ml rauchende Salpetersäure ($d=1,52$), 5 ml konz. Schwefelsäure und, zuletzt bei -15° , 15,3 ml rauchende Salpetersäure zugetropft. Nach 45 Min. Rühren bei dieser Temp. wird das Nitriergemisch langsam in 400 ml Eiswasser eingerührt und dann ausgeäthert. Der Extrakt wird einmal mit Wasser und anschliessend mit gesättigter Na₂CO₃-Lösung gewaschen, die Äther-Phase über MgSO₄ getrocknet und dann zur Trockne eingedampft. Zur Verseifung des Esters wird dieser 3,5 Std. in 500 ml 3proz. methanolischer Salzsäure unter Rückfluss erhitzt und anschliessend i.RV. zu einem Öl eingedampft, das nach Stehen über Nacht im Eisschrank kristallisiert. Der Kristallbrei wird abgesaugt, mit 60 ml Benzol/Petroläther 2:1 gewaschen und die so erhaltenen Kristalle getrocknet. Umkristallisieren aus 300 ml CCl₄ und wenig Äthanol ergibt als erste Fraktion 40 g reines 3 vom Smp. 61–62 (Lit. [44]: 62°) und durch Aufarbeiten des Filtrates weitere 14,7 g 3.

Aus dem Reaktionsfiltrat kann das Isomere 2-(*o*-Nitrophenyl)äthanol (2) durch Destillation i.V. über eine 30 cm *Vigreux*-Kolonnen zunächst in angereicherter Form erhalten werden. Dann werden 10 g des Destillats über eine 12×7,5 cm Kieselgelsäule mit Essigester/Hexan 1:1 chromatographiert und die Hauptfraktion nochmals i.HV. destilliert, wobei bei 90° 6,0 g 2 übergehen (Lit. [43], Sdp. 136°/2 Torr).

2.2. 2-(2,4-Dinitrophenyl)äthanol (4). Zu einer auf -10° abgekühlten Mischung aus 53 ml rauch. Salpetersäure ($d=1,52$) und 44 ml konz. Schwefelsäure werden bei dieser Temp. innert 1 Std. 10 g Essigsäure-(2-phenyläthyl)ester unter Rühren getropft. Nach 1 weiteren Std. wird die Temp. langsam auf 0° ansteigen lassen. Nach 5 Std. Stehenlassen bei 0° wird das Gemisch auf das doppelte Volumen Eis gegossen und dann mit 400 ml Äther extrahiert. Die Ätherphase wird mit einer ges. Na₂CO₃-Lösung neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und dann i.RV. eingedampft. Der Rückstand wird durch 4stdg. Erhitzen in 100 ml 5proz. methanolischer Salzsäure verseift und

das Gemisch anschliessend i.V. eingedampft. Der feste Rückstand (11,5 g) wird aus 200 ml CCl₄ und wenig Äthanol umkristallisiert und liefert so 7,5 g (58%) blassgelbe Nadeln vom Smp. 69–70°.

C₈H₈N₂O₅ (212,2) Ber. C 45,29 H 3,80 N 13,20% Gef. C 45,50 H 3,82 N 13,25%

2.3. 2-(*p*-Cyanophenyl)äthanol (6). Die Lösung von 20 g 2-(*p*-Nitrophenyl)äthanol (3) in 150 ml 96proz. Äthylalkohol wird nach Zugabe von 0,15 g Platindioxid in der Schüttelente mit Wasserstoff behandelt. Nach Abfiltrieren des Katalysators und Eindampfen der farblosen Lösung werden 16,2 g chromatographisch reines 2-(*p*-Aminophenyl)äthanol erhalten [44], die dann unter Kühlen in 50 ml konz. Salzsäure/Eis 2:3 gelöst und durch Zutropfen einer Lösung von 7,5 g Natriumnitrit in 25 ml Wasser bei ca. 3° diazotiert werden. Die kalte, mit einer ges. Na₂CO₃-Lösung neutralisierte Diazonium-Lösung wird zu einer stark gerührten und mit 150 ml Benzol/Toluol 1:1 überschichteten Kupfercyanid-Lösung (aus 12,1 g Cu₂Cl₂ und 15,9 g NaCN in 80 ml Wasser) getropft. Nach 1 h Rühren in der Kälte wird das Gemisch 1½ bei RT. und 1½ Std. bei 50° stehengelassen. Nachdem die Gasentwicklung aufgehört hat, wird die organische Phase abgetrennt und die wässrige Phase 3mal mit je 100 ml CHCl₃ ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet und dann i.R.V. eingedampft, wobei ein rot gefärbter Rückstand (14 g) erhalten wird. Dieser wird über eine 20×9-cm-Kieselgelsäule mit Essigester/Petroläther 1:1 und 1:2 chromatographiert. Durch Einengen der zweiten Fraktion werden 11,5 g (65%) 6 erhalten: hellgelbe Nadeln (aus CCl₄), Smp. 50–51°.

C₉H₉NO (147,2) Ber. C 73,45 H 6,16 N 9,52% Gef. C 73,66 H 6,08 N 9,70%

2.4. 2-(2,4-Dicyanophenyl)äthanol (7). Die Lösung von 12,5 g 2-(4-Cyano-2-nitrophenyl)äthanol (9) in 150 ml Äthanol wird mit 0,1 g Platindioxid in der Schüttelente mit Wasserstoff behandelt. Nach beendeter Wasserstoff-Aufnahme wird vom Katalysator abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingedampft, wobei aus dem Rückstand durch Umkristallisation aus Essigester/Petroläther 1:2 8,5 g (81%) chromatographisch reines 2-(2-Amino-4-cyanophenyl)äthanol erhalten werden. Die Substanz wird in 24 ml konz. Salzsäure/Eis 9:15 gelöst und dann unter Zutropfen einer Lösung von 3,5 g Natriumnitrit in 15 ml Wasser unter Rühren diazotiert. Die mit einer ges. Na₂CO₃-Lösung vorsichtig neutralisierte Diazonium-Lösung wird sofort in eine vorher zubereitete Kupfercyanid-Lösung (aus 5,4 g Cu₂Cl₂ und 7,06 g NaCN in 35 ml Wasser), die mit Benzol/Toluol 1:1 überschichtet ist, unter starkem Rühren bei ca. 5° eingetropft. Anschliessend wird das Gemisch noch 1 Std. bei 10°, dann 2 Std. bei RT. und schliesslich noch 2 Std. bei 50° gerührt. Das Gemisch wird mehrmals mit Chloroform extrahiert, die organische Phase abgetrennt, über Natriumsulfat getrocknet und anschliessend eingedampft. Der rot gefärbte Rückstand wird über eine 9-cm-Kieselgelsäule (200 g) mit Essigester/Petroläther 1:1 chromatographiert und ergibt 3,52 g (40%) 7, Smp. 84–85°.

C₁₀H₈N₂O (172,2) Ber. C 69,76 N 16,27% Gef. C 69,62 N 16,22%

2.5. 2-(4-Cyano-2-nitrophenyl)äthanol (9). Die Lösung von 5,51 g 2-(*p*-Cyanophenyl)äthanol (6) in 30 ml Acetanhydrid wird unter Rühren tropfenweise mit 3 ml Acetylchlorid versetzt, 30 Min. bei RT. weitergerührt und dann auf 20 ml eingengt. Diese Lösung wird innert 45 Min. in eine Mischung aus 18 ml rauch. Salpetersäure (d=1,52) und 15 ml konz. Schwefelsäure bei –10° unter Rühren eingetropft, das Gemisch weitere 2,5 Std. bei 0–5° gehalten, anschliessend auf Eis gegossen und mit Äther extrahiert. Die organische Phase wird abgetrennt, mit ges. Na₂CO₃-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wird 30 Min. in 50 ml methanolischer Salzsäure unter Rückfluss erhitzt und anschliessend eingedampft. Umkristallisation aus 80 ml CCl₄ und wenig Äthanol ergibt 5,4 g (75%) hellgelbe Nadeln vom Smp. 64–65°.

C₉H₈N₂O₃ (192,2) Ber. C 56,25 H 4,20 N 14,57% Gef. C 56,07 H 4,16 N 14,55%

2.6. 2-(2-Cyano-4-nitrophenyl)äthanol (8). Die Lösung von 16,2 g 2-(2-Aminophenyl)äthanol [44] in 50 ml konz. Salzsäure/Eis 2:3 wird tropfenweise und unter Kühlung mit einer Lösung von 8 g Natriumnitrit in 25 ml Wasser bei 5° versetzt, bis eine leicht positive Reaktion mit Iod-Stärkepapier resultiert. Anschliessend wird mit ges. Na₂CO₃-Lösung vorsichtig neutralisiert und dann in eine kalte Kupfercyanid-Lösung (aus 12,1 g Cu₂Cl₂), die mit 200 ml Benzol überschichtet ist, unter starkem Rühren eingetropft. Das Gemisch wird 1 Std. bei 3–5°, dann 1 weitere Std. bei 25° und schliesslich 4 Std. bei 50° stehengelassen, dann die Benzol-Phase abgetrennt, die wässrige Lösung 2mal mit je 150 ml CHCl₃ extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und eingedampft. Der dunkelbraune Rückstand wird durch Chromatographie über eine (15×9)-cm-

Kieselgelsäule mit Essigester/Petroläther 1:1 chromatographiert, einige kleine Vorfraktionen fortgeworfen und die darauffolgende einheitliche Fraktion eingedampft; es resultieren 12,3 g (71%) eines rötlichen Öls, welches nach Destillation über eine 15-cm-*Vigreux*-Kolonne bei 150–152°/0,01 Torr 11,0 g (63%) 2-(2-Cyanophenyl)äthanol (**5**) als schwach gelb gefärbte Flüssigkeit liefert.

Das Gemisch aus 5,51 g **5** und 30 ml Acetylchlorid wird 2 Std. bei 40° gerührt, dann auf 20 ml eingengt und anschliessend zu einer Mischung aus 18 ml rauch. Salpetersäure ($d=1,52$) und 15 ml konz. Schwefelsäure bei -10° getropft. Nach 1 Std. Rühren bei -10° und dann 2,5 Std. bei 0° wird das Gemisch auf das doppelte Volumen Eis gegossen und mehrfach mit insgesamt 250 ml Äther extrahiert. Die Ätherphase wird mit ges. Na_2CO_3 -Lösung und Wasser gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und i.V. eingedampft. Der feste Rückstand wird mit 70 ml Petroläther/Diäthyläther 5:2 erwärmt und der beim Abkühlen entstehende Niederschlag (5,9 g) abfiltriert. Die Verseifung des Esters erfolgt durch 2stdg. Erhitzen unter Rückfluss mit 50 ml Methanol und 1 ml konz. Salzsäure; das Gemisch wird dann i.R.V. zu einem rötlichen Öl eingedampft, das durch Umlösen aus 70 ml CCl_4 /Äthanol 6:1 und durch Stehen im Eisschrank 2,76 g gelbliche Nadeln vom Smp. 72–73° ergibt. Durch Aufarbeitung der Mutterlauge erhöht sich die Ausbeute auf 5,16 g (72%).

$\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ (192,2) Ber. C 56,25 N 14,57% Gef. C 56,18 N 14,77%

2.7. 2-(2-Chlor-4-nitrophenyl)äthanol (**10**). Zunächst werden 8,35 g 2-(*p*-Nitrophenyl)äthanol (**3**) durch Rühren bei RT. während 30 Min. mit 3,9 g Acetylchlorid in 30 ml Acetanhydrid verestert. Dann wird das Gemisch i.V. eingedampft und der Rückstand in einer Lösung von 10 g Silberacetat in 50 ml Trifluoressigsäure gelöst. Nach Kühlen werden 50 ml einer kalten Lösung von 20 g Chlor in 100 ml CCl_4 unter Rühren langsam zugetropft, wobei allmählich AgCl abgeschieden wird. Nach 2stdg. Rühren bei RT. werden zur Vervollständigung der Reaktion noch weitere 25 ml Chlor-Lösung sowie anschliessend innert 30 Min. noch 2,5 g Silberacetat in 10 ml Trifluoressigsäure zugegeben. Nach weiteren 30 Min. Rühren wird der abgeschiedene Niederschlag abgesaugt, mit etwas CCl_4 gewaschen und die vereinigten Filtrate i.R.V. eingedampft. Der Rückstand wird in 200 ml Methanol gelöst und mit 2 ml konz. Salzsäure versetzt, wobei nochmals Silberchlorid ausfällt. Ungeachtet dessen wird das Gemisch zur Verseifung des Esters 1 Std. unter Rückfluss erhitzt, dann filtriert und das Filtrat eingedampft. Der Rückstand wird in 200 ml CHCl_3 aufgenommen, mit ges. Na_2CO_3 -Lösung neutral gewaschen, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Umkristallisation aus 60 ml CCl_4 und wenig Äthanol ergibt 8,37 g (83%) gelbliche Nadeln vom Smp. 50°.

$\text{C}_8\text{H}_8\text{ClNO}_3$ (201,6) Ber. C 47,66 H 4,00 N 6,95% Gef. C 47,84 H 4,07 N 6,80%

3. Allgemeine Vorschrift zur Herstellung der 5'-O-Trityl- und 5'-O-Monomethoxytrityl-thymidin-3'-phosphorsäuretriester **13–32**. - Die Lösung von 0,221 g (3,2 mmol) 1*H*-1,2,4-Triazol in 5 ml abs. Pyridin wird zum Abschleppen von eventuell vorhandener Feuchtigkeit bei 40° i.R.V. eingedampft. Der Rückstand wird wieder in 3 ml abs. Pyridin aufgenommen und mit 1,5 mmol *o*-Chlorphenyl-(0,368 g) bzw. 2,5-Dichlorphenylphosphorsäuredichlorid (0,403 g) versetzt. Nach 2stdg. Rühren bei RT. unter Feuchtigkeitsausschluss wird innert 30 Min. unter Rühren die Lösung von 1 mmol (0,484 g) 5'-O-Tritylthymidin (**11**) bzw. (0,515 g) 5'-O-Monomethoxytritylthymidin (**12**) in 5 ml abs. Pyridin zugetropft. Es wird weitergerührt, bis chromatographisch kein Ausgangs-Nucleosid mehr sichtbar ist (ca. 1 Std.), dann mit 2 mmol der jeweiligen Alkoholkomponente versetzt und 24–72 Std. bei RT. stehengelassen. Die Lösung wird dann i.V. bei 30° eingedampft und der ölige Rückstand 3mal in wenigen ml Benzol aufgenommen und die jeweilige Lösung eingedampft. Der Phosphorsäuretriester wird dann über eine 20×2-cm-Kieselgelsäule (35 g Kieselgel 60, Korngrösse 0,063–0,2 mm, *Merck*) zunächst zur Abtrennung von überschüssigem Alkohol mit reinem CHCl_3 und nachfolgend mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 98:2 chromatographiert. Die Hauptfraktion wird eingedampft und der Rückstand entweder zum amorphen Feststoff aufgeschäumt oder durch ein geeignetes Lösungsmittel zur Kristallisation gebracht (s. Tab. 3). Sämtliche Substanzen wurden chromatographisch rein erhalten und ihre Elementarzusammensetzung durch C,H,N-Analysen ermittelt.

3.1. (5'-O-Trityl-thymidin-3')-(2-chlor-4-nitrophenyläthyl)(*p*-nitrophenyl)phosphorsäureester (**33**). Analog vorstehender Vorschrift mit 0,385 g (1,5 mmol) *p*-Nitrophenylphosphorsäuredichlorid und 0,403 g (2 mmol) 2-(2-Chlor-4-nitrophenyl)äthanol (**10**) durch 20stdg. Stehenlassen bei RT. Isolierung

Tab. 3. (5'-O-Trityl- bzw. 5'-O-Monomethoxytritylthymidin-3')-di-X-phosphorsäureester (X = subst. Alkyl- bzw. Phenylrest)

Ver- bin- dung	Alkohol- komponente	Reak- tions- dauer bei Isolierung Std.	Chromatographie- System	Umkristallisations- Lösungsmittel	Smp. °C	Aus- beute %	Summenformel	Mol- masse	Elementar-Analyse		
									% C	% H	% N
13	1	15	CHCl ₃	Äther/Hexan	68-71	82	C ₄₃ H ₃₉ Cl ₂ N ₂ O ₈ P	813,7	Ber. 63,47	4,83	3,44
14	2	48	CHCl ₃	Benzol/Hexan	67-70	85	C ₄₃ H ₃₉ ClN ₃ O ₁₀ P	824,2	Gef. 63,91	4,89	3,71
15	2	6	CHCl ₃	Äthanol/Hexan 1:1	85-88	80	C ₄₃ H ₃₈ Cl ₂ N ₃ O ₁₀ P	858,7	Ber. 62,66	4,77	5,10
16	3	24	CHCl ₃	Äthanol/Hexan	83-86	68	C ₄₃ H ₃₉ ClN ₃ O ₁₀ P	824,2	Gef. 62,88	5,12	5,19
17	3	48	CHCl ₃	Äthanol/Hexan	86-89	70	C ₄₃ H ₃₈ Cl ₂ N ₃ O ₁₀ P	858,7	Ber. 60,15	4,46	4,89
18	3	24	CHCl ₃ /CH ₃ OH 98:2	Äthanol/Hexan 1:1	85-88	87	C ₄₄ H ₄₀ Cl ₂ N ₃ O ₁₁ P	888,7	Gef. 59,96	4,42	4,95
19	4	15	CHCl ₃ /CH ₃ OH 50:1	Äthanol/Hexan	85-88	52	C ₄₃ H ₃₈ ClN ₄ O ₁₀ P	869,2	Ber. 62,66	4,77	5,10
20	6	48	CHCl ₃ /CH ₃ OH 95:5	Benzol/Hexan	78-81	63	C ₄₄ H ₃₉ ClN ₃ O ₈ P	804,2	Ber. 59,42	4,41	6,44
21	7	60	CHCl ₃ /CH ₃ OH 98:2	Äthanol/Hexan 2:1	96-101	86	C ₄₃ H ₃₈ ClN ₄ O ₈ P	829,3	Gef. 59,15	4,20	6,67
22	9	48	CHCl ₃ /CH ₃ OH 98:2	Äthanol/Hexan	86-89	56	C ₄₄ H ₃₈ ClN ₄ O ₁₀ P	849,2	Ber. 65,71	4,89	5,22
23	8	60	CHCl ₃ /CH ₃ OH 98:2	Äthanol/Hexan	91-95	65	C ₄₄ H ₃₈ ClN ₄ O ₁₀ P	849,2	Gef. 65,85	5,10	5,45
24	10	48	CHCl ₃ /CH ₃ OH 97:3	Benzol/Hexan	76-79	95	C ₄₃ H ₃₈ Cl ₂ N ₃ O ₁₀ P	858,7	Ber. 62,23	4,51	6,60
25	10	20	CHCl ₃ /CH ₃ OH 98:2	Äthanol/Hexan	86-89	60	C ₄₃ H ₃₇ Cl ₃ N ₃ O ₁₀ P	893,1	Gef. 61,98	4,67	6,53
26	10	20	CHCl ₃	Äthanol/Hexan	81-85	72	C ₄₄ H ₃₉ Cl ₃ N ₃ O ₁₁ P	923,1	Gef. 62,13	4,68	6,35
27	FCH ₂ CH ₂ OH	72	CHCl ₃ /MeOH 95:5	Benzol/Hexan	75-78	90	C ₃₇ H ₃₅ Cl ₂ N ₃ O ₈ P	721,1	Ber. 60,15	4,46	4,89
28	FCH ₂ CH ₂ OH	20	CHCl ₃ /MeOH 98:2	Äthanol/Hexan	79-83	69	C ₃₇ H ₃₄ Cl ₃ N ₃ O ₈ P	755,6	Gef. 60,26	4,68	4,78
29	NCC ₂ H ₂ OH	72	CHCl ₃ /MeOH 95:5	Benzol/Hexan	78-83	52	C ₃₈ H ₃₅ Cl ₂ N ₃ O ₈ P	728,1	Ber. 57,83	4,18	4,70
30	F ₃ CCH ₂ OH	20	CHCl ₃ /MeOH 98:2	Äther/Hexan/ Äthanol	155-159	62	C ₃₇ H ₃₂ Cl ₂ F ₃ N ₃ O ₈ P	791,6	Gef. 57,58	4,45	4,76
31	ClCH ₂ CH ₂ OH	3	CHCl ₃	Äthanol/Hexan	82-86	64	C ₃₇ H ₃₄ Cl ₃ N ₃ O ₈ P	772,0	Ber. 57,25	4,26	4,55
32	Cl ₂ CHCH ₂ OH	20	CHCl ₃ /MeOH 98:2	Äthanol/Hexan	81-84	77	C ₃₇ H ₃₃ Cl ₄ N ₃ O ₈ P	806,5	Gef. 57,26	4,28	4,66
									Ber. 61,80	5,27	3,91
									Ber. 58,82	4,54	3,71
									Gef. 59,10	4,77	3,66
									Ber. 62,68	4,85	5,77
									Gef. 62,82	4,86	6,18
									Ber. 56,14	4,07	3,54
									Gef. 56,21	4,07	3,80
									Ber. 57,56	4,44	3,63
									Gef. 57,56	4,49	3,77
									Ber. 55,11	4,12	3,47
									Gef. 55,07	4,03	3,70

und Reinigung durch Säulenchromatographie mit 0,5 l CHCl_3 gefolgt von 0,5 l $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 98:2; 0,69 g (53%) chromatographisch reiner amorpher Feststoff.

$\text{C}_{43}\text{H}_{38}\text{ClN}_4\text{O}_{12}\text{P}$ (869,2) Ber. C 59,42 H 4,41 N 6,44% Gef. C 59,60 H 4,42 N 6,37%

3.2. (*5'-O-Tritylthymidin-3'*)(2-chlor-4-nitrophenyläthyl)(trichloräthyl)phosphorsäureester (34). Analog vorstehender allgemeiner Vorschrift mit 0,375 g (1,5 mmol) Trichloräthylphosphorsäuredichlorid und 0,403 g (2 mmol) **10** durch 2tägiges Stehenlassen bei RT. Isolierung und Reinigung durch Kieselgelchromatographie mit CHCl_3 ; 0,70 g (80%) farbloser amorpher Feststoff.

$\text{C}_{39}\text{H}_{36}\text{Cl}_4\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$ (879,5) Ber. C 53,26 H 4,13 N 4,78% Gef. C 53,50 H 4,39 N 4,54%

3.3. (*5'-O-Tritylthymidin-3'*)(*p*-nitrophenyläthyl)(*p*-nitrophenyl)phosphorsäureester (35). Analog vorstehender allgemeiner Vorschrift mit 0,383 g (1,5 mmol) *p*-Nitrophenylphosphorsäuredichlorid und 0,334 g (2 mmol) 2-(4-Nitrophenyl)äthanol (**3**) durch 24stdg. Stehenlassen bei RT. Isolierung und Reinigung durch Säulenchromatographie mit CHCl_3 bzw. $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 98:2; 0,567 g (68%) amorpher Feststoff.

$\text{C}_{43}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{P}$ (834,8) Ber. C 61,87 H 4,71 N 6,71% Gef. C 62,16 H 4,90 N 6,98%

3.4. (*5'-O-Monomethoxytritylthymidin-3'*)(*p*-nitrophenyläthyl)(tribromäthyl)phosphorsäureester (36). Analog vorstehender allgemeiner Vorschrift mit 0,6 g (1,5 mmol) 2,2,2-Tribromäthylphosphorsäuredichlorid und 0,334 g (2 mmol) **3** durch 18stdg. Stehenlassen bei RT. Isolierung durch Säulenchromatographie mit CHCl_3 bzw. $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 99:1; 0,816 g (81%) amorpher Feststoff.

$\text{C}_{40}\text{H}_{39}\text{Br}_3\text{N}_3\text{O}_{11}\text{P}$ (1008,5) Ber. C 47,64 H 3,90 N 4,17% Gef. C 47,65 H 3,90 N 4,26%

4. Abspaltung der Schutzgruppe. – 4.1. *Allgemeine Vorschrift für die Abspaltung der 2-(2,4-disubstituierten) Phenyläthyl-Schutzgruppe aus Phosphorsäuretriestern mit Triäthylamin.* Die Lösung von 1 mmol des jeweiligen Phosphorsäuretriesters (**19**, **21–24**) in 20 ml Triäthylamin/Pyridin 1:1 wird solange bei RT. gerührt, bis dünn-schicht-chromatographisch kein Ausgangsmaterial mehr nachweisbar ist. Der Retentionsfaktor der Ausgangsphosphorsäuretriester beträgt auf Kieselgelfolien im System Chloroform/Methanol 95:5 etwa 0,3, während das Triäthylammonium (*5'-O*-Tritylthymidin-3')(*o*-chlorphenyl)phosphat (**37**) praktisch am Start stehenbleibt. Das entstehende Styrol-Derivat läuft fast mit der Laufmittelfront. Die Reaktionsdauer für die vollständige Abspaltung der Schutzgruppe beträgt für **19** 1 Std., **21** 5 Std., **22** 3 Std., **23** 1,5 Std. und **24** 20 Std. Nach beendeter Reaktion wird das Gemisch eingedampft. Der Rückstand wird 2mal in Pyridin und 4mal in Benzol aufgenommen und die Lösung jeweils eingedampft, bis das Rohprodukt in Form eines festen Schaums anfällt. Der Rückstand wird schliesslich mit wenig Chloroform über eine präparative Kieselgelplatte (40×20×0,2 cm) im System $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 9:1 chromatographiert. Das Styrol-Derivat wird mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 95:5 und der Phosphorsäurediester (**37**) mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ 7:2:1 eluiert. Das NMR.-Spektrum von **37** bestätigt seine Struktur.

4.1.1. *2,4-Dicyanostyrol.* Nach Einengen des entsprechenden Eluats werden 158 mg reine Festsubstanz erhalten.

$\text{C}_{10}\text{H}_6\text{N}_2$ (154,2) Ber. C 77,91 H 3,92 N 18,17% Gef. C 77,73 H 4,06 N 18,09%

4.1.2. *4-Cyano-2-nitrostyrol.* Nach Einengen des entsprechenden Eluats wird der Rückstand aus Petroläther/Äthanol umkristallisiert und ergibt 158 mg (92%) Kristalle vom Smp. 115–116°.

$\text{C}_9\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ (174,2) Ber. C 62,07 H 3,47 N 16,08% Gef. C 61,96 H 3,50 N 16,03%

Die 2-Chlor-4-nitro-, 2-Cyano-4-nitro- und 2,4-Dinitrostyrol-Derivate wurden durch NMR.-Spektren charakterisiert.

4.2. *Allgemeine Vorschrift für die Abspaltung der o-Chlorphenyl-Schutzgruppe aus Phosphorsäuretriestern* (**16**, **20**, **24** und **27**). Die Lösung von 0,1 g Triester in 1,5 ml Triäthylamin/Wasser 2:1 wird 2 Tage kräftig bei RT. gerührt, i.V. eingedampft, der Rückstand mehrmals mit Benzol aufgenommen und jeweils eingedampft. Schliesslich wird er auf eine präparative Kieselgelplatte (40×20×0,2 cm) aufgetragen, mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 4:1 entwickelt und die Hauptzone knapp über dem Start 5mal mit 30 ml $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:4 und einem Tropfen Triäthylamin eluiert. Es resultieren 91 mg (92%) des Triäthylammonium (*5'-O*-tritylthymidin-3')(*p*-nitrophenyläthyl)phosphates (**39**) als Festsubstanz.

Zur weiteren Reinigung wird das Diester-Salz in der ausreichenden Menge Benzol gelöst und diese Lösung bei 0° in das 20fache Volumen Hexan unter Rühren eingetroppt. Nach Absaugen und Trocknen wird das Triäthylammonium-Salz als farbloses Pulver gewonnen.

4.3. *Abspaltung der Schutzgruppe vom (Thymidin-3')(2,5-dichlorphenyl)(p-nitrophenyläthyl)phosphorsäureester (41)*. Die Lösung von 2,13 g (2,4 mmol) **18** in 101 ml CH₂Cl₂/CF₃COOH 100:1 wird zunächst 1 Std. bei RT. gerührt, dann tropfenweise solange mit Methanol versetzt, bis ein Farbumschlag nach hellgelb erfolgt. Nach weiteren 45 Min. Rühren ist kein Ausgangsprodukt mehr chromatographisch nachweisbar. Die organische Phase wird nun mit 50 ml 0,1M Triäthylammoniumhydrogencarbonat (pH 8,4) geschüttelt, bis beide Phasen nahezu farblos erscheinen. Die organische Phase wird dann abgetrennt, mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Einengen wird das Rohprodukt über eine 4,5-cm-Kieselgelsäule (100 g) mit einem Gradienten CHCl₃ bis CHCl₃/CH₃OH 95:5 chromatographiert und die Hauptfraktion aufgefangen. Nach Einengen werden 1,38 g (93%) farbloser amorpher Feststoff erhalten, der nicht zur Kristallisation gebracht werden kann.

C₂₄H₂₄Cl₂N₃O₁₀P (616,4) Ber. C 46,77 H 3,92 N 6,82% Gef. C 47,00 H 4,20 N 6,71%

4.4. *Triäthylammonium(5'-O-monomethoxytritylthymidin-3')(p-nitrophenyläthyl)phosphat (42)*. Die Lösung von 5,0 g (30 mmol) *p*-Nitrobenzaloxim in 180 ml Triäthylamin/Dioxan/Wasser 1:1:1 wird 30 Min. bei RT. gerührt, dann mit 2,67 g (3 mmol) **18** versetzt, 2 Std. weitergerührt (bis kein Ausgangs-Triester mehr chromatographisch nachweisbar ist) und schliesslich i.V. eingedampft. Das dabei erhaltene Öl wird 4mal in Pyridin und dann 3mal in Benzol aufgenommen und die jeweilige Lösung eingedampft. Der nun feste Rückstand wird zur Reinigung über eine 2,5-cm-Kieselgelsäule (40 g) mit 400 ml CHCl₃/CH₃CH₂OH/(C₂H₅)₃N 4:2:1 chromatographiert und die Hauptfraktion gesammelt. Der Eindampfungsrückstand wird in 15 ml CHCl₃ aufgenommen und langsam unter Rühren in 200 ml Diäthyläther/Hexan 1:1 eingetroppt. Der sich abscheidende Niederschlag wird abgesaugt und 20 Std. bei 50° i.V. getrocknet. Es resultieren 2,436 g (96%) farbloses Pulver. - UV. (MeOH): λ_{max} 267 nm (log ε = 4,28).

C₄₄H₅₃N₄O₁₁P (844,9) Ber. C 62,55 H 6,32 N 6,63% Gef. C 62,30 H 6,44 N 6,54%

4.5. *Triäthylammonium(5'-O-monomethoxytritylthymidin-3')(2,5-dichlorphenyl)phosphat (43)*. Die Lösung von 0,444 g (0,5 mmol) **18** in 10 ml 0,5M DBU in abs. Pyridin wird 1 Std. bei RT. gerührt (wobei bereits nach 30 Min. chromatographisch kein Ausgangsmaterial mehr nachweisbar ist), dann mit 5 ml 1M Essigsäure versetzt, 3mal mit je 15 ml CHCl₃ extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und i.V. eingedampft. Der ölige Rückstand wird 3mal in Benzol aufgenommen und die Lösung jeweils eingedampft. Der schaumige Rückstand wird in wenig CHCl₃ gelöst und über eine Kieselgelsäule (5×2,5 cm) nacheinander mit 100 ml CHCl₃, 100 ml CHCl₃/CH₃CH₂OH 95:5 und 150 ml CHCl₃/CH₃CH₂OH/(C₂H₅)₃N 5:3:2 chromatographiert. Das Nitrostyrol wird dabei schon durch CHCl₃ eluiert, während sich das gesuchte Produkt in der letzten Fraktion befindet. Der ölige Eindampfungsrückstand wird 2mal in Pyridin und 3mal in Toluol aufgenommen und die Lösung jeweils eingedampft, wonach schliesslich ein fester Schaum zurückbleibt. In ca. 5 ml CHCl₃ aufgenommen und unter Rühren langsam in 60 ml Diäthyläther/Hexan 1:1 eingetroppt, liefert er einen festen Niederschlag, der 3 Tage i.V. bei 50° über P₂O₅ getrocknet wird: 0,39 g (93%) farbloses Pulver. - UV. (MeOH): λ_{max} 262 nm (log ε = 4,07).

C₄₂H₄₈Cl₂N₃O₁₀P · H₂O (858,8) Ber. C 58,74 H 5,87 N 4,89% Gef. C 58,82 H 5,74 N 4,87%

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] XIII. Mitt.: R. Charubala & W. Pfeleiderer, *Heterocycles* 15, 761 (1981).
- [2] H. Kössel & H. Seliger, 'Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe'; Bd. 32, 297, Ed. W. Herz, H. Grisebach, G. W. Kirby, Springer-Verlag Wien, New York 1975.
- [3] V. Amarnath & A. D. Broom, *Chem. Rev.* 77, 183 (1977).
- [4] C. B. Reese, *Phosphorus Sulfur* 1, 245 (1976).
- [5] J. H. van Boom, *Heterocycles* 7, 1197 (1977).
- [6] C. B. Reese, *Tetrahedron* 34, 3143 (1978).
- [7] M. Ikehara, E. Ohtsuka & A. F. Markham, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 36, 135 (1979).
- [8] E. Uhlmann & W. Pfeleiderer, *Nucleic Acid Res., Spec. Pub.* 4, 525 (1978).

- [9] E. Uhlmann & W. Pfeleiderer, *Tetrahedron Lett.* 1980, 1181.
- [10] G. M. Tener, *J. Am. Chem. Soc.* 83, 159 (1961).
- [11] R. L. Letsinger & D. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* 87, 3526 (1965).
- [12] R. L. Letsinger & K. K. Ogilvie, *J. Am. Chem. Soc.* 89, 4801 (1967).
- [13] R. L. Letsinger & K. K. Ogilvie, *J. Am. Chem. Soc.* 91, 3350 (1969).
- [14] R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie & P. S. Miller, *J. Am. Chem. Soc.* 91, 3360 (1969).
- [15] F. Eckstein, *Angew. Chem.* 78, 682 (1966); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 5, 671 (1966).
- [16] F. Eckstein & I. Rizk, *Angew. Chem.* 79, 684, 939 (1967); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 6, 695, 949 (1967).
- [17] F. Eckstein, *Chem. Ber.* 100, 2236 (1967).
- [18] F. Eckstein & I. Rizk, *Chem. Ber.* 102, 2362 (1967).
- [19] T. Neilson, *Chem. Commun.* 1969, 1139.
- [20] E. S. Werstiuk & T. Neilson, *Can. J. Chem.* 54, 2689 (1976).
- [21] J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, R. Crea, G. van der Marel & G. Wille, *Nucleic Acids Res.* 4, 747 (1977).
- [22] K. Itakura, N. Katagiri, C. P. Bahl, R. H. Wightman & S. Narang, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 7327 (1975).
- [23] C. B. Reese & K. Saffhill, *Chem. Commun.* 1968, 767.
- [24] J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, G. R. Owen, C. B. Reese & K. Saffhill, *Chem. Commun.* 1971, 869.
- [25] N. J. Cusack, C. B. Reese & J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* 1973, 2209.
- [26] R. Arentzen & C. B. Reese, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1977, 445.
- [27] A. Myles, W. Hutzenlaub, G. Reitz & W. Pfeleiderer, *Chem. Ber.* 108, 2857 (1975).
- [28] J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, P. H. van Deursen, R. Arentzen & C. B. Reese, *Tetrahedron Lett.* 1974, 3785.
- [29] K. Itakura, N. Katagiri & S. A. Narang, *Can. J. Chem.* 52, 3689 (1974).
- [30] J. C. Catlin & F. Cramer, *J. Org. Chem.* 38, 245 (1973).
- [31] T. E. England & T. Neilson, *Can. J. Chem.* 54, 1714 (1976).
- [32] R. W. Adamiak, E. Biala, K. Grzeskowiak, R. Kierzek, A. Kraszewski, W. T. Markiewicz, J. Okupniak, J. Stawinski & M. Wiewiorowski, *Nucleic Acids Res.* 5, 1889 (1978).
- [33] R. W. Adamiak, E. Biala, K. Grzeskowiak, R. Kierzek, A. Kraszewski, W. T. Markiewicz, J. Stawinski & M. Wiewiorowski, *Nucleic Acids Res.* 4, 2321 (1977).
- [34] H. Rokos, A. Myles, W. Hutzenlaub & W. Pfeleiderer, *Chem. Ber.* 108, 2872 (1975).
- [35] J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, P. H. van Deursen, J. F. M. De Rooy & C. B. Reese, *Chem. Commun.* 1976, 167.
- [36] J. F. M. De Rooy, G. Wille-Hazeleger, P. M. J. Burgers & J. H. van Boom, *Nucleic Acids Res.* 6, 2237 (1979).
- [37] J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, P. H. van Deursen, R. Arentzen & C. B. Reese, *Tetrahedron Lett.* 1974, 3785.
- [38] R. W. Adamiak, R. Arentzen & C. B. Reese, *Tetrahedron Lett.* 1977, 1431.
- [39] C. B. Reese, R. C. Timas & L. Yau, *Tetrahedron Lett.* 1978, 2727.
- [40] C. B. Reese, in «Les Colloques de l'INSERM Nucleosides, Nucleotides». Ed. J. L. Barascut & J. L. Imbach, Vol. 81, 159 (1978).
- [41] G. W. Daub & E. E. van Tamelen, *J. Am. Chem. Soc.* 99, 3526 (1977).
- [42] D. J. H. Smith, K. K. Ogilvie & M. F. Gillen, *Tetrahedron Lett.* 21, 861 (1980).
- [43] G. M. Bennet & M. M. Hafez, *J. Chem. Soc.* 1941, 287.
- [44] H. M. Woodburn & C. F. Stuntz, *J. Am. Chem. Soc.* 72, 1361 (1950).
- [45] S. T. Rashevskaya, E. S. Kashcheeva & E. I. Mostoslavskaya, *Zh. Obshch. Khim.* 33, 3998 (1963); *Chem. Abstr.* 60, 9178 (1964).
- [46] V. Weiss, *Diplomarbeit Universität Konstanz* 1980.
- [47] C. B. Reese & A. Ubasawa, *Tetrahedron Lett.* 1980, 2265.
- [48] K. Itakura, N. Katagiri, C. P. Bahl, R. H. Wightman & S. A. Narang, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 7327 (1975).
- [49] R. W. Adamiak, M. Z. Barciszewsky, E. Biala, K. Grzeskowiak, R. Kierzek, A. Kraszewski, W. T. Markiewicz & M. Wiewiorowski, *Nucleic Acids Res.* 3, 3397 (1976).
- [50] J. H. van Boom, P. M. J. Burgers, G. van der Marel, C. H. M. Verdegel & G. While, *Nucleic Acids Res.* 4, 1047 (1977).
- [51] C. B. Reese & Y. T. Y. Kui, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1977, 902.