

NUCLEOSIDE VON FLUORZUCKERN—VI¹ SYNTHESE UND REAKTIVITÄT VON 3'-FLUOR- UND 3'-CHLOR-3'-DESOXY-THYMIDIN

G. ETZOLD, R. HINTSCHE, G. KOWOLLIK und P. LANGEN

Institut für Biochemie der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin-Buch (DDR)

(Received in Germany 6 October 1970; Received in the UK for publication 30 October 1970)

Zusammenfassung—2,3'-Anhydro-1-(2-desoxy- β -D-xylofuranosyl)-thymidin (4) liefert mit HF bzw. HCl in Dioxan die cytotostatisch wirksamen Verbindungen 3'-Fluor- bzw. 3'-Chlor-3'-desoxy-thymidin (3 bzw. 7). AlF_3 katalysiert die Reaktion zu 3. 3'-O-Mesyl-thymidin (1) reagiert mit Fluoriden nicht zum 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor- β -D-xylofuranosyl)-thymidin (2), sondern primär zu 4 und dieses zum Teil weiter zu 3. Die Konfiguration an C-3' von 3 und 7 wird durch Recyclisierung zu 4 bewiesen. Der Cotton-Effekt von 3 und 7 um 270 nm ist positiv. Im alkalischen Milieu gehen 3 und 7 leicht in 3'-Desoxy-2',3'-didehydro-thymidin (6) über. Die Säurebeständigkeit nimmt in der Reihenfolge 1-(2-Desoxy- β -D-xylofuranosyl)-thymidin (8), Thymidin, 3 und 7 zu.

Abstract—2,3'-Anhydro-1-(2-deoxy- β -D-xylofuranosyl)thymine (4) reacts with HF or HCl to give compounds with cytostatic activity, namely 3'-fluoro- or 3'-chloro-3'-deoxythymidine (3 or 7). The formation of 3 is catalysed by AlF_3 . 3'-O-Mesylthymidine reacts with fluorides to form 4 and in part finally 3, but not 1-(2,3-dideoxy-3-fluoro- β -D-xylofuranosyl)thymine (2). The configuration at C-3' of 3 and 7 is established by recyclosation to 4. In alkaline medium, 3 and 7 are easily converted into 2',3'-didehydro-3'-deoxythymidine (6). 3 and 7 show a positive Cotton effect at 270 nm. The acid resistance increases in the order 1-(2-deoxy- β -D-xylofuranosyl)thymine (8), thymidine, 3 and 7.

Wie wir in früheren Mitteilungen berichtet haben, hemmen 5'-Desoxy-5'-fluor-thymidin² und in geringerem Masse auch andere 5'-Desoxy-5'-halogen-thymidine^{1, 3} selektiv die DNS-Synthese. Um die biochemischen Auswirkungen einer entsprechenden Substitution der 3'-OH-Gruppe des Thymidins durch Fluor kennenzulernen, haben wir nach Synthesewegen für das bisher unbekannte 3'-Desoxy-3'-fluor-thymidin gesucht. Zu Vergleichszwecken erschien ferner der Austausch der OH-Gruppe an C-3' des Thymidins gegen ein anderes Halogenatom, wie Chlor von Interesse. In dieser Arbeit werden die Darstellung, die Reaktivität und die Hydrolysenbeständigkeit des 3'-Desoxy-3'-fluoro-thymidins und des isologen 3'-Chlor-Derivats beschrieben. Über die cytotostatischen Eigenschaften dieser Verbindungen wurde inzwischen an anderer Stelle berichtet.⁴

Fluorzucker-Nucleoside wurden bisher (a) durch Kondensation von reaktiven Fluorzucker-Derivaten und Heterocyclus oder (b) durch Einführung von Fluor am intakten Nucleosid erhalten. Nach (a) gelang die Darstellung einiger Pyrimidin- und Purinnucleoside der 5-Desoxy-5-fluorribose,⁵ von 9-(3-Desoxy-3-fluor- β -D-xylofuranosyl)- und 9-(3-Desoxy-3-fluor- α -D-arabofuranosyl)-adenin⁶ sowie von Cytosinnucleosiden der 3-Desoxy-3-fluor- β -D-xylofuranose, 2-Desoxy-2-fluor- β -D-xylofuranose und 2-Desoxy-2-fluor- α - bzw. β -D-arabofuranose.⁷ Bisher bekannte Beispiele für Weg (b) sind der Austausch einer 5'-Tosyloxy-Gruppe in verschiedenen 2'-Desoxyribonucleosiden mit KF oder Tetrabutylammoniumfluorid,^{2, 8} die Gewinn-

nung von Pyrimidin-2'-desoxy-2'-fluor- β -D-ribosiden durch 2,2'-Anhydronucleosidspaltung mit Fluorwasserstoff⁹ sowie die unspezifische Ringöffnung von 1-(2,3-Epoxy- β -D-lyxofuranosyl)-uracil mit HF zu 2'-Desoxy-2'-fluor-uridin und 3'-Desoxy-3'-fluor- β -D-arabofuranosyl-uracil.¹⁰

Zur Gewinnung der 3'-Desoxy-3'-halogen-thymidine zogen wir die Halogensubstitution am intakten Nucleosid (Weg b) der Verknüpfung von Fluorzucker und Base (Weg a) vor, da im Fall von 2-Desoxyzuckern bei der Kondensation erfahrungsgemäss stets Anomerengemische erhalten werden.

Anhydronucleosidspaltung mit Fluor- und Chlorwasserstoff

In Anlehnung an das Verfahren von Fox *et al.*⁹ zur Darstellung von Pyrimidin-2'-desoxy-2'-halogen- β -D-ribofuranosiden wurde zunächst 2,3'-Anhydro-1-(2-desoxy- β -D-xylofuranosyl)-thymidin (**4**) mit wasserfreiem Fluorwasserstoff in Dioxan umgesetzt und dabei ein Gemisch von Thymidin und 3'-Desoxy-3'-fluor-thymidin (**3**) erhalten. Das Verhältnis beider Substanzen hängt wegen der geringen Säurebeständigkeit von 2'-Desoxynucleosiden entscheidend von der Fluorwasserstoffkonzentration ab. Als günstig erwies sich eine ca 1-proz. Lösung von HF in Dioxan in 30-fachem molarem Überschuss. Unter diesen Bedingungen entstehen nach dünnschichtchromatographischer Prüfung Thymidin und **3** in etwa gleichen Mengen.

Die HF-Konzentration kann auf 0.1% und das Molverhältnis von **4** zu HF bis auf 1:2 gesenkt werden, wenn als Katalysator AlF_3 hinzugesetzt wird. Die Auffindung dieses Katalysators erschliesst den Zugang zu Fluorzucker-Nucleosiden aus Anhydroverbindungen, die noch säurelabiler als die hier verwendeten Ausgangsprodukte sind. Andere Fluoride, wie AgF , Hg_2F_2 , SbF_3 , CrF_3 , erwiesen sich als nahezu wirkungslos. Wider Erwarten lenkt BF_3 -Ätherat die Reaktion sogar fast völlig in Richtung Nucleosidspaltung.

In anderen Lösungsmitteln, wie Cellosolve, Acetonitril oder Di-n-propyl-äther, liegen die Ausbeuten an **3** trotz besserer Löslichkeit von **4** wesentlich niedriger. Die Reaktion setzt erst oberhalb 110° ein, ist dann aber in ihrem Verlauf von der Temperatur und der Erhitzungsdauer relativ unabhängig.

Zum Unterschied von der Umsetzung mit HF verläuft die Reaktion von **4** mit HCl in Dioxan schon mit einer äquimolaren Menge HCl quantitativ und einheitlich zum entsprechenden 3'-Desoxy-3'-chlor-thymidin (**7**). Eine Spaltung der N-glykosidischen Bindung tritt erst bei einem Überschuss an HCl als Konkurrenzreaktion zur Spaltung der 2,3'-Anhydrobrücke auf.

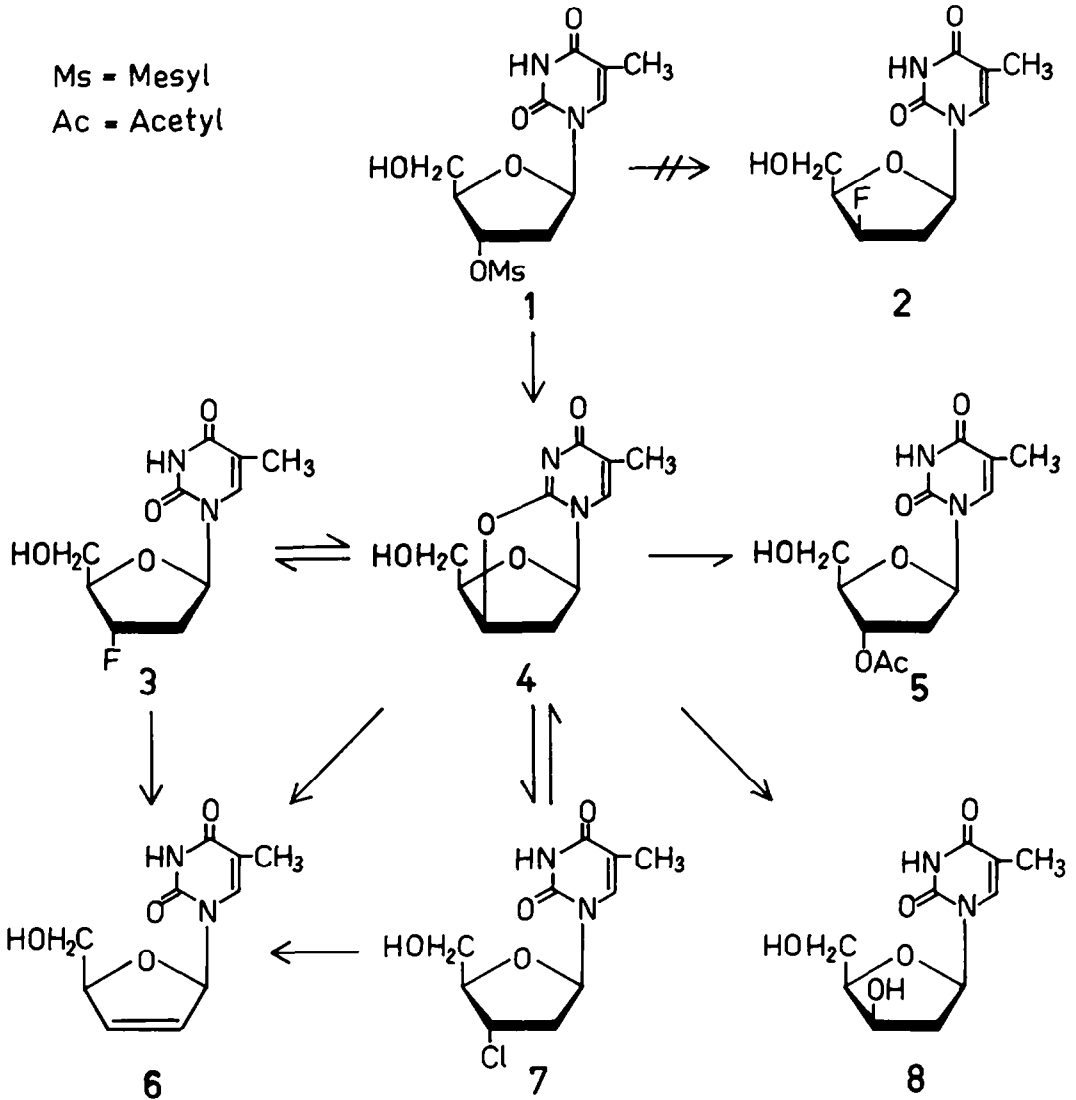
Umsetzungen von 3'-O-Mesyl-thymidin mit Fluoriden

Ausgehend vom 3'-O-Mesyl-thymidin (**1**), dessen Darstellung durch ein Eintopfverfahren rationalisiert wurde, versuchten wir, durch Umsetzung mit KF , KHF_2 , NH_4F , NH_4HF_2 und Tetrabutylammoniumfluorid in einer $\text{S}_\text{N}2$ -Reaktion zu 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor- β -D-xylofuranosyl)-thymidin (**2**)* zu gelangen. Die Umsetzungen wurden im Temperaturbereich von 150–240° sowohl in ein- und mehrwertigen Alkoholen, wie Methanol, Äthanol (Bombenrohr), Äthylenglykol, Diäthylenglykol

* Die Bezeichnungen 1-(2,3-Didesoxy-3-fluor- β -D-xylofuranosyl)-thymidin für **2** und 3'-Desoxy-3'-fluor-thymidin für **3** sind für die Diskussion von Struktur-Wirkungs-Beziehungen vorteilhafter als die Namen (3'S)- und (3'R)-1-(2,3-didesoxy-3-fluor- β -D-glycero-pentofuranosyl)-thymidin, da sie die Übereinstimmung der Konfiguration von Stammzucker und Fluorderivat an C-3' besser erkennen lassen.

Ms = Mesyl

Ac = Acetyl



und Cellosolve, als auch in dipolaren aprotischen Lösungsmitteln, wie Acetonitril, Acetylaceton, Dimethylformamid und Sulfolan, durchgeführt. In den letztgenannten Lösungsmitteln ist das Fluoridion wegen der geringen Solvation besonders nucleophil.¹¹ In keinem dieser Systeme konnte jedoch eine direkte nucleophile Substitution der 3'-Mesyloxy-Gruppe unter Bildung von 2 festgestellt werden.

Statt dessen entstand unter allen genannten Bedingungen primär stets das Anhydronucleosid (4), das bei Verwendung von KHF_2 oder NH_4F in Diäthylenglykol bzw. von NH_4F in Methanol langsam weiter zu 3, mit Tetrabutylammoniumfluorid in DMF bei 150° dagegen zu dem bekannten 3'-Desoxy-2',3'-didehydro-thymidin (6)^{12, 13} reagierte. Tetrabutylammoniumfluorid zersetzt sich bei dieser Temperatur zu stark basischen Produkten, die Umlagerungs- und Eliminierungsreaktionen auslösen

können (s. unter *Konfigurationsaufklärung*). Auch bei Verwendung von 3'-O-Mesyl-5'-O-trityl-thymidin, dessen Tritylgruppe die Reaktivität am C-3' merklich beeinflussen kann,¹² bildete sich unter den genannten Reaktionsbedingungen im ersten Schritt ausschliesslich **4**.

Das Verhalten von **1** gegenüber den genannten Fluoriden stimmt mit der Erfahrung überein, dass der direkte Austausch einer sekundären Sulfonyloxy-Gruppe am Zucker gegen Fluor ohne Nachbargruppenbeteiligung wesentlich schwerer möglich ist¹⁴ als die entsprechende Substitution der primären (terminalen) Sulfonyloxy-Gruppe^{15, 16} und bisher nur in wenigen Fällen mit Tetrabutylammoniumfluorid gelungen ist.¹⁷

Die Reaktion von **1** oder auch direkt von **4** mit KF in *Acetonylaceton* in Gegenwart von Essigsäure, die infolge Protonisierung an N-3 aktivierend auf die Anhydrobrücke wirken soll,^{9, 18} ergab überraschenderweise in ca 60-proz. Ausbeute 3'-O-Acetylthymidin (**5**) anstelle von **3**. Offenbar ist das Acetat-Ion unter diesen Bedingungen nucleophiler als das Fluorid-Ion.

Die Bildung von stellungsisomeren 5'-Desoxy-5'-halogen-Derivaten, wie sie kürzlich unerwarteterweise bei der Reaktion von 2,3'-Anhydro-1- β -D-xylofuranosyluracil mit HJ, HBr und HCl in Dioxan bevorzugt oder ausschliesslich erhalten wurden,^{19, 20} konnten wir nicht beobachten. Auch mit CH₃J ergibt **4** ausschliesslich N-3-methyliertes 3'-Desoxy-3'-jod-thymidin, während das oben genannte 2,3'-

TABELLE I. VERHALTEN DER 3'-HALOGEN-NUCLEOSIDE **3** UND **7** SOWIE DES ANHYDRONUCLEOSIDS **4** GEGENÜBER ALKALIEN. DER REAKTIONSVERLAUF WURDE DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHISCH VERFOLGT (R_F-Werte s. Tab. 3)

Nucleosid (je 0.01 mMol)	Reagenz	Lösungsmittel	Temperatur	Zeit ^a	Reaktions- produkte
3	0.04 mMole ^b K-t-butylat	DMF (0.5 ccm)	100°	6 Stdn.	100% 6 ^c
7	"	"	"	10 Min.	45% 6 und 55% 4
4	"	"	"	7 Min.	100% 6
3	0.25 mMole NaOH	H ₂ O/Propanol (1 : 3)(1 ccm) ^d	150°	25 Stdn.	50% 6 und 50% 8 ^e
7	"	"	"	1 Sde.	60% 6 und 40% 8
4	"	"	"	5 Min.	100% 8
3	0.01 mMol C ₂ H ₅ ONa	DMF/Äthanol (9 : 1)(0.3 ccm)	100°	1 Sde.	keine Reaktion ^f
7	"	"	"	1 Sde.	100% 4 ^g

^a Reaktionszeit bis zur vollständigen Umwandlung des Ausgangsprodukts

^b Zur Beschleunigung der Umsetzung wurden im Fall von **3** nach 4 Stdn. weitere 0.02 mMole Butylat zugegeben

^c Mit *Haines-Isherwood*-Reagenz auf 2',3'-ungesättigte Nucleoside¹² resultiert eine intensive Blaufärbung

^d Im verschraubten Stahlgefäss

^e Bei Vergrösserung der Ansätze entsteht auffälligerweise bevorzugt **6**

^f Bei längerem Erhitzen mit 3 Moläquiv. C₂H₅ONa in reinem DMF auf 130° wurde quantitativ **6** erhalten

^g Bei zehnfach grösserem Ansatz entstehen ca 20% **6**

Anhydro-xylofuranosyl-uracil wiederum nur die entsprechende 5'-Desoxy-5'-jod-Verbindung lieferte.²⁰ Offenbar erschwert oder verhindert eine 2'-Desoxygruppierung die 3' → 5'-Umlagerung.

Konfigurationsaufklärung

Da erfahrungsgemäss die nucleophile Substitution am Lactolring-Brückenatom von Anhydronucleosiden unter Konfigurationsumkehr verläuft, war für **3** und **7** die 3'-"ribo"- und nicht die 3'-"xylo"-Konfiguration¹¹ zu erwarten. Zur Bestätigung dieser Annahme wurde versucht, **3** und **7** in Analogie zu entsprechenden Strukturuntersuchungen an 2'-Halogen-Nucleosiden²¹ wieder in das 2,3'-Anhydronucleosid **4** zu überführen. Diese basenkatalysierte Reaktion ist wegen ihres strengen S_N2-Mechanismus nur bei *trans*-Stellung von Pyrimidinring und Substituenten an C-3' möglich.

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, erhält man beim Erhitzen von **3** mit K-t-butylat in DMF wider Erwarten anstelle von **4** jedoch das Eliminierungsprodukt **6**. Es blieb die Frage offen, ob **6** unmittelbar aus **3** bzw. dem diastereomeren "xylo"-Derivat durch HF-Eliminierung oder aber aus primär gebildetem **4** durch Umlagerung entstanden war. Ein Kontrollversuch ergab, dass sich **4** mit K-t-butylat in DMF, wie auch in Dimethylsulfoxid,¹³ vergleichsweise schnell vollständig in **6** umwandeln kann (vgl. Tab. 1). Um die intermediäre Bildung eines Anhydronucleosids bei der Fluorabspaltung zu beweisen, wurde die Recyclisierung von **3** unter Bedingungen versucht, unter denen das Anhydronucleosid rascher zum 1-(2-Desoxy-β-D-xylofuranosyl)-thymidin (**8**) hydrolysiert als zu **6** umgelagert wird. Als günstig erwies sich das Erhitzen in wässrig-propanolischer Natronlauge bestimmter Konzentration. **4** wird hierbei bereits innerhalb von 5 Min. quantitativ zu **8** gespalten. **3** wandelt sich unter diesen Bedingungen im Verlauf von 25 Stdn. in ein Gemisch von **6** und dem erwarteten Nucleosid **8** um (Verhältnis 1 : 1). Da es sich bei **3** auf Grund des NMR-Spektrums* sowie der dünnschichtchromatographischen Reinheitsprüfung in verschiedenen Systemen um eine stereochemisch einheitliche Verbindung handelt, folgt aus dem Ergebnis dieses alkalischen Abbaus, dass (a) an C-3' von **3** die "ribo"-Konfiguration vorliegt und dass (b) das ungesättigte Nucleosid **6** in Konkurrenz zur Anhydronucleosidbildung unmittelbar aus **3** durch Eliminierung von HF entstehen kann.

Das Chlor-Derivat **7** wandelt sich beim Erhitzen mit K-t-butylat zu 45% in **6** und zu 55% in **4** um, wobei wiederum nicht zu entscheiden ist, ob und in welchem Umfang **6** durch direkte HCl-Eliminierung oder durch nachträgliche Umlagerung von primär gebildetem **4** entstanden ist. Dass eine direkte Halogenwasserstoff-Eliminierung wie bei **3** möglich ist, zeigt die Reaktion von **7** mit wässrig-propanolischer Natronlauge, die 60% **6** und nur 40% **8** ergibt. Einen klaren Beweis für die "ribo"-Konfiguration an C-3' von **7** liefert dessen Umsetzung mit 1 Moläquiv. Na-äthylat in DMF/Äthanol bei 100°, die quantitativ zu **4** führt (vgl. Tab. 1). In Übereinstimmung mit der bekannten geringeren Austrittstendenz von Fluor gegenüber Chlor bei S_N2-Reaktionen²² bleibt **3** unter diesen Bedingungen unverändert.

Der Circular dichroismus von **3** und **7** zeigt wie der von Thymidin²³ im Bereich von 270 nm einen stark *positiven* und um 220 nm und 240 nm je einen *negativen* Cotton-Effekt. Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, ändern sich die λ-Werte der Extrema und die

* Über die NMR-spektroskopische Analyse von **3** und **7** wird an anderer Stelle ausführlich berichtet.

TABELLE 2. EXTREMA DES CIRCULARDICHROISMUS^a

Nucleosid	λ_1 (nm)	$[\theta]_1$	λ_2 (nm)	$[\theta]_2$	λ_3 (nm)	$[\theta]_3$
3	271	+6000	240	-4200	216	-7000
7	268	+7500	240	-4100	215	-5900
Thymidin	273	+8400	240	-4500	215	-6100

^a Gemessen mit dem Dichrograph II von Roussel-Jouan, Paris, in Methanol bei 25°C. Küvette 0.1 mm. Nucleosidkonzentration $1 \cdot 10^{-5}$ m.

Elliptizitäten (θ) bei der Substitution der 3'-OH-Gruppe des Thymidins durch Fluor oder Chlor nur wenig.

Hydrolyseversuche

Um festzustellen, ob der Austausch der 3'-OH-Gruppe von 2'-Desoxy-ribofuranosiden gegen Halogen und Konfigurationsänderungen an C-3' die Hydrolysenempfindlichkeit der N-glykosidischen Bindung beeinflussen, wurde die Kinetik der

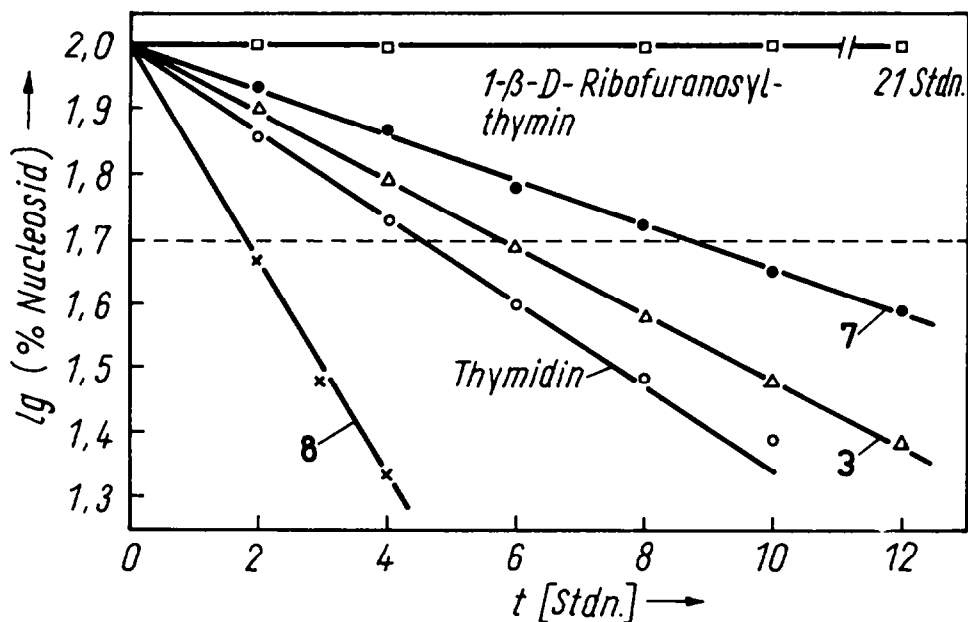


ABB 1. Hydrolysegeschwindigkeit verschiedener 1-(2-Desoxy-β-D-pentofuranosyl)-thymine und von 1-β-D-Ribofuranosyl-thymin in n HCl bei 80°. Anfangskonzentration 0.01 m.

Nucleosidspaltung von 3, 7 und 8 sowie von Thymidin in n HCl bei 80° verfolgt. Zum Vergleich wurde auch 1-β-D-Ribofuranosyl-thymin eingesetzt. Wie Abb 1 zeigt, weisen innerhalb der Gruppe mit "ribo"-Konfiguration das 3'-Fluor-Derivat 3 ($t_{1/2} = 6$ Std.) und vor allem das 3'-Chlor-Homologe 7 ($t_{1/2} = 9$ Std.) eine höhere Beständigkeit auf als die entsprechende 3'-Hydroxy-Verbindung (Thymidin: $t_{1/2} = 4.5$ Std.).

Eine ähnliche Erhöhung der Säurebeständigkeit bei Austausch einer OH-Gruppe des Zuckers gegen Fluor wurde auch bei der 1-O-Methyl-6-desoxy-6-fluor- α -D-galaktose festgestellt.¹⁶ Die Stabilität von **3** und **7** erreicht allerdings bei weitem nicht die des 1- β -D-Ribofuranosyl-thymins, das unter diesen Hydrolysebedingungen unverändert bleibt. Dieser Unterschied bestätigt das Vorliegen einer intakten 2'-Desoxy-Gruppierung in **3** und **7**.

Durch eine Konfigurationsumkehr an C-3' des Thymidins wird die Hydrolysesengeschwindigkeit um etwa das Zweieinhalbfache (**8**: $t_{1/2} = 1.8$ Stdn.) erhöht. Offenbar handelt es sich dabei um einen generell gültigen Zusammenhang zwischen der Konfiguration an C-3' und Säurestabilität, da unter gleichen Bedingungen auch Desoxyuridin etwa dreimal langsamer hydrolysiert wird als das 3'-stereoisomere 1-(2-Desoxy- β -D-xylofuranosyl)-uracil.²⁴

Aus Abb 1 geht ferner hervor, dass zwischen dem Logarithmus der Nucleosidkonzentration und der Zeit eine lineare Beziehung besteht, d.h. dass es sich um eine Reaktion erster Ordnung handelt, die wegen des hohen Wasserüberschusses als eine pseudounimolekulare Reaktion aufzufassen ist.²⁵

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Schmelzpunkte (korr. Werte) wurden auf dem Mikroheiztisch nach Boëtius und die spezifischen Drehungen visuell mit dem Kreispolariometer von Schmidt & Haensch bestimmt. Die UV-Absorptionsspektren wurden mit dem selbstregistrierenden Spektralphotometer Beckman DK-2 aufgenommen.

Der Nucleosidgehalt in den Eluaten der Säulenchromatographie wurde durch kontinuierliche Aufzeichnung der UV-Absorption bei 254 nm mit dem Uvicord II (LKB-Produkte, Stockholm) bestimmt.

Fließmittel zur Chromatographie: A = wassergesättigter Essigester. B = Essigester/Äthanol/Wasser (4:1:2, obere Phase). C = Chloroform/Methanol (9:1). D = Essigester/Isopropylalkohol/konz. Ammoniak (5:1:1). E = Essigester/Cyclohexan (9:1).

Dünnschichtchromatographie. Aufsteigend bei Raumtemperatur und Kammersättigung auf 0.25 mm Kieselgel HF₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt), aktiviert bei 110°. Die Substanzen wurden durch Fluoreszenzlösung im UV-Licht oder durch Besprühen mit konz. Schwefelsäure lokalisiert.

TABELLE 3. R_f -WERTE BEI DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

Verbindung	Fließmittel			
	A	B	C	D
3'-O-Mesyl-thymidin (1)	0.43	0.68	0.36	0.55
3'-Desoxy-3'-fluor-thymidin (3)	0.44	0.70	0.35	0.53
2,3'-Anhydro-1-(2-desoxy- β -D-xylofuranosyl)-thymidin (4)	0.00	0.08	0.05	0.24
3'-O-Acetyl-thymidin (5)	0.43	0.68	0.36	0.55
3'-Desoxy-2',3'-didehydro-thymidin (6)	0.27	0.56	0.32	0.45
3'-Desoxy-3'-chlor-thymidin (7)	0.52	0.74	0.37	0.57
2'-Desoxy- β -D-xylofuranosyl-thymidin (8)	0.13	0.45	0.17	0.33
Thymidin	0.27	0.56	0.24	0.35

3'-O-Mesyl-thymidin (**1**). Eine Lösung von Thymidin (10 g, 41 mMol) in wasserfreiem Pyridin (200 ml) wird mit Tritylchlorid (14 g, 50 mMol) versetzt und eine Woche bei Raumtemperatur verschlossen stengelassen. Die auf 0° gekühlte Lösung wird mit Pyridin (50 ml) verdünnt und nach Zugabe von Mesylchlorid (10 ml, 128 mMol) über Nacht bei 0° verschlossen aufbewahrt. Die Lösung wird unter kräftigem Rühren in Eiswasser (2 l) gegossen, der Niederschlag abgesaugt, mit Wasser gewaschen, getrocknet und nach l.c.²⁷ mit 80-proz. Essigsäure behandelt. Das nach der Aufarbeitung resultierende schwach bräunliche Rohprodukt (8.2 g, 62%) gibt nach Umkristallisation aus Äthanol 3'-O-Mesyl-thymidin

[gefunden: C, 41.3; H, 5.2; N, 8.6. Für $C_{11}H_{16}N_2O_7S$ berechnet: C, 41.2; H, 5.0; N, 8.8 %], Schmp. 150–153° (Zers.) (Lit. 152–153°, 26 153–155°²⁸). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel H (Merck) mit Chloroform/Methanol (8:2) steigt der Schmelzpunkt auf 160–161°.

3'-Desoxy-3'-fluor-thymidin (3)

Verfahren a. Verbindung **4**^{18, 27, 28} (1.0 g, 4.48 mMol) und AlF_3 (1.0 g) werden mit 0.1% HF* in wasserfreiem Dioxan (v/v, 1400 ml) 4–5 Stunden im verschlossenen Stahlgefäß auf 150–170° (Badtemperatur, vorgeheizt auf 220°) erwärmt. Nach dem Abkühlen verdünnt man die klare Lösung mit Wasser (100 ml), neutralisiert mit $CaCO_3$ und zentrifugiert ab. Der Rückstand wird mit warmem Aceton (\approx 100 ml) aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Die vereinigten Überstände werden i. Vak. eingeengt und die Lösungsmittelreste mit Äthanol abgetrieben. Nach Zusatz von Essigester (ca 20 ml) fällt die Hauptmenge des entstandenen Thymins aus.

Die vereinigten Filtrate von drei derartigen Ansätzen werden eingeengt. Der Rückstand wird an Kieselgel H (Merck) (400 g), das mit Wasser (200 ml) deaktiviert wurde, mit Essigester unter leichtem Überdruck in einer Glassäule (Durchmesser 3.5 cm) chromatographiert. Die Fraktionen 58–74 (zu je 10 ml) werden vereinigt und i. Vak. eingeengt. Der kristalline Rückstand wird mit Essigester/Cyclohexan (7:3) ausgewaschen (1.1 g, 34%) und ergibt nach Umkristallisation aus Essigester 3'-Desoxy-3'-fluor-thymidin [gefunden: C, 48.9; H, 5.5; F, 7.9; N, 11.6. Für $C_{10}H_{13}FN_2O_4$ berechnet: C, 49.2; H, 5.4; F, 7.8; N, 11.5%] als farblose Kristalle (0.9 g, 28%), Schmp. 176–177°; NMR-Spektrum [$(D_3C)_2SO$, Tetramethylsilan als innerer Standard, Gerät VARIAN A-60 A] zeigt folgende Signale: δ 5.22 (m), 1 H, H(3'); $J_{H(3'),F}$ 53 Hz, $J_{H(2),F}$ 27 Hz; UV-Absorption (Wasser): λ max 266, λ min 245.5 nm; $[\alpha]_D^{20}$ –6.3° (c 0.96, in Methanol).

Verfahren b. Verbindung **1** (1 g, 3 mMol) und KHF_2 oder NH_4F (10 g) werden in trockenem Diäthylenglykol (100 ml) im vorgeheizten Bad 90 Min. auf 190° (Badtemperatur) erhitzt. Das Lösungsmittel wird i. Vak. (Ölpumpe, Badtemperatur max. 140°) abgetrieben und der Rückstand nach Zugabe von heissem Wasser (3 ml) mit Celite²⁹ (10 g) vermischt. Das Gemisch wird an einer Celite-Säule (Abmessungen 3.6 × 83 cm; Füllung 400 g Celite/120 ml Wasser nach l.c.³⁰) mit wassergesättigtem Essigester chromatographiert. Aus den Fraktionen 6–18 (je 10 ml) wird nach Einengen i. Vak. und evtl. Nachdestillieren mit absol. Äthanol kristallines 3'-Desoxy-3'-fluor-thymidin erhalten. Ausbeute 0.11 g (14%). Physikalische Daten wie unter (a).

3'-Desoxy-2',3'-didehydro-thymidin (6)

Verbindung **3** (122 mg, 0.5 mMol) wird mit K-t-butylat (336 mg, 3 mMol) in DMF (13 ml) 6 Stdn. auf 100° erhitzt. Man erhält nach Einengen i. Vak. und weiterer Aufarbeitung nach Lit.¹³ 3'-Desoxy-2',3'-didehydro-thymidin [gefunden: C, 53.6; H, 5.5; N, 12.4. Für $C_{10}H_{12}N_2O_4$ gefunden: C, 53.6; H, 5.4; N, 12.5%], Schmp. 163° (Lit.¹³ 165–166° nach Umkristallisation aus Benzol/Äther), Ausbeute 91 mg (82%). Die Substanz gibt mit Haines-Ishewood-Reagenz¹² auf der Dünnschichtplatte (Kieselgel HF, Merck) eine intensive Blaufärbung.

3'-Desoxy-3'-chlor-thymidin (7)

2,3'-Anhydro-1-(2-desoxy- β -D-xylofuranosyl)-thymidin (336 mg, 1.5 mMol) wird mit Dioxan (165 ml), das die äquimolare Menge HCl (1.5 mMol) enthält, unter Rückfluss und Feuchtigkeitsausschluss auf 110° (Badtemperatur) erhitzt, bis eine klare Lösung entstanden ist (ca 80 Min.). Das Lösungsmittel wird i. Vak. abgetrieben und der Rückstand nacheinander mit Äthanol, Isopropanol und schliesslich mehrmals mit Essigester aufgenommen und jeweils wieder eingeengt, bis beim Anreiben Kristallisation einsetzt. Der kristalline, dünnschichtchromatographisch einheitliche Rückstand wird mit Essigester/Petroläther (7:3) aufgenommen und ausgewaschen (265 mg, 77%). Nach Umkristallisation aus Essigester/Cyclohexan (7:3) und Trocknung über Natronkalk erhält man 3'-Desoxy-3'-chlor-thymidin [gefunden: C, 46.2; H, 5.0; Cl, 14.1; N, 10.6. Für $C_{10}H_{13}ClN_2O_4$ berechnet: C, 46.1; H, 5.1; Cl, 13.6; N, 10.7%], Schmp. 167–169°, Ausbeute 206 mg (60%). Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel H (Merck) mit Essigester als Elutionsmittel liegt der Schmp. bei 171–172°; UV-Absorption (H_2O): λ_{max} 266.5, λ_{min} 245.5 nm; $[\alpha]_D^{20}$ +16.9° (c 1.02, in Methanol).

* Der Fluorwasserstoff wurde durch zweimaliges Destillieren getrocknet. Ein Entwässern mit $SOCl_2$ ist nicht zu empfehlen, da entgegen den Angaben von K. Wiechert, Z. anorg. Chem. **261**, 314 (1950) auch nach wiederholten anschliessenden Destillationen noch HCl-Reste vorhanden sind, mit denen **4** schneller reagiert als mit HF, so dass als Nebenprodukt **7** entsteht.

2,3'-Anhydro-1-(2-desoxy- β -D-xylofuranosyl)-thymidin (4)

3'-Desoxy-3'-chlor-thymidin (90 mg, 0.35 mMol) wird mit einer Lösung von 0.357 n äthanolischem C_2H_5ONa (1 ml, 0.35 mMol) in DMF (10.5 ml) 1 Stunde auf 100° (Badtemperatur) erhitzt. Nach Zugabe von Wasser (5 ml) wird mit Dowex 50 WX 8 (H⁺) neutralisiert, i. Vak. eingeengt und der Rückstand säulenchromatographisch an Celite^{29, 30} (40 g, Säulendurchmesser 2.2 cm) mit Fliessmittel B getrennt. Nach Abtrennung von 3'-Desoxy-2',3'-didehydro-thymidin (6) in den Fraktionen 2–10 (je 10 ml) erhält man aus den Fraktionen 28–40 nach Umkristallisation aus 90-proz. Äthanol 2,3'-Anhydro-1-(2-desoxy- β -D-xylofuranosyl)-thymidin [gefunden: C, 53.7; H, 5.4; N, 12.3. Für $C_{10}H_{12}N_2O_4$ berechnet: C, 53.6; H, 5.4; N, 12.5%], Schmp. 240° (Lit.¹⁸ 230–231°;²⁷ 241–242°;²⁸ 235–237°), Ausbeute 53 mg (72%).

3'-O-Acetyl-thymidin (5)

3'-O-Mesyl-thymidin (333 mg) oder 2,3'-Anhydro-1-(2-desoxy- β -D-xylofuranosyl)-thymidin (224 mg, 1 mMol) wird in Acetylacetone (35 ml) mit wasserfreiem KF (0.5 g) und Essigsäure (0.7 ml) 90 Min. auf 190° (Badtemperatur) erhitzt. Die dunkelrote Lösung wird i. Vak. (Ölpumpe) eingeengt, der Rückstand in Wasser (5 ml) aufgenommen, mit Celite^{29, 30} (10 g) vermischt und säulenchromatographisch an Celite (250 g, Säulendurchmesser 3 cm) mit Essigester/Cyclohexan/Wasser (6:4:2, obere Phase) aufgetrennt. Der Rückstand der Fraktionen 45–90 (je 10 ml) wird aus Essigester mit Cyclohexan gefällt (170 mg, 60%) und ergibt nach Umkristallisation aus Essigester 3'-O-Acetyl-thymidin [gefunden: C, 50.4; H, 5.8; N, 9.7. Für $C_{12}H_{16}N_2O_6$ berechnet: C, 50.7; H, 5.7; N, 9.9%], Schmp. 176° (Lit.²⁶ 172–174°;³¹ 176°), Misch-Schmp. mit authentischer Substanz³¹ ohne Depression. UV-Absorption (H_2O): λ_{max} 266, λ_{min} 234 nm, (0.1 n NaOH): λ_{max} 266, λ_{min} 245 nm. Erwärmen von 5 mit äthanolischem C_2H_5ONa ergibt quantitativ Thymidin.

Hydrolyse der Nucleoside in n HCl

Das Nucleosid (2–3 mg) wird in n HCl (1 ml) in zugeschmolzener Ampulle auf 80° (Badtemperatur) erwärmt. In Abständen von 2 Stdn. werden Proben (0.02 ml) abgenommen und auf Kieselgel-Dünnschicht mit Fliessmittel B chromatographiert.

Der Nucleosidfleck wird ausgeschabt, mit Methanol (1.5 ml) eluiert, zentrifugiert und der Nucleosidgehalt aus der Extinktion berechnet, wobei als Leerwert das Eluat einer gleichgrossen Kieselgelfläche in gleicher Höhe dient.

Die Ergebnisse sind in Abb 1 wiedergegeben. Die Konzentrationsangaben sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen. Es wurden folgende Extinktionskoeffizienten ϵ_{max} (in $l \cdot Mol \cdot cm^{-1}$) für 267 nm zugrundegelegt: 3:9360; 7:9970; 8:9450;¹⁸ Thymidin:9650;³² 1- β -D-Ribofuranosyl-thymidin:9700.³³

Herrn Prof. Dr. K. Repke danken wir für die ständige Förderung dieser Arbeit.

Unsere Mitarbeiter Frl. R. Wohlfeil und Herr K. Gaertner haben durch die sorgfältige Durchführung der Experimente entscheidend zum Gelingen dieser Untersuchungen beigetragen.

LITERATUR

- V. Mitteilung, G. Kowollik, K. Gaertner und P. Langen, *Z. Chem.* **10**, 141 (1970)
- P. Langen und G. Kowollik, *Eur. J. Biochem.* **6**, 344 (1968)
- P. Langen, G. Kowollik, M. Schütt und G. Etzold, *Acta. biol. med. Germ.* **23**, K 19 (1969)
- P. Langen, G. Etzold, R. Hintsche und G. Kowollik, *Ibid.* **23**, 759 (1969)
- H. M. Kissman und M. J. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 5559 (1958)
- J. A. Wright und N. F. Taylor, *Carbohydr. Res.* **6**, 347 (1968)
- J. A. Wright, D. P. Wilson und J. J. Fox, *J. Med. Chem.* **13**, 269 (1970)
- G. Kowollik, K. Gaertner, G. Etzold und P. Langen, *Carbohydr. Res.* **12**, 301 (1970)
- J. F. Codington, I. L. Doerr und J. J. Fox, *J. Org. Chem.* **29**, 558 (1964)
- R. J. Cushley, J. F. Codington und J. J. Fox, *Canad. J. Chem.* **46**, 1131 (1968)
- A. J. Parker, *Advan. in Org. Chem.* **5**, 1 (1962)
- T. A. Khwaja und C. Heidelberger, *J. Med. Chem.* **10**, 1066 (1967)
- J. P. Horwitz, J. Chua, M. A. Da Rooge, M. Noel und I. L. Klundt, *J. Org. Chem.* **31**, 205 (1966); J. P. Horwitz und J. Chua in W. W. Zorbach und R. S. Tipson, *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry* Vol. 1, S. 344. Wiley, Interscience, New York (1968)
- B. Helfferich und M. Vock, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **74**, 1807 (1941); F. H. Newth und L. F. Wiggins, *J. Chem. Soc.* 187 (1950); J. B. Lee und M. M. El Sawi, *Tetrahedron* **12**, 226 (1961); V. A. Welch und

- P. W. Kent, *J. Chem. Soc.* 2266 (1962); B. R. Baker und A. H. Haines, *J. Org. Chem.* **28**, 438 (1963); P. W. Kent, K. R. Wood und V. A. Welch, *J. Chem. Soc.* 2493 (1964); K. R. Wood, D. Fischer und P. W. Kent, *Ibid.* 1994 (1966); N. Baggett, K. W. Buck, A. B. Foster, R. Jefferis und J. M. Webber, *Carbohydr. Res.* **4**, 343 (1967)
- ¹⁵ B. Helferich und A. Gnüchtel, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **74**, 1035 (1941); N. F. Taylor und P. W. Kent, *J. Chem. Soc.* 872 (1958)
- ¹⁶ P. W. Kent, A. Morris und N. F. Taylor, *Ibid.* 299 (1960)
- ¹⁷ S. Cohen, D. Levy und E. D. Bergmann, *Chem. & Ind.* 1802 (1964); A. B. Foster, R. Hems und J. M. Webber, *Carbohydr. Res.* **5**, 292 (1967); J. S. Brimacombe, A. B. Foster, R. Hems und L. D. Hall, *Ibid.* **8**, 249 (1968)
- ¹⁸ J. J. Fox und N. C. Miller, *J. Org. Chem.* **28**, 936 (1963)
- ¹⁹ K. Kikugawa und T. Ukita, *Chem. Pharm. Bull.* **17**, 775 (1969)
- ²⁰ K. Kikugawa, M. Ichino und T. Ukita, *Ibid.* **17**, 785 (1969)
- ²¹ J. F. Codrington, I. L. Doerr und J. J. Fox, *J. Org. Chem.* **29**, 564 (1964)
- ²² E. M. Kosower, *Molecular Biochemistry* S. 107, McGraw-Hill, New York (1962)
- ²³ D. W. Miles, R. K. Robins und H. Eyring, *Proc. US Natl. Acad. Sci.* **57**, 1138 (1967)
- ²⁴ E. R. Garrett, J. K. Seydel und A. J. Sharpen, *J. Org. Chem.* **31**, 2219 (1966)
- ²⁵ H. Venner, Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* **344**, 189 (1966); M. Sano, *Chem. Pharm. Bull.* **10**, 313 (1962)
- ²⁶ J. P. Horwitz, J. A. Urbanski und J. Chua, *J. Org. Chem.* **27**, 3300 (1962)
- ²⁷ G. Kowollik, K. Gaertner und P. Langen, *Tetrahedron Letters* 3863 (1969); T. Naito, M. Hirata, Y. Nakai, T. Kobayashi und M. Kanao, *Chem. Pharm. Bull.* **16**, 285 (1968)
- ²⁸ A. F. Russell und J. G. Moffatt, *Biochemistry* **8**, 4889 (1969)
- ²⁹ Hersteller Johns-Manville Corporation, Zur Reinigung vgl. H. M. Kissman, C. Pidacks und B. R. Baker, *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 18 (1955); l.c.¹⁹
- ³⁰ G. Etzold und P. Langen, *Chem. Ber.* **98**, 1988 (1965)
- ³¹ A. M. Michelson und A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* 951 (1953)
- ³² J. J. Fox und D. Shugar, *Biochim. Biophys. Acta* **9**, 369 (1952)
- ³³ T. Nishimura, B. Shimizu und I. Iwai, *Chem. Pharm. Bull.* **12**, 1471 (1964)