

## MAX HOFFER

 $\alpha$ -Thymidin

Aus dem Wissenschaftlichen Laboratorium der Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, N. J., USA

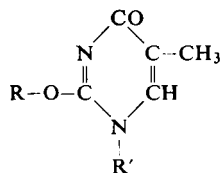
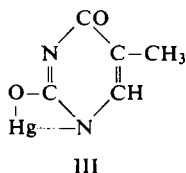
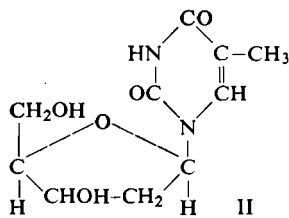
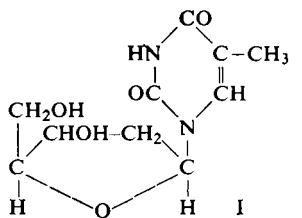
(Eingegangen am 3. Juni 1960)

*Herrn Professor Dr. Richard Kuhn zum 60. Geburtstag*

Die Kondensation von Monoquecksilberthymidin mit Di-*p*-toluyl-desoxy-D-ribofuranosylchlorid führt vorwiegend zum  $\alpha$ -Thymidinderivat, wenn man sie in stark polaren Verdünnungsmitteln wie Dimethylformamid ausführt. Daß es sich nicht um eine Kondensation am N-3 des Thymins handelt, kann durch Methylierung des Produktes am N-3 gezeigt werden.

$\alpha$ -Thymidin (I), das Anomere des natürlichen  $\beta$ -Thymidins (II), wurde zuerst als Nebenprodukt bei einer Synthese des letzteren erhalten<sup>1)</sup>. Monoquecksilberthymidin (III) reagierte mit 3,5-Di-*p*-toluyl-2-desoxy-D-ribofuranosylchlorid unter Bildung eines Gemisches aus viel 3'.5'-Di-*p*-toluyl- $\beta$ -thymidin (IV) und wenig 3'.5'-Di-*p*-toluyl- $\alpha$ -thymidin (V), das nach Trennung und nachfolgender Methanolyse<sup>2)</sup> die beiden anomeren Thymidine II und I ergab.

Bei dieser Reaktion, die in warmem Toluol als Verdünnungsmittel ausgeführt wurde, mußten auf ein Mol. der Quecksilberverbindung III nahezu zwei Moll. des Desoxypentosechlorids angewendet werden, wobei allerdings ein Überschuß an letzterem strikt zu vermeiden war, damit kein freier Chlorwasserstoff auftreten konnte. Andernfalls kam es nämlich vor, daß der Ansatz vollkommen verharzte. In dieser Reaktion bildete sich zunächst *N*-1-*O*-Bis-[3'.5'-di-*p*-toluyl-desoxyribo-

IV: R = H, R' =  $\beta$ -Di-*p*-toluyl-desoxy-D-ribofuranosylV: R = H, R' =  $\alpha$ -Di-*p*-toluyl-desoxy-D-ribofuranosylVI: R = R' =  $\alpha,\beta$ -Di-*p*-toluyl-desoxy-D-ribofuranosylVII: R =  $\alpha,\beta$ -Di-*p*-toluyl-desoxy-D-ribofuranosyl, R' = H

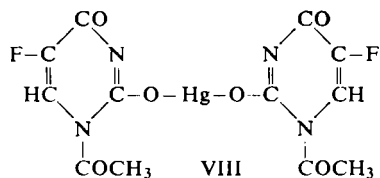
<sup>1)</sup> M. HOFFER, R. DUSCHINSKY, J. J. FOX und N. YUNG, J. Amer. chem. Soc. **81**, 4112 [1959].

<sup>2)</sup> F. WEYGAND und W. SIGMUND, Z. Naturforsch. **9b**, 800 [1954].

furanosyl]-thymine (VI), das aber bei der Aufarbeitung mit Wasser die am Sauerstoff gebundene Desoxypentose-Gruppe nahezu augenblicklich durch Hydrolyse verlor und in das Gemisch von IV und V überging.

Die Synthese gelang nicht, wenn man an Stelle der Quecksilberverbindung III das Dithyminyl-quecksilber von J. J. FOX, N. YUNG, J. DAVOLL und G. B. BROWN<sup>3)</sup>, das sich für die Herstellung von Ribofuranosyl-thymine gut eignet, oder die Thymin-Quecksilberverbindung von V. C. MYERS<sup>4)</sup> mit Di-*p*-toluyl-desoxyribofuranosylchlorid umzusetzen versuchte. In beiden Fällen entstand ausschließlich *O*-Di-*p*-toluyl-desoxyribofuranosyl-thymine (VII), das beim Aufarbeiten zu Thymin und Di-*p*-toluyl-desoxyribofuranose hydrolysiert wurde.

Um Monoquecksilberthymine (III) zu erhalten, muß man *N*-1-Acetyl-thymine<sup>5)</sup> mit Quecksilber(II)-acetat in Methanol kochen. Bei dieser Reaktion entstehen neben einem Mol. III zwei Moll. Essigsäure und ein Mol. Methylacetat. Der Mechanismus konnte in einem analogen Falle (beim 5-Fluor-uracil) durch Isolierung von Zwischenprodukten geklärt werden. Dort erhielt man zunächst ein wohl kristallisiertes Bis-[*N*-1-acetyl-5-fluor-uracil]-quecksilber (VIII) vom Schmp. 206°.



Erwärmte man VIII mit Metallacetaten in Methanol, so entstand Methylacetat, während das Kation an den Stickstoff trat. Insbesondere entstand mit Quecksilber(II)-acetat ein Monoquecksilber-5-fluor-uracil, das dem Monoquecksilberthymine (III) entsprach. In der Thyminreihe war die Isolierung einer zu VIII analogen Quecksilberverbindung nicht gelungen, doch war die acetylübertragende Wirkung des Acetylthymins schon von SPECTOR und KELLER<sup>5)</sup> beobachtet worden. Die Acetylierung des Thymins kann durch Zugabe katalytischer Mengen Pyridin außerordentlich beschleunigt werden (s. Versuchsteil).

Hier beschreiben wir nun eine Modifikation der erwähnten Thymidinsynthese, die zu  $\alpha$ -Thymidin (I) als Hauptprodukt führt. Arbeitet man nämlich in der Kondensationsstufe mit einem stark polaren Verdünnungsmittel (Dimethylformamid), so bildet sich verhältnismäßig wenig  $\beta$ -Thymidinderivat (IV) zu Gunsten des  $\alpha$ -Thymidinderivats (V). Außerdem kann die Reaktion schon bei Raumtemperatur ausgeführt werden, wohl wegen der größeren Löslichkeit der Reaktionsteilnehmer. Eine Verharzung durch das Auftreten freien Chlorwasserstoffs ist in diesem Falle nicht zu befürchten, da dieser offenbar durch das Dimethylformamid genügend gebunden bleibt.

<sup>3)</sup> J. Amer. chem. Soc. **78**, 2117 [1956].

<sup>4)</sup> J. biol. Chemistry **7**, 249 [1909]. Diese Quecksilberverbindung dürfte übrigens durch Thymin verunreinigtes Thyminylquecksilberchlorid gewesen sein, denn durch Nacharbeit der Literaturangabe gewonnene Präparate enthielten große Mengen Halogen.

<sup>5)</sup> L. B. SPECTOR und E. B. KELLER, J. biol. Chemistry **232**, 185 [1958].

$\alpha$ -Thyminidin wird durch Coli-Nucleosidase im Gegensatz zu  $\beta$ -Thyminidin nicht gespalten. Es erwies sich auch sonst biologisch und pharmakologisch uninteressant. Eine Bedeutung im Haushalt der Natur wird dieser Verbindung wohl kaum zukommen.

Von Wichtigkeit ist der Nachweis, daß die Isomerie der beiden Thyminidine eine Anomerie und nicht etwa eine Stellungsisomerie zwischen *N*-1 und *N*-3-substituiertem Thymin ist. Zwar hat A. MOTCHANE<sup>6)</sup> einen solchen auf Grund der UV-Spektren und der von J. J. FOX und D. SHUGAR<sup>7)</sup> gefundenen Regeln über Absorption und Konstitution substituierter Uracile erbracht. Es war jedoch wünschenswert, die zweite Möglichkeit durch eine rein chemische Beweisführung auszuschließen. IV und V können nämlich mit Dimethylsulfat und Alkali quantitativ in *N*-3-Methyl-3',5'-di-*p*-toluyl- $\alpha$ - bzw. - $\beta$ -thyminidin übergeführt werden, die beide durch saure Hydrolyse *N*-3-Methyl-thymin vom Schmp. 205°<sup>8)</sup> geben.

### BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

**3.5-Di-*p*-toluyl-2-desoxy-D-ribofuranosylchlorid:** Zur Lösung von 13.6 g 2-Desoxy-D-ribose (0.1 Mol) in 243 ccm Methanol gibt man 27 ccm 1-proz. methanol. Chlorwasserstofflösung und läßt die Mischung zur Bildung des Methylglykosids<sup>9)</sup> 12–15 Min. verschlossen stehen. Hierauf rührt man 3–5 g Silbercarbonat ein, um allen Chlorwasserstoff sofort zu binden, engt die klar filtrierte Lösung i. Vak. zur Sirupkonsistenz ein und treibt die letzten Reste Methanol durch wiederholtes Eindampfen i. Vak. unter Zusatz kleiner Mengen trockenen Pyridins ab. Schließlich löst man in 80 ccm Pyridin und acyliert mit 34 g *p*-Toluylchlorid (0.22 Mol) unter Kühlung. Man erwärmt noch 2 Std. auf 40–50° oder läßt über Nacht bei Raumtemperatur stehen. Nach Zusatz von Wasser wird mit 200 ccm Äther ausgeschüttelt, die äther. Lösung erst mit Wasser, dann mit verd. Schwefelsäure pyridinfrei, anschließend mit Kaliumhydrogencarbonatlösung säurefrei gewaschen und i. Vak. zu einem honiggelben Sirup eingedampft. Hieraus kann man durch Animpfen kristallisiertes 3.5-Di-*p*-toluyl-methyl-2-desoxy-D-ribofuranosid in einer Gesamtausb. von 70% d. Th. gewinnen. Für die Darstellung des Chlorids empfiehlt es sich aber, den Sirup in 20–50 ccm Eisessig zu lösen und die Lösung in einem Becherglas zu 80 ccm chlorwasserstoffgesättigtem Eisessig von 10° zu geben. Man setzt das Einleiten des Chlorwasserstoffs fort, bis die Mischung nach etwa 10 Min. zu einem dicken Kristallbrei des Chlorids erstarrt. Nach höchstens 30 Min. saugt man ab und wäscht die Kristalle auf dem Filter reichlich mit absol. Äther. Vor dem Trocknen im Vakuumexsikkator über Natronkalk und Phosphorpentoxyd empfiehlt es sich, noch einmal mit absol. Äther anzuteigen und abzusaugen. Ausb. 27.5 g (70% d. Th.). Schmp. 109° (Zers.).  $[\alpha]_D^{25}$ : +108° (*c* = 1, in Dimethylformamid)  $\rightarrow$  +65° (nach 90 Min.). Die Verbindung ist über Natronkalk und Phosphorpentoxyd wochenlang beständig, zersetzt sich jedoch in Lösungen oder an feuchter Luft innerhalb weniger Stunden. Kleine Mengen können aus Toluol oder Tetrachlorkohlenstoff umkristallisiert werden.

$C_{21}H_{21}ClO_5$  (388.8) Ber. C 64.86 H 5.44 Cl 9.12 Gef. C 64.94 H 5.71 Cl 9.03

Beim Erwärmen mit Methanol und nachfolgender Kühlung entsteht ohne weiteres kristallisiertes 3.5-Di-*p*-toluyl-methyl-2-desoxy-D-ribofuranosid. Schmp. 76.5°,  $[\alpha]_D^{25}$ : –6.2° (*c* = 2, in Chlf.).

$C_{22}H_{24}O_6$  (384.4) Ber. C 68.73 H 6.29 Gef. C 68.73 H 6.21

<sup>6)</sup> in Vorbereitung.

<sup>7)</sup> Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 9, 199, 369 [1952].

<sup>8)</sup> T. B. JOHNSON und S. H. CLAPP, J. biol. Chemistry 5, 56 [1908].

<sup>9)</sup> R. E. DERIAZ, W. G. OVEREND, M. STACEY und L. F. WIGGINS, J. chem. Soc. [London] 1949, 2836.

Mit feuchtem Silbercarbonat in Aceton erhält man kristallisierte *3,5-Di-p-toluy-2-desoxy-D-ribose*. Prismen aus Methanol, Schmp.  $64^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-62.2^{\circ}$  ( $c = 1$ , in Chlf.).

$C_{21}H_{22}O_6$  (370.4) Ber. C 68.09 H 5.98 Gef. C 68.48 H 6.25

*N-1-Acetyl-thymin*: 25.2 g Thymin, 60 ccm Acetanhydrid und 0.5–1 g Pyridin werden 15–20 Min. unter Rückfluß gekocht, wobei das Material in wenigen Minuten vollständig in Lösung geht. Man saugt das beim Abkühlen kristallisierende Produkt ab und wäscht mit wenig kaltem Acetanhydrid nach. Ausb. 85–90% d. Th., Schmp.  $196^{\circ}$ .

*Monoquecksilberthymin (III)*: Unter Rühren und Rückfluß gibt man zu einer Lösung von 31.87 g (0.1 Mol) *Quecksilber(II)-acetat* in 1 l Methanol 16.6 g (0.1 Mol) *Acetylthymin*. Man kocht 2 Stdn. und läßt über Nacht absitzen. Nach Absaugen und Trocknen bei  $70^{\circ}$  erhält man 32.2 g eines farblosen Pulvers. Schmp.  $> 360^{\circ}$ . Im Filtrat werden 0.2 Mol Essigsäure und 0.1 Mol Methylacetat durch Titration gefunden.

$C_5H_4N_2O_2Hg$  (324.7) Ber. N 8.63 Gef. N 8.48

*3',5'-Di-p-toluy- $\alpha$ -thymidin (V)*: 64 g III, 300 ccm Dimethylformamid und 100 ccm Toluol werden in einem 2-l-Dreihalskolben mit Rührer, Rückflußkühler und Wasserfalle unter Rühren gekocht, um azeotrop alles Wasser aus dem Verdünnungsmittel und dem Material zu entfernen. Man läßt auf  $20^{\circ}$  abkühlen und setzt 150 g *3,5-Di-p-toluy-desoxy-D-ribofuranosylchlorid* auf einmal zu. Alles Material geht innerhalb weniger Minuten vollständig in Lösung. Man rührt eine Stde. und setzt dann eine Lösung von 150 g Kaliumjodid in 1 l Wasser und 400 ccm Äther zu. Die 2 Schichten werden getrennt, und die Äther/Toluol-Schicht wird mit einigen Kristallen *Di-p-toluy- $\beta$ -thymidin (IV)* angeimpft. Nach 24 Stdn. hat sich der größte Teil des  $\beta$ -Thymidinderivats nahezu rein abgeschieden (Ausb. 22 g (23% d. Th.), Schmp.  $197^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-50^{\circ}$  ( $c = 1$ , in Pyridin)). Die Mutterlauge scheidet spontan selbst nach Wochen kein  $\alpha$ -Thymidinderivat ab. Sie muß zu dessen Gewinnung mehrmals mit eiskalter 0.3 n NaOH ausgeschüttelt werden. Gewöhnlich werden dabei 3 Schichten gebildet. Die Zwischenschicht besteht aus dem öligen Natriumsalz des *Di-p-toluy- $\alpha$ -thymidins V*. Sie wird zusammen mit der wäßrig. Schicht abgetrennt, und beide werden sofort mit Essigsäure neutralisiert. Dabei scheidet sich das gewünschte Produkt als Öl ab, das nach Animpfen<sup>10)</sup> innerhalb von 12–24 Stdn. vollständig durchkristallisiert. Man kristallisiert aus Methanol um. Ausb. 65 g (68% d. Th.). Das Material enthält meist noch beträchtliche Mengen des  $\beta$ -Thymidinderivats, von dem es durch Kristallisation nur schwer getrennt werden kann. Es eignet sich jedoch ohne weiteres zur Darstellung des  $\alpha$ -Thymidins, da letzteres in Wasser und Äthanol beträchtlich schwerer löslich ist als sein Anomeres und durch Kristallisation leicht von diesem getrennt werden kann. Schmp.  $139^{\circ}$ ,  $[\alpha]_D^{25}$ :  $-14.5^{\circ}$  ( $c = 2$ , in Pyridin).

$C_{26}H_{26}N_2O_7$  (478.5) Ber. C 65.27 H 5.48 N 5.85 Gef. C 65.20 H 5.73 N 5.92

*$\alpha$ -Thymidin (I)*: 47.8 g rohes V löst man in 900 ccm Methanol heiß, läßt die Lösung erkalten und setzt ihr, ungeachtet der Kristallisation, 53 ccm einer 1.89 n Bariummethylatlösung in Methanol zu. Die Kristalle gehen rasch in Lösung. Nach 6stdg. Aufbewahren bei  $20-25^{\circ}$  wird mit 100 ccm 1 n  $H_2SO_4$  neutralisiert, das Bariumsulfat durch ein gedichtetes Filter abgesaugt und die Lösung i. Vak. eingedampft. Methyltoluat wird durch Waschen mit Äther entfernt und der Rückstand, falls er nicht schon kristallin erstarrt, in 100 ccm Aceton heiß gelöst. Beim Erkalten kristallisiert das  $\alpha$ -Thymidin rasch und kann am andern Morgen abgesaugt werden. Kristallisiert man aus der dreifachen Menge Wasser um, so erhält man es in

<sup>10)</sup> Hat man keine Impfkristalle zur Verfügung, so kann man solche wie folgt erhalten: Man bereitet aus dem öligen Produkt durch Methanolyse  $\alpha$ -Thymidin, reinigt dieses durch Kristallisation aus Wasser und acyliert in Pyridin. Das Produkt kristallisiert dann in der Regel nach einiger Zeit spontan.

wohlausgebildeten derben Prismen, Ausb. 17 g (70% d. Th.). Schmp. 187°,  $[\alpha]_D^{25}$ : +7.2° ( $c = 2$ , in Wasser), + 13° ( $c = 2$ , in 0.5  $n$  NaOH), + 46.5° ( $c = 1$ , in Dimethylformamid).

$C_{10}H_{14}N_2O_5$  (242.2) Ber. C 49.58 H 5.82 N 11.56 Gef. C 49.61 H 5.60 N 11.35

*N-3-Methyl-3'.5'-di-p-toluyl- $\beta$ -thyminidin*: 2 g IV übergießt man in einem weiten Reagenzglas mit 4 ccm Dimethylsulfat und fügt unter Rühren mit einem Glasstab 15–20 ccm 3  $n$  NaOH in Portionen zu. Die Masse verflüssigt sich zunächst und erstarrt darauf wieder in wenigen Minuten. Die Kristalle werden abgesaugt, mit Wasser und wenig Äther gewaschen und aus Äthanol unkristallisiert. Ausb. 2 g, Schmp. 137–138°,  $[\alpha]_D^{25}$ : –29.5° ( $c = 1$ , in Dimethylformamid).

$C_{27}H_{28}N_2O_7$  (492.5) Ber. C 65.84 H 5.73 N 5.69 Gef. C 65.87 H 5.58 N 5.52

Durch Methanolyse erhält man ohne weiteres *N-3-Methyl- $\beta$ -thyminidin*<sup>11)</sup> als Hydrat. Nadeln aus Wasser, Schmp. (wasserfrei) 134°.  $[\alpha]_D^{25}$ : +25.8° ( $c = 1$ , in Wasser),  $[\alpha]_D^{25}$ : +25.3° ( $c = 1$ , in Dimethylformamid).

*N-3-Methyl-3'.5'-di-p-toluyl- $\alpha$ -thyminidin* wurde gewonnen wie das  $\beta$ -Anomere. Das Produkt kristallisiert jedoch erst nach einiger Zeit. Lange Nadeln aus Methanol, Schmp. 124°.  $[\alpha]_D^{25}$ : –16.5° ( $c = 2$ , in Dimethylformamid).

$C_{27}H_{28}N_2O_7$  (492.5) Ber. C 65.84 H 5.73 N 5.69 Gef. C 66.14 H 5.87 N 5.81

Das daraus durch Methanolyse gewonnene *N-3-Methyl- $\alpha$ -thyminidin* kristallisiert nicht.

*N-3-Methyl-thymin*: Je 1 g *N-3-Methyl-3'.5'-di-p-toluyl- $\alpha$ -* oder *- $\beta$ -thyminidin* wird mit 4 ccm Eisessig und 2 ccm konz. Salzsäure eine Stde. auf dem Dampfbad erwärmt. Die mit 20 ccm Wasser verdünnte Lösung wird mit Benzol ausgeschüttelt und die wäßrige Schicht eingedampft. Sie hinterläßt einen kristallinen Rückstand, der sich als *N-3-Methyl-thymin* erweist. Schmp. und Misch-Schmp. 205°.

<sup>11)</sup> R. E. BELTZ und D. W. VISSER, J. Amer. chem. Soc. **77**, 736 [1955]; H. T. MILES, J. Amer. chem. Soc. **79**, 2565 [1957].