

NUKLEOZID 5'-FOSZFODIKLORIDÁTOK SZINTETIKUS ALKALMAZÁSA  
pppA2'p5'A2'p5'A SZINTÉZISE

doktori értekezés

LUDWIG JÁNOS

Szeged

1984



Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.



B 2353



Értekezésemet az MTA Szegedi Biológiai Központjának  
Biofizikai Intézetében készítettem.

Köszönetet mondok Dr. Tomasz Jenő tudományos főmunka-  
társnak, akinek szakmai irányítása jelentős segítséget  
jelentett a munkám során felmerülő problémák megoldásá-  
ban.



## TARTALOMJEGYZÉK

	oldal
1. Bevezetés, célkitűzés	1
2. Nukleozid 5'-trifoszfátok szintézis problémáinak áttekintése	5
2.1. Anioncsere módszer	6
2.2. Imidoil-foszfát módszer	7
2.3. Foszfamidát módszer	9
2.3.1. Nukleozid 5'-foszfamidátok	9
2.3.2. Nukleozid 5'-foszfomorfolidátok	10
2.3.3. Nukleozid 5'-foszfoimidazolidátok	14
2.4. Tioészteres eljárás	15
3. pppA2'p5'A2'p5'A / <u>1</u> / szintézismódszereinek áttekintése	17
4. A Yoshikawa foszforilezés. Nukleozid 5'-foszfodikloridátok szintetikus alkalmazásai	27
5. A Yoshikawa foszforilezés szelektivitásának vizsgálata	31
5.1. Bevezetés	31
5.2. A foszforilezés szelektivitásának vizsgálata a 3' és 5'-foszfodiamidátok kromatográfiás elválasztásával. 5-Alkil és 5-Fluoro-2'-dezoxiuridin 5'-foszfátok szintézise	32
5.3. Az eredmények alkalmazása	37
6. Nukleozid 5'-trifoszfátok nukleozid 5'-foszfodikloridát intermedieren keresztül történő szintézise	38
6.1. Bevezetés	38

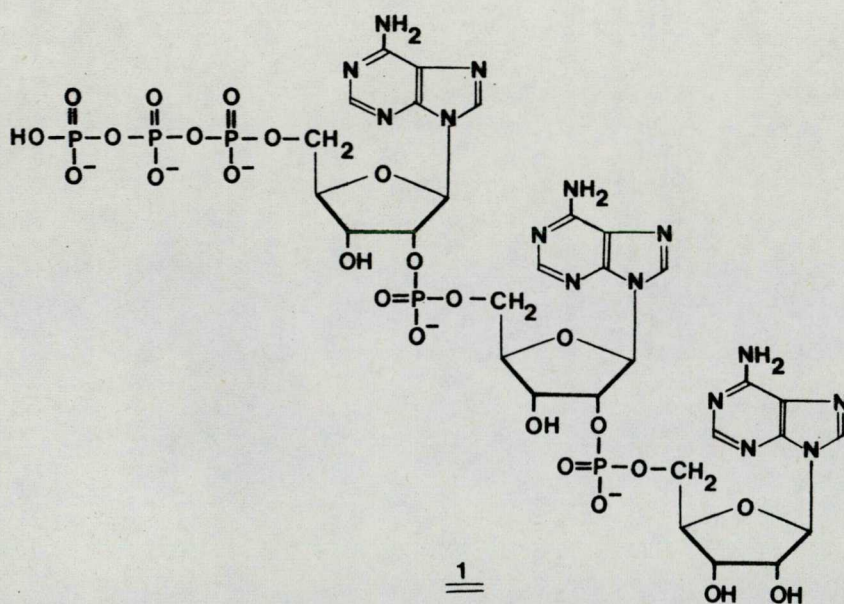


6.2. Adenozin 5'-trifoszfát / <u>62a</u> /; 2'-dezoxiadenozin 5'-trifoszfát és 3'-dezoxiadenozin 5'-trifoszfát / <u>62c</u> / szintézise	39
6.3. A reakció mechanizmusának vizsgálata	43
6.4. Alkalmazási lehetőségek	46
7. pppA2'p5'A2'p5'A / <u>1</u> / szintézise	49
7.1. Bevezetés, szintézisterv	49
7.2. Védett monomerek előállítása	51
7.3. A/NB/2'p5'A/NB/2'p5'A/NB/ / <u>78c</u> / szintézise	53
7.4. A/NB/2'p5'A/NB/2'p5'A/NB/ / <u>78c</u> / foszforilezésének vizsgálata	58
7.4.1. pA/NB/2'p5'A/NB/2'p5'A/NB/ szintézise	58
7.4.2. pppA/NB/2'p5'A/NB/2'p5'A/NB/ / <u>80b</u> / és pppA2'p5'A2'p5'A / <u>1</u> / szintézise	61
7.4.2.1. Az eljárás értékelése	65
8. Az eredmények összefoglalása	66
9. Kísérleti rész	68



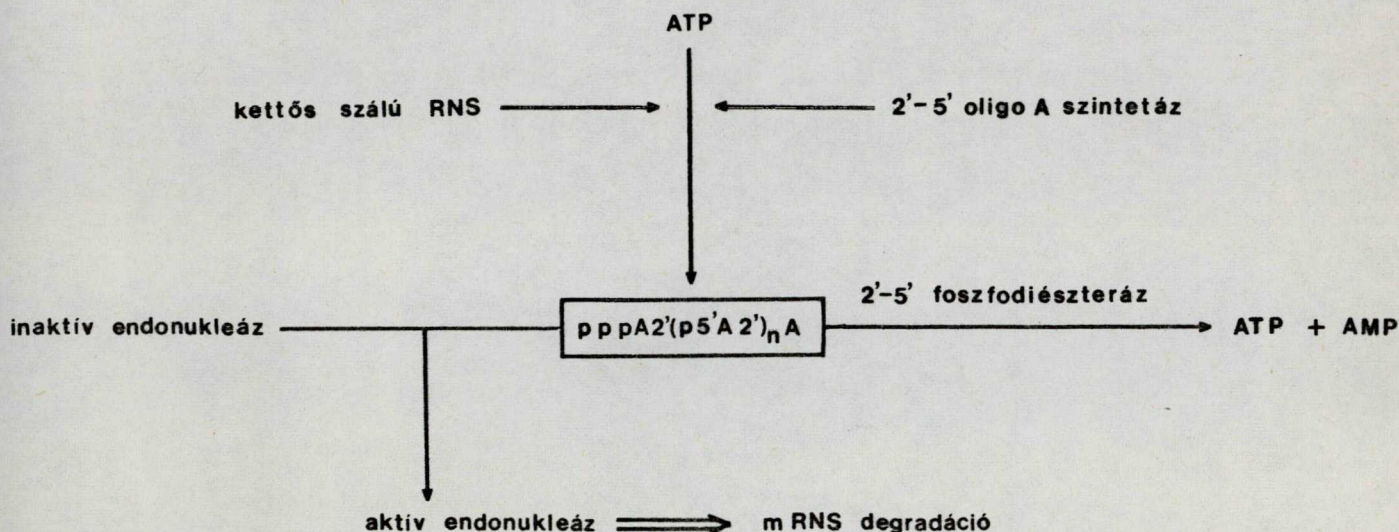
## 1. BEVEZETÉS, CÉLKITÜZÉS

Az utóbbi évek interferon hatásmechanizmusra vonatkozó kutatásai a természetben eddig egyedül álló, 2'-5' internukleotid kötést tartalmazó oligoriboadenilátok felfedezéséhez vezettek.<sup>1</sup> Egy az interferon által indukált 2'-5' oligo A szintetáz [ATP : (2'-5') OLIGO(A)-adenilil transzferáz EC 2.7.7.19] enzim kettős szálu RNS-vel való aktiválás hatására ATP-ből 2'-5'-internukleotid kötést és a molekula 5' végén trifoszfát csoportot tartalmazó oligoriboadenilátokat készít, amelyek fő komponense az 5'-O-trifoszforil-adenilil-[2'-5']-adenilil-[2'-5']-adenozin 1, és természetes funkciójuk egy látens endonukleáz [RNázL] aktiválása - és így a mRNS degradációján keresztül a protein bioszintézis gátlása.<sup>1</sup>





A transláció 2'-5' oligo A rendszer általi szabályozását vázlatosan az alábbi séma foglalja össze:<sup>2,3,4,5</sup>



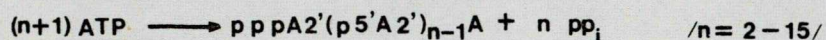
1 szerepe e séma szerint az interferon antivirális hatásának kifejezésében abban áll, hogy az interferon kezelés hatására megnövekedett 2'-5' oligo A szintetáz szint és a vírus replikációja során keletkező kettős szálú RNS hatására 1 és magasabb tagszámú homológjai képződnek, ami a latens endonukleáz aktiválásához és preferáltan a virális mRNS-ek degradálásához vezet. E regulációs rendszert a 2'-5' oligoadenilátokat lebontó 2'-5' foszfodiészteráz enzim teszi teljessé. Így állandó képződés hiányában 1 vegyület sejten belüli élettartama rövid  $t_{1/2} \sim 50$  perc/.

Kémiai<sup>37,38,39,40</sup> vagy enzimátikus<sup>6</sup> eljárásokkal szintetizált 1 in vitro fehérje szintetizáló rendszerekben a protein bioszintézis gátlását okozza  $ID_{50} = 10^{-8}$  M/;



megfelelő bejuttatási technikák alkalmazásával in vivo, intakt sejtekben szintén 1 antivirális, illetve protein szintézis gátló hatását észlelték<sup>9,15</sup>.

1 vegyület enzimátikus szintézise során a 2'-5' oligo A szintetáz kettős szálú RNS-hez való erős kötődését felhasználva poli I-poli C-vel derivatizált cellulóz oszlopon immobilizált szintetáz segítségével végzik az ATP polimerizálását.



Kémiai szintézissel lehetőség nyílik 1 5'-trifoszfát csoportot nem tartalmazó un. "core" származékainak<sup>7</sup>, valamint a ribózon, az adenin bázison, az internukleotid foszfátcsoporton, illetve az 5'-terminális trifoszfát csoporton módosított származékainak szintézisére is<sup>8</sup>.

Az elkészített nagyszámu analóg vegyület lehetővé tette a 2'-5' oligo A regulációs rendszerben szereplő enzimek szubsztrát specifitásának felderítését.

Antivirális kemoterápiaként is felhasználható 1 analóg előállításának érdekében végzett szintetikus munka elsősorban két probléma megoldását célozza:

- 1./ A 2'-5' foszfodieszterázzal szemben megnövelt stabilitásu és
- 2./ megnövelt lipofilitásu - analógok szintézisét.



Csoportunk a Szegedi Biológiai Központ - Biofizikai Intézetében 1980 óta foglalkozik 2'-5' oligoadenilátok szintézisével és biológiai tesztelésével. E kutatási területhez csatlakozva - munkám célja elsődlegesen 1 természetes vegyület egyszerű szintézisének kidolgozása volt. A molekula 5'-trifoszfát csoportjának kiépítésére, egy a csoportunkban korábban, nukleozid 5'-trifoszfátok szintézisére kidolgozott eljárás alkalmazását kíséreltem meg, amely a monomerekkel nyert eredmények ismeretében 1 vegyület új analógjainak szintézisét is lehetővé teszi.

A dolgozat általános részében nukleozid 5'-trifoszfátok szintézisének a jelenlegi preparatív gyakorlatban elterjedten használt módszereit tekintem át, kiemelve azon eljárásokat amelyek triribonukleozid difoszfátok 5'-trifoszfátjainak szintézisére is kiterjeszthetők. A 3. fejezetben 1 vegyület előállítására az irodalomban leírt eljárásokat ismertetem. Kiemelten foglalkozom továbbá a nem védett nukleozidok 5'-OH csoportjának szelektív foszforilezésére alkalmas Yoshikawa módszerrel, mivel az e dolgozatban leírt szintézisek főleg erre az eljárásra épülnek.

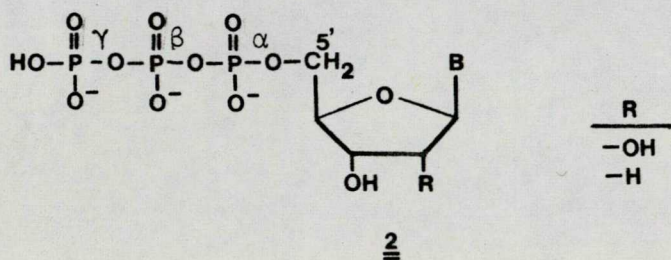




2 Nukleozid 5'-trifoszfátok szintézis problémáinak áttekintése

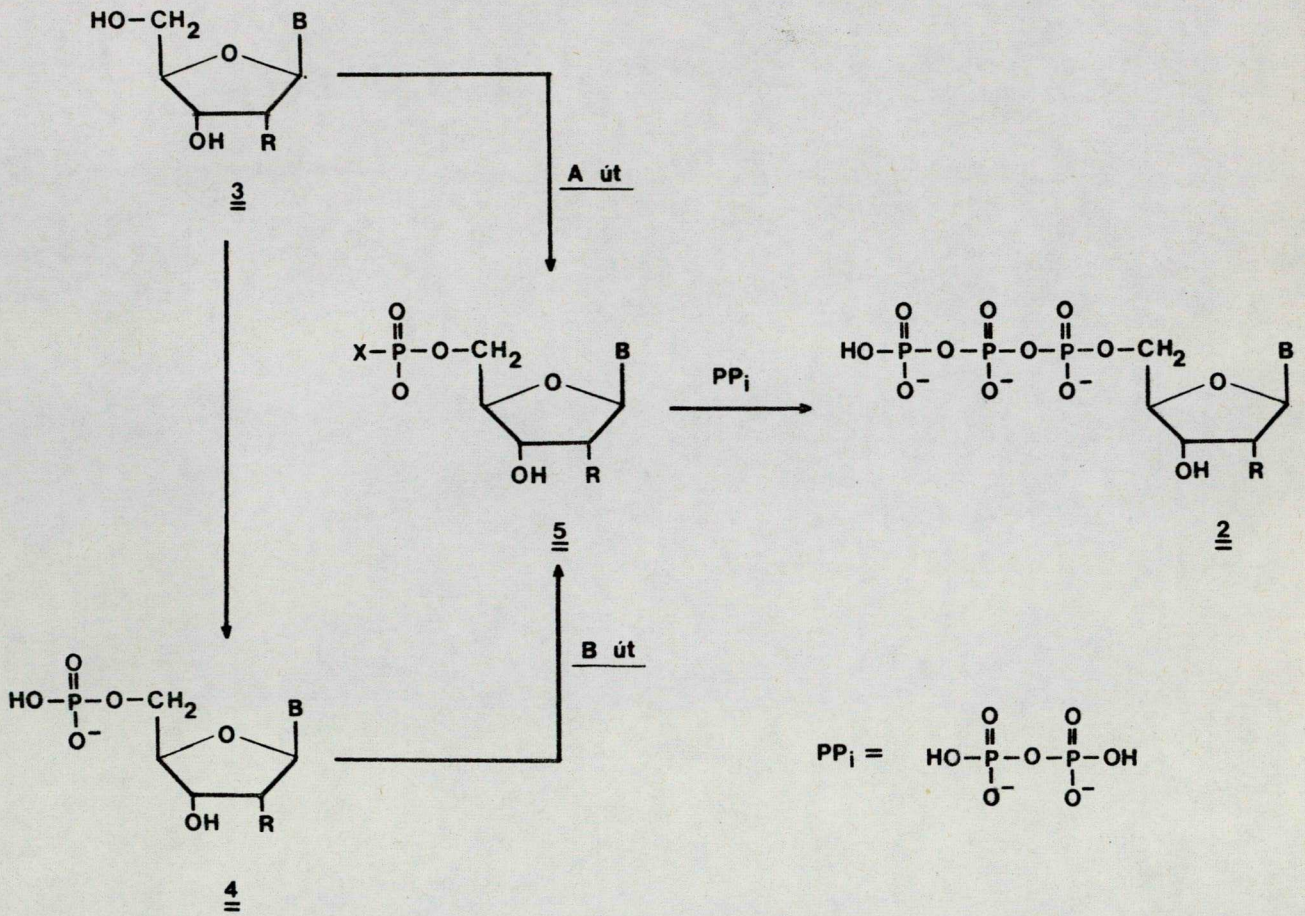
Nukleozidból kiinduló nukleozid 5'-trifoszfát /2/ szintézis két egymást követő foszforilezési lépés megvalósítását igényli:

- 1./ A  $P^{\alpha}-O-C^{5'}$  észter kötés kialakítását
- 2./ A  $P^{\alpha}-O-P^{\beta}$  anhidrid kötés kialakítását



A második lépés során a  $P^{\alpha}-O-P^{\beta}$  kötés létrehozása egy aktivált nukleotid származék /5/ és anorganikus pirofoszfát közötti reakcióban történik. - A  $P^{\alpha}-O-C^{5'}$  kötés kialakítására használt foszforilező ágenstől függően az első lépés vagy egy nukleozid 5'-foszfát /4/ szintézise, amelynek utólagos aktiválásával történik a pirofoszfát általi nukleofil támadásra alkalmas P-X kötés létrehozása /B ut/ - vagy a foszforilező ágens megfelelő megválasztásával 5 aktivált származék egy lépéses szintézisét végzik el /A ut/.





Az alábbiakban 2 szintézisére alkalmazott eljárásokat 5 aktivált származék típusai szerint csoportosítva tekintem át.

### 2.1 Anioncsere módszer [X = (PhO)<sub>2</sub>P(O)O<sup>-</sup>]

Az eljárás alapjául az a tény szolgál, hogy pirofoszforsav származékokon történő nukleofil szubsztitúció során a nukleofil ágens azon a foszforatomon támad, amelyről a reakció során az erősebb savnak megfelelő anion távozik.<sup>16</sup>



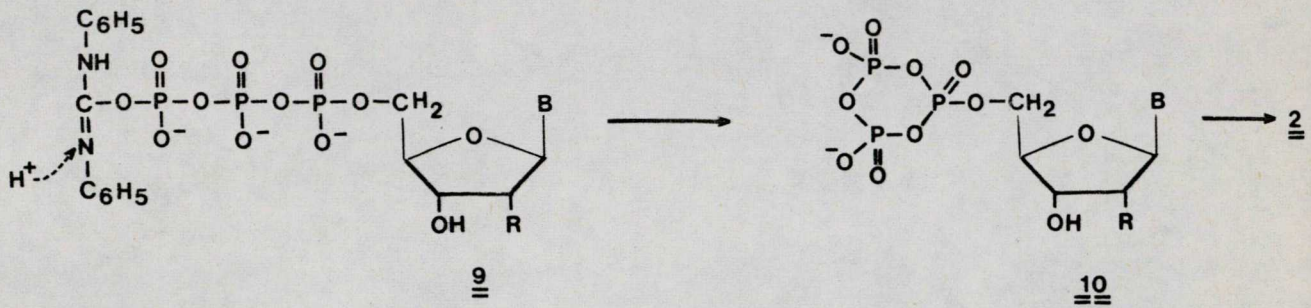




erélyes foszforilező szerek, amelyek 4-vel szimmetrikus pirofoszforsav diésztert /8/, illetve egyéb nukleofil ágenssel a megfelelő aszimmetrikus nukleotid anhidridet adják. Mivel e reakcióban 8 képződésének visszaszorítása a pirofoszfátot - amely szintén aktiválódik DCC hatására - nagy feleslegben kell alkalmazni, a termékelegyek jelentős mennyiségű anorganikus polifoszfátot tartalmaznak, ami 2 izolálását nehézkessé teszi, ezért jelenleg 7 imidoilfoszfát elsősorban a foszfamidátos nukleotid anhidrid szintézis kiindulási anyagául szolgáló nukleozid 5'-foszfamidátok szintézisére szolgál /2.3.2. fejezet/.

Elméletileg érdekes a Smith és Khorana által megvalósított nukleozid 5'-trifoszfát szintézis.<sup>18</sup> E módszer szerint nukleozid 5'-foszfátot piridinben ortofoszforsav és DCC nagy feleslegével reagáltatva tributilamin jelenlétében nukleozid 5'-difoszfát és kevés nukleozid 5'-polifoszfát mellett főtermékként 2 képződött. 2 képződését mint a reakció főirányát úgy értelmezték, hogy 4-ből, a difoszfát és a trifoszfát egymást követő képződése után, a 2-ből keletkező  $\gamma$ -imidoil foszfát /9/ gyűrűzárással ciklikus trimetafoszfátot ad /10/, amely az alkalmazott körülmények között nem reagál tovább, a reakcióelegy feldolgozása során pedig a lineáris trifoszforsav észterré /2/ hidrolizál.



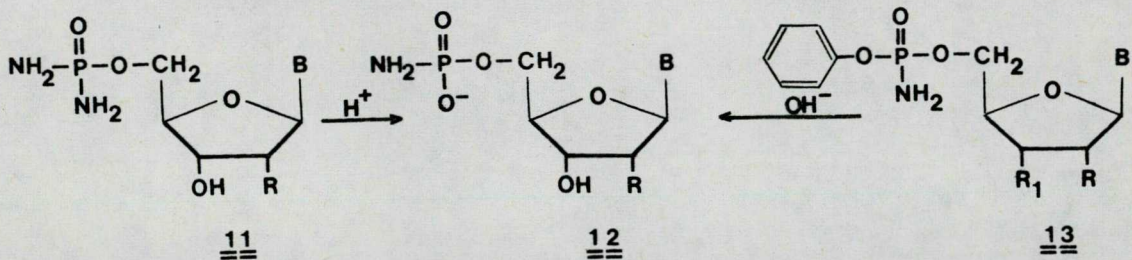


10 vegyület nukleozid 5'-trifoszfátból DCC-vel történő intramolekuláris ciklizással történő kialakítása is elvégezhető<sup>59</sup>. Szerkezetét <sup>31</sup>P NMR spektrumának felvételével igazolták.

### 2.3 Foszfamidát módszer [X = R<sub>2</sub>NH<sup>+</sup>]

A nukleozid 5'-foszfamidátok képviselik a nukleotid anhidridek szintézisére legáltalánosabban használt aktivált nukleotid származékokat. Mind A, mind B uton történő szintézisükre számos módszert dolgoztak ki. 2 szintézisre elsősorban az ammóniából /2.3.1 fejezet/, morfolinból /2.3.2. fejezet/, imidazolból /2.3.3 fejezet/ levezethető származékaik használatosak.

#### 2.3.1. Nukleozid 5'-foszfamidátok /12/ [X = NH<sub>3</sub><sup>+</sup>]





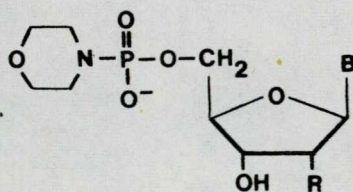
A-uton haladó első szintézisüket Khorana 2',3' védett nukleozidok fenil foszfodikloridáttal történő foszforilezésével, majd az ammonolízis után kapott 13 diészteramid lúgos hidrolízisével végezte.<sup>19</sup>

Védetlen nukleozidok régioszelektív foszforilezése<sup>10,11</sup> során nyert nukleozid-5'-foszfodikloridátok /4.fejezet/ ammonolízise nukleozid 5'-foszfodiamidátokat /11/ ad,<sup>20</sup> amelyek egyik P-N kötése szelektíven hidrolizálható. A 12 aktivált nukleotid származék, 5'-foszfodiamidátokon keresztül történő szintézisére kidolgozott eljárást eredményesen használták diribonukleozid foszfátok 5' trifoszfátjainak szintézisére is.<sup>21</sup>

12 vegyület B uton haladó szintézise a nukleotid, DCC és ammónia oldatának formamidban történő hevítésével - 7 aktivált származék ammonolízisével is elvégezhető.<sup>22</sup> Az eljárás során 12 guanidiniumsóként keletkezik.

### 2.3.2 Nukleozid 5'-foszfomorfolidátok /14/ $\left[ X = -\overset{+}{\text{N}}\text{H} \text{O} \right]$

Mind oldhatóság, mind reaktivitás szempontjából a szubsztituálatlan foszfamidátoknál előnyösebbnek bizonyultak a nukleozid 5'-foszfomorfolidátok:



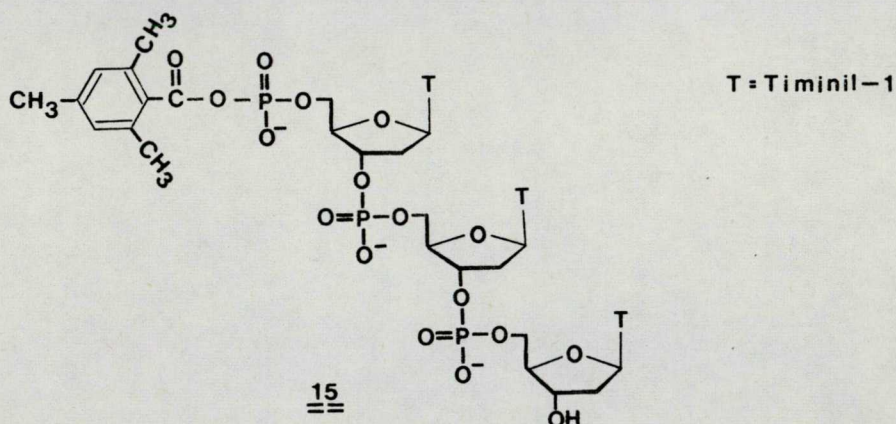
14

14 B uton haladó első szintézisét Moffat valósította meg.<sup>23</sup>



A nukleotid és morfolin refluxált terc.-butanolos oldatához, DCC ugyanezen szolvensben készített oldatát csepegtetve 14 morfolinoguanidinium-sóként közel kvantitatív termeléssel keletkezik. 14-ből vízmentes DMSO, vagy DMF-ben bisz-tri-n-butyl-ammónium pirofoszfát 3-5-szörös moláris feleslegével /60°C, 5 ó/ nukleozid-5'-trifoszfátok 60-85 % termeléssel állíthatók elő.

14 aktivált foszfát származék dezoxiribooligonukleotidok 5'-foszfát végcsoportján is kialakítható - mezitoil-karbonsav-klorid és az 5'-foszfát terminális oligonukleotid reakciója során keletkezett vegyes anhidrid /15/ aminolizise révén.<sup>24</sup>

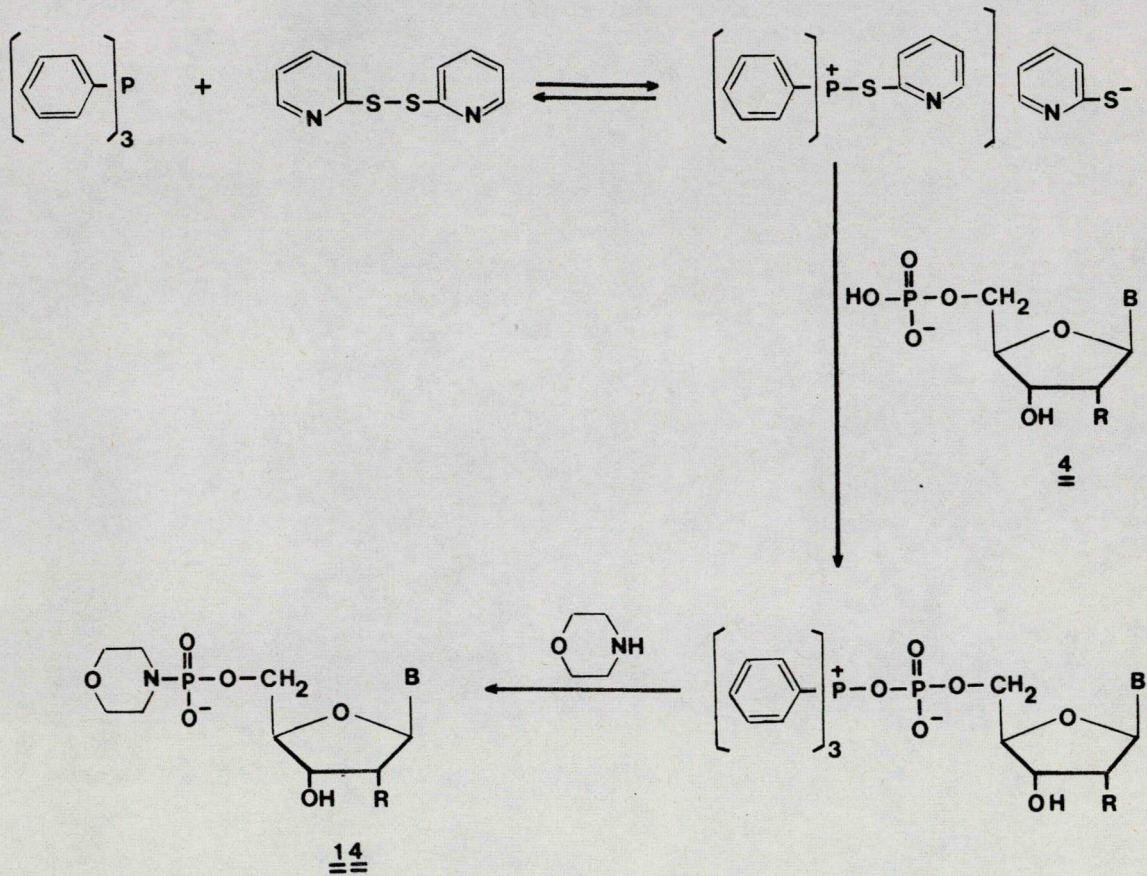


Az 5'-foszfát terminális aktiválásának ezen módja pppTpTpT szintézise során került alkalmazásra.<sup>25</sup>

Nukleotidok és 5'-foszfát terminális dezoxioligonukleotidok 5'-foszfomorfolidátjainak szintézisére egyaránt használható a trifenil-foszfín dipiridil-szulfid kondenzáló ágens.

A lejátszódó folyamatok a monomer példáján bemutatva az alábbi sémával írhatók le.



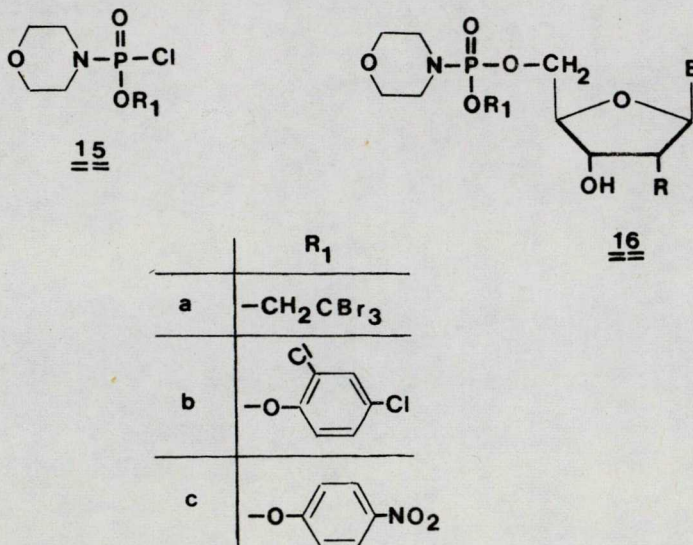


Ezzel az eljárással kapcsolatban kiemelendő, hogy a foszforosav diészterek /internukleotid kötés/ nem lépnek reakcióba az alkalmazott körülmények között, ez a reakció tehát a DCC-vel, illetve mezitilénkarbonsavkloriddal történő aktiválással szemben - elvileg alkalmas oligoribonukleotidok 5'-foszfomorfolidátjainak szintézisére is.<sup>27</sup>

14 A uton haladó szintézise a 11 diamidátokhoz hasonló prekursorokból: nukleozid 5'-foszfodimorfolidátokból - nem lehetséges,<sup>28</sup> diészter amidát típusu /13/ intermediereken keresztül - monofunkciós foszforilező ágensek: morfolino-



-észter-foszfokloridátok /15/ felhasználásával azonban számos szintézist megvalósítottak.



Morfolino tribrómetil foszfokloridát /15a/ védetlen nukleozidok regioszelektív foszforilezését is lehetővé teszi,<sup>29</sup> míg 15b-c foszforilező ágensek használata esetén a nukleozid, illetve szabad 5'-OH terminális védett oligonukleotid 2'/3'/OH csoportjainak védésére van szükség.<sup>30</sup>

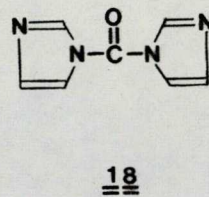
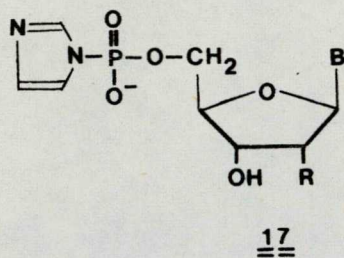
16a-c diészter-amidátokról a 2,2,2-tribrómetil csoportot redukativ  $\beta$ -eliminációval hasítják, /Zn-Cu/, a 2,4 diklórfenil csoportot és a 4-nitro fenil csoportot lugos hidrolízissel, vagy amennyiben 16 struktúra egy oligonukleotid 5'-terminálisán szerepel -  $R_1$  eltávolítását az internukleotid kötés aril védőcsoportjainak deblokkolására használt reagenssel:  $N^1, N^1, N^3, N^3$ -tetrametilguanidinium syn-4-nitro-benzaldoximáttal végzik.



15a foszforilező ágens felhasználására pppA2'p5'A2'p5'A szintézisében a 3. fejezetben látunk példát.

### 2.3.3 Nukleozid 5'-foszfoimidazolidátok

Mint az előzőekben láttuk nukleozid 5'-foszfomorfolidátok szintézisére számos alternatívát dolgoztak ki - annak érdekében, hogy a morfolidát módszert ki lehessen terjeszteni olyan nukleotid származékok aktiválására is, amelyekre a módszer eredeti változata: 14 DCC-vel történő szintézise, nem alkalmazható. A foszfamidátos nukleotid-anhidrid szintézis egy másik irányu továbbfejlesztését a nukleozid 5'-foszfoimidazolidátok /17/ bevezetése jelentette.

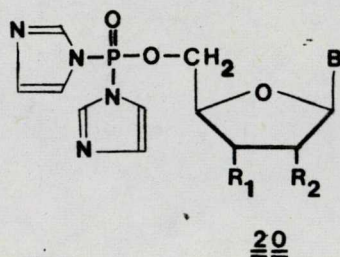
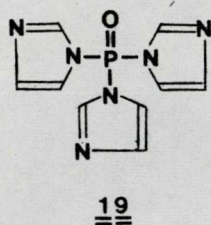


Cramer és mtsai 17-t B-uton nukleotid és karbonil-diimidazol reakciójával állították elő.<sup>31</sup> E módszer Hoard és Ott által módosított változata oligodezoxinukleotid- és oligoribonukleotid 5'-foszfátok aktiválására is alkalmas<sup>32</sup> /3. fejezet/. A nukleotid komponens és imidazol vi- zes közegben 1-etil-3-/3'-dimetilaminopropil/-karbodiimiddel pH=6-on történő kondenzációjával 17-vegyület szintén jó termeléssel előállítható.<sup>33</sup>



E módszer oligoribonukleotidok aktiválására is felhasználható az interribonukleotid kötés izomerizációja, illetve hasadása nélkül.

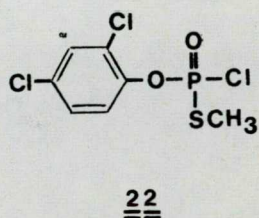
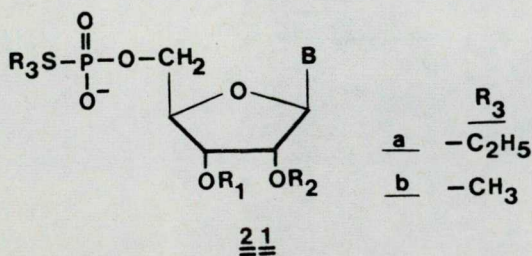
17 A uton haladó szintézise során 2'/3'/ védett nukleozidot triimidazolilfoszfinoxiddal 19/ foszforileztek, a



kapott nukleozid 5'-foszfodi imidzolidát 20/ egyik P-N kötése pH = 8-on végzett hidrolizissel szelektíven elhatható és 17 közel kvantitatív termeléssel keletkezett.<sup>34</sup>

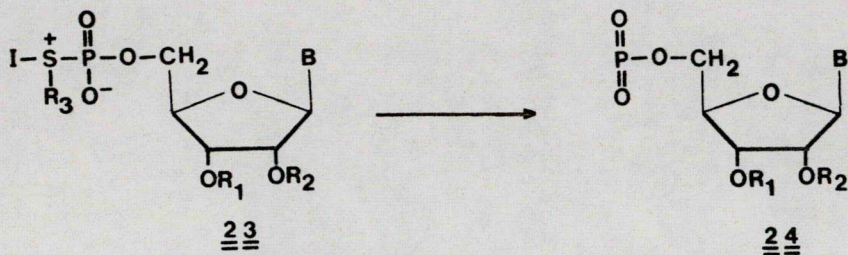
#### 2.4 Tioészteres eljárások [X = RS -]

Nukleozid 5'-S-etil foszforotioátok 21a/, amelyeket S-etilfoszforotioát piridiniumsójának és 2'/3'/ védett nukleozidok DCC-jelenlétében végzett kondenzációjával<sup>35</sup> - vagy nukleozid 5'-S-metilfoszforotioátok 21b/, amelyeket 2'/3'/ védett nukleozid 22 foszforilező ágenssel történő foszforilezésével<sup>36</sup> majd az aril védőcsoport hidrolízisével állítanak elő,





vizmentes piridinben  $I_2$  jelenlétében egy jód-szulfónium származékon /23/ keresztül reaktív metafoszfát észterré alakulnak /24/.



A  $I_2$ -vel történő oxidációt anorganikus pirofoszfát jelenlétében vezetve nukleozid 5'-trifoszfátok 60-70 %-os termeléssel keletkeznek.



### 3. pppA2'p5'A2'p5'A /1/ szintézismódszereinek áttekintése

1 kémiai szintéziséhez egy triribonukleozid difoszfát molekula 5' terminálisán kell kialakítani a pirofoszfát anionnal való reakcióra alkalmas aktivált 5'-foszfát származékot. Ennek megfelelően ebben az esetben a 2. fejezetben ismertetett; nukleozid-5'-trifoszfátok szintézisére fennálló A és B alternatíva a trimer felépítésére választott szintézisuttól függően - két különböző módon valósítható meg.

1 A  $P^{\alpha}-O-C^{5'}$  kötés kiépítése monomer szinten történik és megfelelően védett 5'-foszfát csoportot tartalmazó monomer építő tagot alkalmaznak a trimer szintézise során.

2 A  $P^{\alpha}-O-C^{5'}$  kötés kiépítése a szabad 5'-hidroxil csoportot tartalmazó részlegesen védett trimer molekulán történik.

Az ily módon adódó négy lehetséges szintézis út mindegyike megvalósításra került, az egyes eljárásokat az 5'-trifoszfát csoport kiépítésére használt módszerek alapján csoportosítva e fejezetben ismertetem.

#### 3.1. A $P^{\alpha}-O-C^{5'}$ kötés kiépítése monomer szinten

##### /A.1. eljárás/

1 vegyület van Boom és mtsai által megvalósított szintézisének<sup>37</sup> kiindulási anyaga 3'-O-/4-metoxi-tetrahidropiran-4-il/-N<sup>6</sup>-p-anizoil-adenozin /25/ /3.1. ábra/. 25 5' hidroxil csoportját 2,2,2-tribróm etil morfolino foszfo-

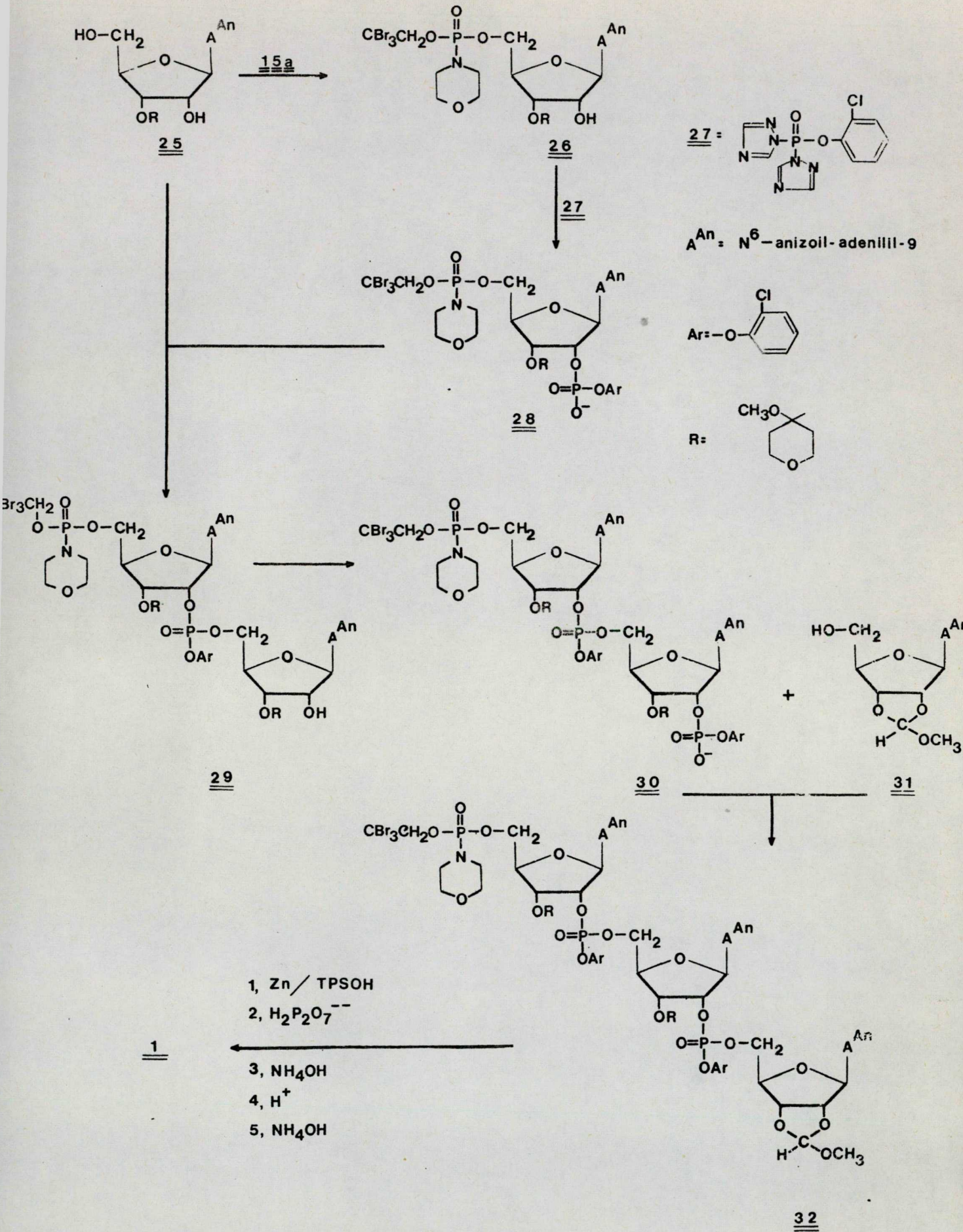


kloridáttal /15a/, majd 2'-OH csoportját o-klór-fenil-foszfoditriazolidáttal /27/ foszforilezve nyerték a triészter szintézis első kapcsolási lépésének foszfát komponensét /28/.

28-val triizopropilbenzolszulfonil-3-nitro-1,2,4-triazol [TPSNT] kondenzáló ágens jelenlétében szelektíven foszforilezték 25 5'-OH csoportját. Az így nyert 29 dimer vegyületből ismét 27 foszforilező ágenszt alkalmazva szintetizálták a második kapcsolási lépés foszfát komponensét /30/, amelynek 2',3'-O-metoxi metilidén-N<sup>6</sup>-p-anizoil adenzin /31/ terminális taggal TPSNT jelenlétében végzett kapcsolása szolgáltatta 32 védett trimert.

32 vegyületről első lépésben aktivált Zn-vel a 2,2,2-tribróm etil csoportot távolították el, redukív  $\beta$ -eliminációval. Az így nyert 5'-foszfomorfolidát funkciós csoportot tartalmazó trinukleotid származékot bisz-tri-n-butilammónium pirofoszfát 0.5 M-os dimetilformamidos oldatával reagáltatva építették ki a molekula 5'-trifoszfát csoportját /2.3.2. fej./; majd az N<sup>6</sup>-anizoil és az o-klór-fenil védőcsoportokat lugos hidrolizissel [cc NH<sub>4</sub>OH, 70 ó, 25°C], a metoximetilidén és metoxitetrahidropiránil védőcsoportokat savas hidrolizissel [0.01 N HCl; 2 óra] távolították el. A deblokkolás utolsó lépésében a metoximetilidén csoport savas hidrolizise során keletkezett /2'/ 3'-O-formil észtereket hig ammóniás kezeléssel hidrolizálták és 1-t DEAE-Sephadex oszlopon végzett ioncserés kromatográfiával izolálták.





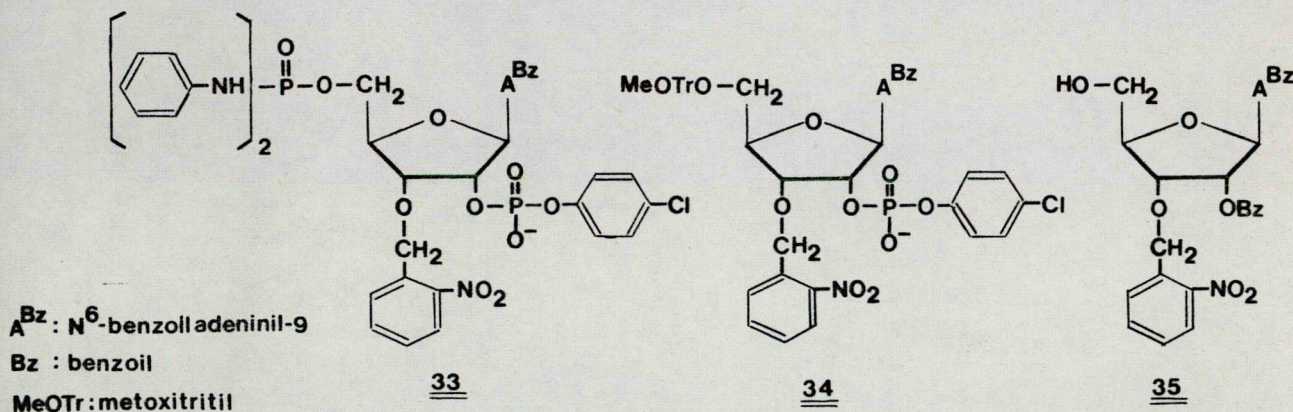
3.1. ábra



3.2. A  $P^{\alpha}$ -O-C<sup>5'</sup> kötés kiépitése monomer szinten

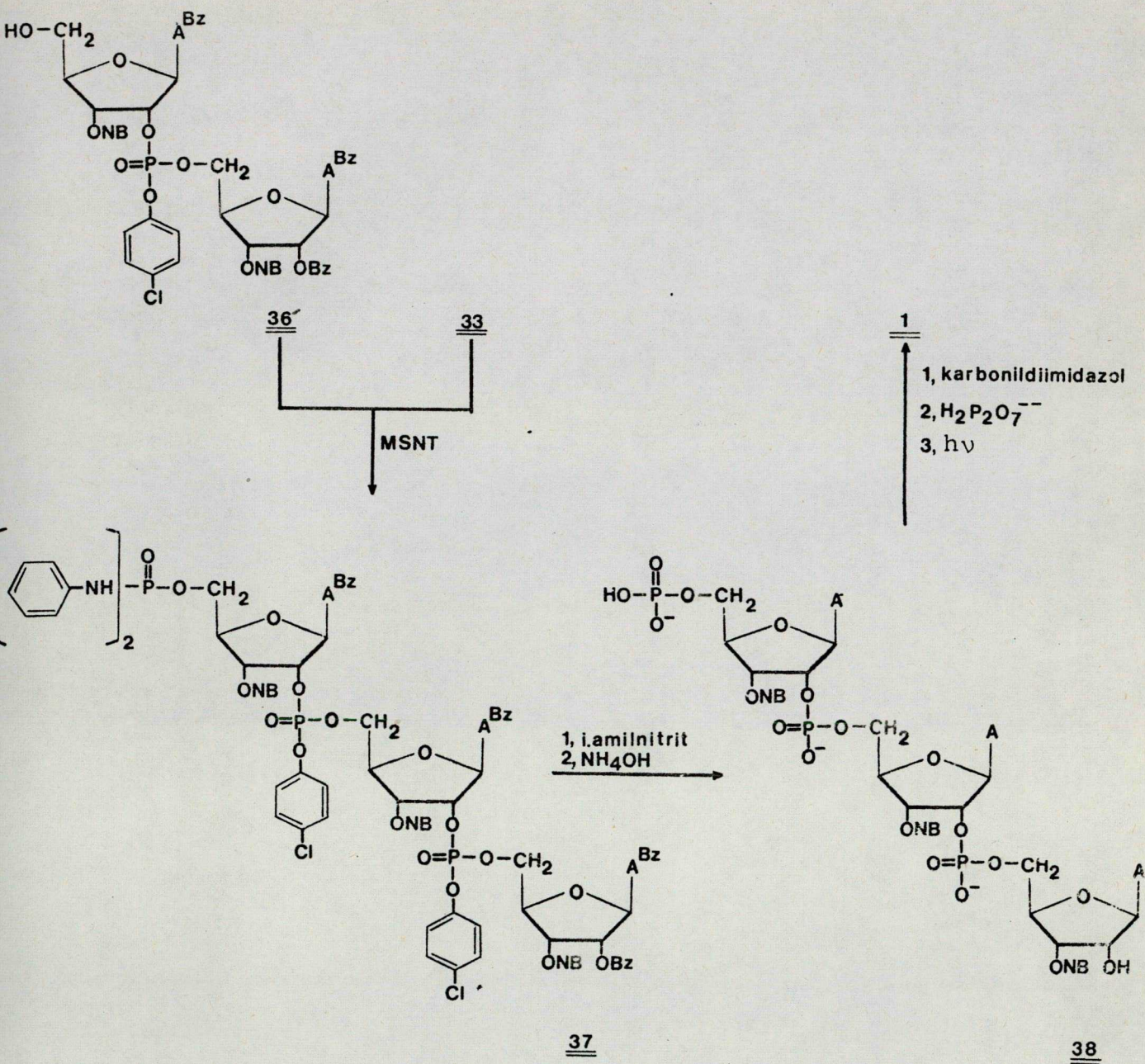
/B.1. eljárás/

Az Ikehara és mtsai által megvalósított szintézis<sup>38</sup>  
 5'-O-foszfodianilido-3'-O-/o-nitrobenzil/-N<sup>6</sup>-benzoil-  
 -adenozin-2'-O-p-klórfenilfoszfát /33/;  
 5'-O-monometoxitritil-3'-O-/o-nitrobenzil/-N<sup>6</sup>-benzoil-  
 -adenozin-2'-O-p-klórfenilfoszfát /34/ és  
 3'-O-/o-nitrobenzil/-2'-O,N<sup>6</sup>-dibenzoil-adenozin /35/  
 monomer építőtagok felhasználásával történt.



34 foszfát és 35 hidroxil komponens mezitilén szulfo-  
 nil-3-nitro-1,2,4-triazol /MSNT/ kondenzáló ágens jelenlété-  
 ben végzett kapcsolása; majd a monometoxitritil védőcsoport  
 eltávolítása után nyerték az 5'-OH terminálisú védett di-  
 mert /36/, amelynek 33 védett 5'-foszfát csoportot tartal-  
 mazó monomer foszfát komponenssel történő kapcsolása szol-  
 gáltatta 37 védett trimer vegyületet. /3.2 ábra/.





3.2. ábra



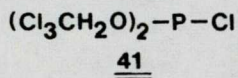
37-ről az 5'-foszfát védőcsoportokat izoamil-nitrittel, a p-klórfenil és benzoil védőcsoportokat lúgos hidrolizissal eltávolítva /cc. NH<sub>4</sub>OH; 5 ó, 60°C/ 5'-O-foszforil-3-O-/o-nitrobenzil/-adenilil-/2'-5'/-3'-O-/o-nitrobenzil/-adenilil-/2'-5'/-3'-O-/o-nitrobenzil/-adenozint /38/ kaptak.

38 vegyület 5'-foszfát csoportjának aktiválására és az 5'-trifoszfát csoport kiépítésére a 2.3.3. fejezetben ismertett Hoard-Ott eljárást alkalmazták, majd az o-nitrobenzil védőcsoportokat fotolizissal távolították el, és 1 terméket ioncserés kromatográfiával tisztították.

### 3.3. A P<sup>α</sup>-O-C<sup>5'</sup> kötés kiépítése trimer szinten /B.2. eljárás/

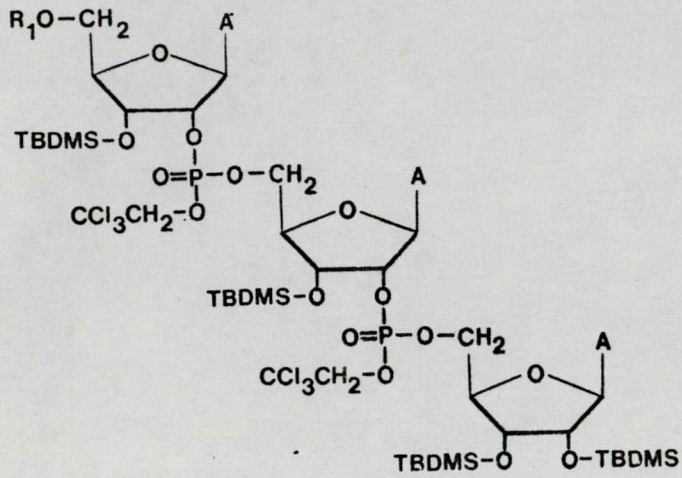
1 vegyület 5'-trifoszfát csoportjának Torrence és mtsai által megvalósított<sup>39</sup> kiépítési módja során a szintézis kiindulási anyaga 39a védett trimer. /3.3 ábra/.

Az R<sub>1</sub> védőcsoport savas hidrolizissal történő hasítása után nyert szabad 5'-hidroxil terminális 39b-t bisz-2,2,2-triklór-etilfoszfokloridittal /41/, tetrahidrofuránban -70°C-on foszforilezték.



Oxidáció /I<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O/ után a védett 5'-foszfát csoportot tartalmazó trimert /39c/ 75 %-os termeléssel izolálták. 39c vegyületről a 2,2,2-triklór etil csoportokat redukтив β eliminációval, aktivált cinkkel, a terc.-butil-dimetil szilil



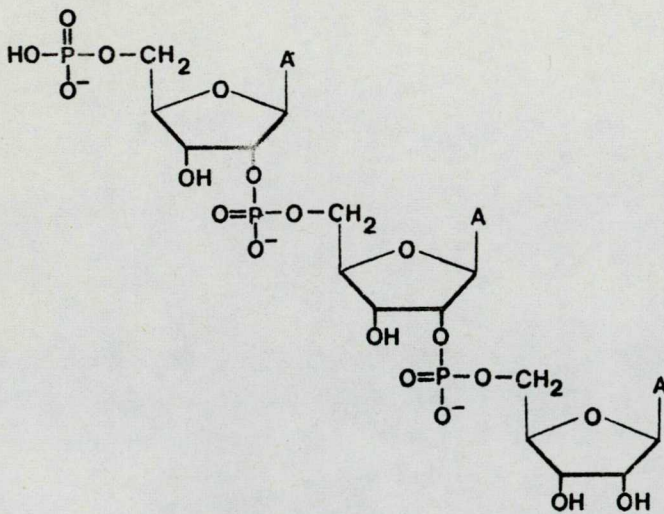
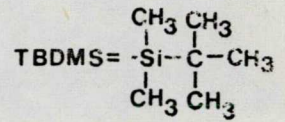


39

R<sub>1</sub>

- a: MeOTr
- b: H
- c: P(O)(OCH<sub>2</sub>CCl<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

A = adeninil-9



40

1, Zn/Cu  
2, F<sup>-</sup>

1, karbonildiimidazol  
2, H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>

1

3.3. ábra



csoportokat tetrabutyl-ammóniumfluoriddal távolították el. Az így nyert 5'-foszforil-adenilil-/2'-5'/-adenilil-/2'-5'/-adenozin /40/ 5'-foszfát csoportjának aktivitását és az 5'-trifoszfát csoport kiépítését a Hoard-Ott eljárás alkalmazásával végezték, és 1-t ioncserés kromatográfiás tisztítás után 39b-re vonatkoztatott 20 %-os termeléssel nyerték.

### 3.4. A $P^{\alpha}$ -O-C<sup>5'</sup> kötés kiépítése trimer szinten /A.2 eljárás/

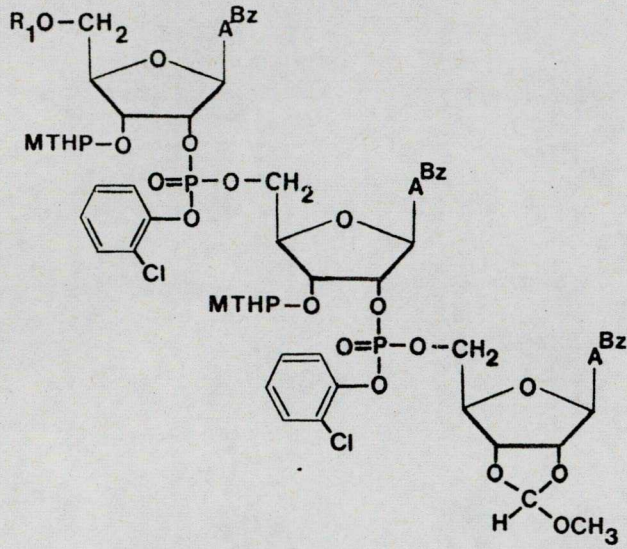
1 Reese és Jones által leirt szintézise során<sup>40</sup> 42a védett trimert a foszfortriészter módszer alkalmazásával 2'-5' irányu szintézissel építették fel.

R<sub>1</sub> 5'-OH védőcsoportot szelektív lugos hidrolizissel /0.2 M NaOH, 30 sec, 0°C/ eltávolítva nyerték a foszforilezés kiindulási anyagául szolgáló 5'-OH terminálisu védett trimert /42b// 3.4. ábra/.

42b vegyületet 2,4-diklórfenil-S-metiltio foszforkloridáttal /22/ piridinben foszforilezték, és az így kapott 42c-t 70 %-os termeléssel izolálták.

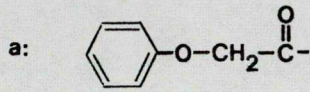
42c-ről a 2,4-diklórfenil és az O-klórfenil védőcsoportokat N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>,N<sup>3</sup>,N<sup>3</sup>-tetrametil guanidinium-benzaldoximáttal, az N<sup>6</sup>-benzoil csoportokat lugos hidrolizissel /cc. NH<sub>4</sub>OH, 24 ó, 20°C/ a metoxitetrahydro-piranyl és metoxi-metilidén csoportokat savas hidrolizissel /0,01N HCl, 6 ó/ távolították el. A deblokkolás befejező lépése a 2'/3'/-O-formil észterek hidrolizise volt. /pH = 9, 10 perc/.



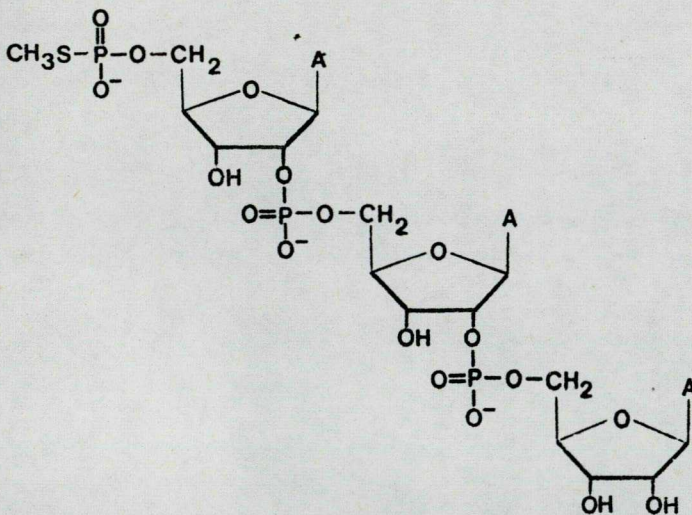
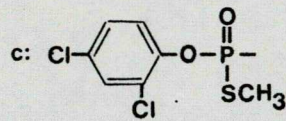


42

R<sub>1</sub>



b: H



1, oximát  
2, NH<sub>4</sub>OH  
3, H<sup>+</sup>  
4, NH<sub>4</sub>OH

H<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup> / 2

1

43

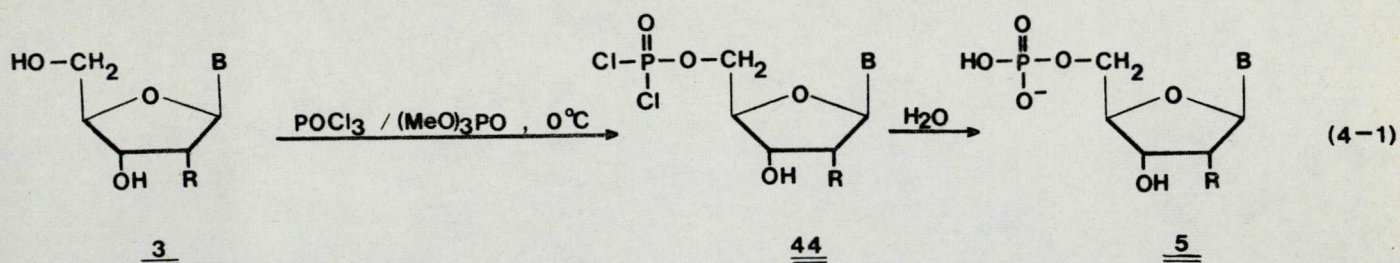


Az így nyert 5'-S-metil foszfotioát funkciós csoportot tartalmazó trimert /43/ tetra-tri-n-butylammónium-pirofoszfát piridines oldatával I<sub>2</sub> jelenlétében reagáltatva 1 40 %-os termeléssel keletkezett /2.3.4. fej./ 1-t kromatográfiás tisztítás után 42b-re vonatkoztatott 25 %-os termeléssel izolálták.

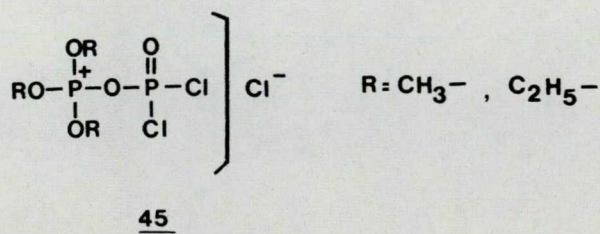


4 A Yoshikawa foszforilezés. Nukleozid 5'-foszfodikloridátok szintetikus alkalmazása

Yoshikawa és mtsai 1967-ben 2',3'-O izopropilidén nukleozidok foszforilkloriddal történő foszforilezése során figyelték meg először, hogy trialkil foszfátok hozzáadása a reakcióelegyhez a reakciót tercier bázis jelenléte nélkül is jelentősen meggyorsította; nem védett nukleozidok /3/ POCl<sub>3</sub>-val trimetil, illetve trietil foszfát oldószerben történő foszforilezése a reakció primer termékeiként keletkező nukleozid 5'-foszfodikloridátok /44/ hidrolizise után főtermékként jó termeléssel a megfelelő nukleozid 5'-foszfátokat /5/ szolgáltatatta.<sup>10,11</sup>



A trialkil foszfátok szerepét a POCl<sub>3</sub>-val való kölcsönhatás során keletkező trialkoxi foszforán származéknak /45/ a POCl<sub>3</sub>-hez viszonyított megnövekedett reaktivitásával magyarázták.



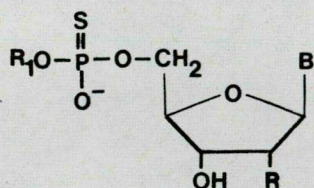


Mivel az eljárás során alkalmazott reakció körülmények rendkívül egyszerűek; 2'/3' /-OH, illetve bázis védőcsoportok alkalmazására nincs szükség; a foszforilező ágens olcsó - e módszer mind a természetes nukleozidok, mind a módosított szerkezetű ribózt vagy bázist tartalmazó nukleozid analógok foszforilezésnek standard eljárásává vált.<sup>12,13,14,41</sup>

A termék /5/ izolálása a reakcióelegy savas vagy semleges hidrolizise után ioncserés oszlopkromatográfiával, vagy 44 intermedier vízmentes éterrel történő kicsapása és 44 savas hidrolizise után a szabad sav kristályosításával történhet.<sup>42</sup>

Amennyiben az ioncserés kromatográfia során a  $\text{POCl}_3$  feleslegéből keletkező anorganikus foszfát és 5 nem választható szét, az anorganikus foszfát eltávolítására aktiv szén oszlopot alkalmaznak<sup>43</sup>. A foszforilezési reakció szelektivitásával kapcsolatos problémákat a következő fejezetben részletesen ismertetem.

A Yoshikawa foszforilezés módosított foszfát csoportot tartalmazó nukleotid származékok szintézisére is kiterjeszhető. 4-1 reakció során tiofoszforilkloridot / $\text{PSCl}_3$ / alkalmazva nukleozid-5'-foszfotioátok keletkeznek /46a/'<sup>44</sup>.

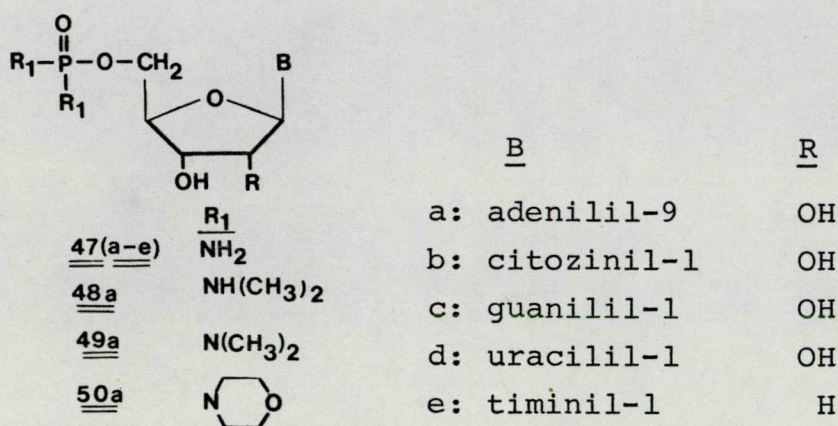


- a:  $\frac{\text{R}_1}{\text{H}}$   
 b:  $\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{O}^-$   
 c:  $\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{OP}(\text{O})(\text{OH})\text{O}^-$



A 46a-ból készíthető - királis  $p^{\alpha}$  atomot tartalmazó 46b-c származékok enzimek reakciók sztereokémiájának vizsgálata során nyertek felhasználást<sup>45</sup>.

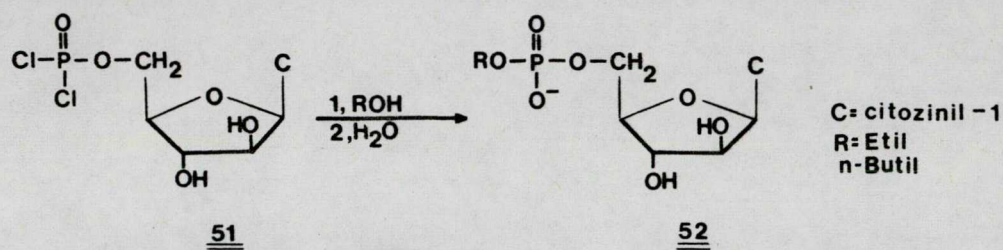
Nukleozid 5'-foszfodikloridátok /44/ in situ ammonilizise nukleozid 5'-foszfodiamidátok 47a-e/ szintézisét tette lehetővé.<sup>20</sup>,



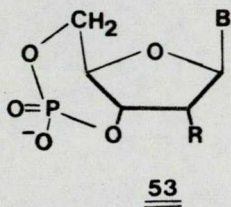
47/a-e/ vegyületek sokoldaluan használható szintetikus intermedierek. Egyik  $-NH_2$  csoportjuk szelektív szubsztituálhatósága nukleozid 5'-foszfamidátok<sup>20,46,47</sup>; valamint  $P^1$ -/Nukleozid-5'-/ $P^1$ -amino trifoszfátok<sup>48,49,50</sup> szintézisének alapjául szolgált. 44 ammonilizise N-alkil aminokkal is elvégezhető, ily módon adenzin 5'-/N,N'-dimetil/foszfo-diamidátot /48a/ adenzin 5'-/N,N,N',N'-tetrametil/ foszfo-diamidátot /49a/ és adenzin 5'-foszfodimorfolidátot /50a/ állítottak elő.<sup>51</sup>



1- $\beta$ -D-arabino furanozil-citozin foszforilezése során nyert 5'-foszfodikloridát származék /51/ in situ alkoholizálásával majd ezt követő hidrolizissal az 1- $\beta$ -D-arabino furanozil-citozin 5'-alkil foszfátjait 52/ állították elő.<sup>52</sup>



44 intermedier [R = OMe; H] lúgos hidrolizálásával /pH = 13/ a 3'-OH csoport intramolekuláris részvételével lejátszódó folyamat során 3',5' ciklofoszfát gyűrű 53 alakítható ki.<sup>53</sup>





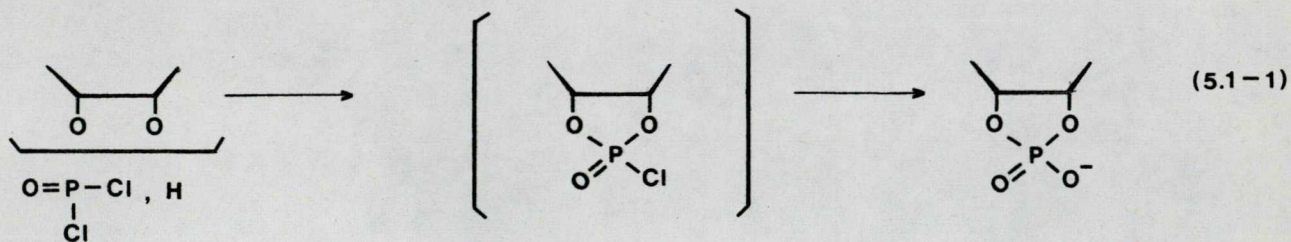
EREDMÉNYEK

5 A Yoshikawa foszforilezés szelektivitásának vizsgálata

5.1. Bevezetés

Dawson 1977-ben kritikailag felülvizsgálta a Yoshikawa módszerrel történő foszforilezést és a termékelegy  $^{31}\text{P}$  NMR spektroszkópiás analizisével kimutatta<sup>54</sup>, hogy az 5'-monoszubsztituált származékok valóban minden esetben a reakció főtermékei /60-90 %/, azonban az adott nukleozidtól és a reakció körülményektől függően / $\text{POCl}_3$  felesleg, reakcióidő/ a termékelegy 2'/3'/ monofoszfátot és 5', 2'/3'/ difoszfátot is tartalmazhat.

Az aszelektivitásból eredő mellékreakció ribonukleozidok esetén /3, R = OH a reakció preparatív felhasználását nem korlátozza. A cisz  $\alpha$  OH csoport jelenléte miatt 2',3' klórciklofoszfát, majd a reakcióelegy semleges hidrolízise során 2',3' ciklofoszfát keletkezik, amely az 5'-foszfáttól ioncserés kromatográfián könnyen elválasztható /5.1-1/.



Dezoxiribonukleozidok /3, R = H/ foszforilezése során azonban az aszelektív foszforilezés során keletkező 3'-



-foszfát és 5'-foszfát izomerek elválasztása ioncserés kromatográfiával csak purin bázist tartalmazó nukleozidok esetén valósítható meg.<sup>54,55</sup> E probléma általános megoldására Safhill a 3'-foszfomonoészteráz aktivitással rendelkező P<sub>1</sub> nukleáz enzim preparatív felhasználását javasolta.<sup>56</sup>

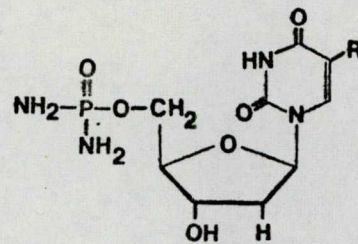
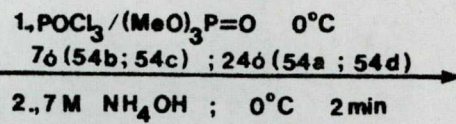
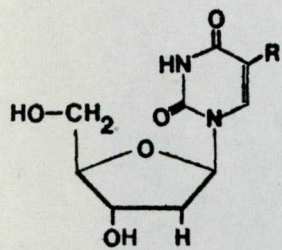
5.2. A foszforilezés szelektivitásának vizsgálata a 3' és 5'-foszfodiamidátok kromatográfiás elválasztásával. 5-alkil és 5-Fluor 2'-dezoxiuridin 5'-foszfátok szintézise.

A foszforilezés primer termékelegyenek ammonolizise<sup>20</sup> során keletkező nukleozid foszfodiamidát izomerek tulajdonságainak vizsgálata egy alternatív eljárás kidolgozását tette lehetővé<sup>55</sup> a Yoshikawa foszforilezés alkalmazására olyan nukleozidok esetében is, ahol az izomer monofoszfátok kromatográfiás elválasztása nem lehetséges. Az 5-alkil és 5-Fluor-2'-dezoxiuridin 5'-foszfátok /58a-d/ a pirimidin nukleozidok metabolizmusának vizsgálata során nyertek felhasználást.<sup>56,57</sup>

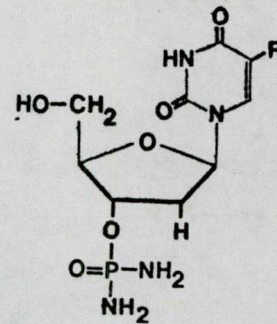
5-Fluor-2'-dezoxiuridint /54a/; 2'-dezoxiuridint /54b/; timidint /54c/, 5-izopropil-2'-dezoxiuridint /54d/ 2,2-szeres moláris feleslegű POCl<sub>3</sub>-val trimetil foszfátban foszforileztem /5-1 ábra/, a reakcióelegy in situ ammonolizise<sup>20</sup> után a főtermékként képződő nukleozid 5'-foszfo-



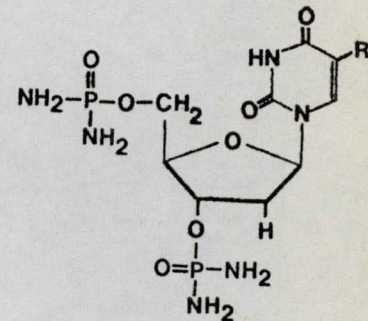
5.1. ábra



+



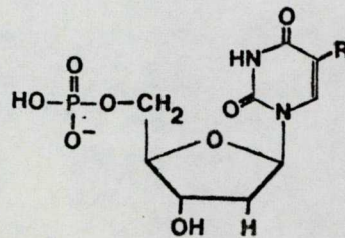
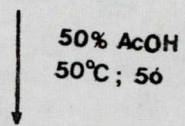
+



54

	R
a	F
b	H
c	$\text{CH}_3$
d	$i\text{-C}_3\text{H}_7$

55



58

56

57

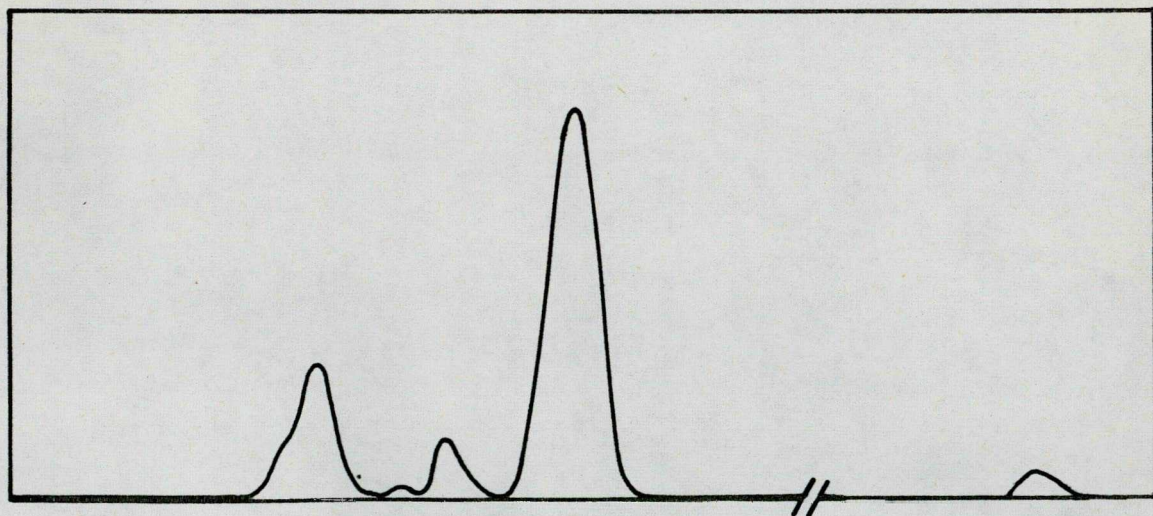
1  
33  
1



diamidátok 55/a-d/ /50-80%/ mellett, elreagálatlan nukleozidot /54a-d/, a Yoshikawa foszforilezés aszelektivitásból származó 3'-foszfodiamidátokat 56/a-d/, 3'-5'-bisz[foszfodiamidátokat] 57/a-d/, valamint az ammonolizist kísérő hidrolitikus mellékreakciókból származó csekély mennyiségű foszfamidátokat tartalmazó reakcióelegyet nyertem.

Az ionos melléktermékek eltávolítását  $\text{DE-32HCO}_3^-$  oszlopon, majd a vízzel eluálódó töltés nélküli 54-57/a-d/ további szeparálását megosztlásos kromatográfiával végeztem el.

A timidin /54c/, timidin 3'-foszfodiamidát /56c/, timidin 5'-foszfodiamidát /55c/ és a timidin 3',5'-bisz[foszfodiamidát] /57c/ kromatográfiás elválasztása során nyert eluciós diagrammot mutatja be az 5.2. ábra.



5.2. ábra. 1 mmól timidin foszforilezése során nyert 54-57 c vegyületek elválasztása. Oszlop: Whatmann CC-31 cellulóz /2,2x40 cm/ Eluens: nBuOH:EtOH:0.1 M TEAB /pH = 7.5/ = 16:2:5



Azonos méretű kromatográfiás oszlop alkalmazása 1 mmól 54a, 0.5 mmól 54b, illetve 0.1 mmól 54c nukleozidok foszforilezése során keletkezett termékelegység elválasztását tette lehetővé. Az elució sorrend valamennyi vizsgált esetben a timidinhez hasonlóan: nukleozid > 3'-izomer > 5'-izomer > 3',5' diszubsztituált termék volt. A termékelegységek összetételét és az egyes vegyületek jellemző  $R_f$  értékeit az 5.1 Táblázatban tüntettem fel.

5.1. Táblázat

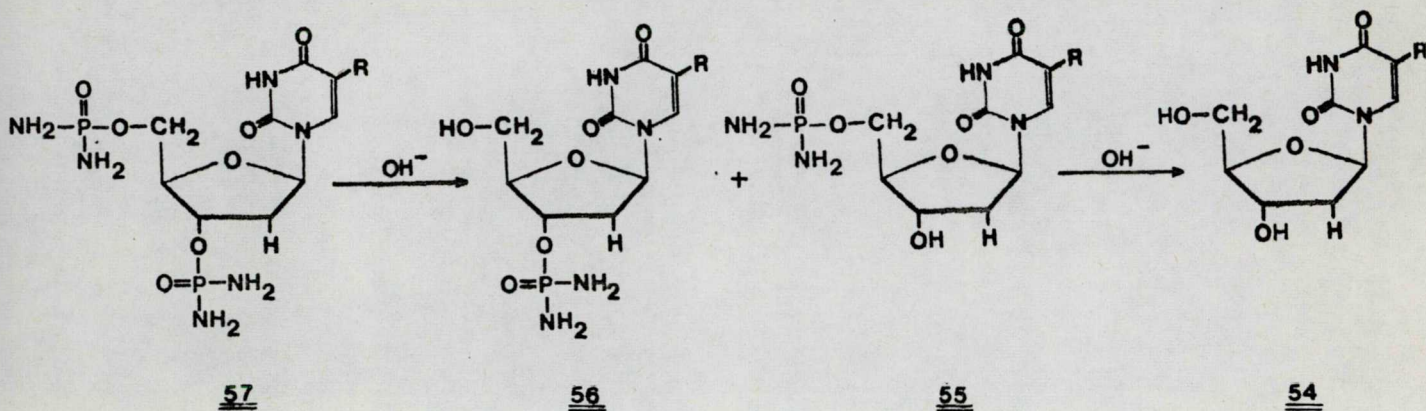
R vegyület	%	a $R_f^a$	%	b $R_f$	%	c $R_f$	%	d $R_f$
<u>54</u>	18.6		6.7		19.1		26.6	
		0.63		0.50		0.66		0.67
<u>55</u>	63.4		81.3		69.5		51.1	
		0.26		0.20		0.28		0.88
<u>56</u>	6.5		2.4		4.4		8.6	
		0.31		0.21		0.35		0.45
<u>57</u>	7.6		6.3		5.2		11.4	
		0.13		0.09		0.12		0.18

<sup>a</sup>S<sub>1</sub> rendszer /kísérleti rész/

55-57 /a-d/ vegyületek szerkezetét hidrolízis termékeik vékonyrétegkromatográfiás azonosítása és <sup>31</sup>P NMR spektrumai alapján igazoltam.



Lugos hidrolizis /0.1 M NaOH, 5 perc, 20°C/ - nukleozid foszfodiamidátok ismert tulajdonságainak megfelelően<sup>20</sup> - valamennyi vizsgált vegyület esetén egyedüli termékként a kiindulási nukleozidot adta. 57 diszubsztituált származékok lugos hidrolizise 55 és 56 monoszubsztituált intermediereken keresztül haladt.



55 és 56 monoszubsztituált származékok diaminofoszforil csoportjának helyzetét a savas hidrolizis /pH = 1.0 12 ó/ során keletkezett nukleozid monofoszfát izomerek <sup>31</sup>P NMR spektrumai alapján állapítottam meg.

Az irodalmi adatokkal egyezésben<sup>58</sup> a 3' izomerek  $\delta$  értékei az 5' izomerekhez viszonyítva 0.5-0.6 ppm-vel magasabb térerősség felé eltolódva jelentkeztek. Az NMR adatokat a kísérleti részben tüntettem fel.

A 3' izomer mentes 5'-foszfodiamidátok /56 a-d/ savas hidrolizisét preparatív léptékben 50 %-os CH<sub>3</sub>COOH-val végeztem /5 ó, 50°C/ /5.1. ábra/. Bepárlás után a megfelelő 5'-monofoszfátokat /58 /a-d/ DE-32[HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] oszlopon



triethylammónium hidrogénkarbonát lineáris gradien-  
sével izoláltam, 56-ra vonatkoztatott 95-98 %-os ter-  
meléssel.

### 5.3. Az eredmények alkalmazása

55 a-d vegyületek izolálásánál követett eljárást  
alkalmaztam a 3'-dezoxiadenozin /59c/ és 2'-dezoxiade-  
nozin /59b/ Yoshikawa foszforilezése során nyert termék-  
elegy izomer összetételének meghatározására is. A foszfo-  
rilezési reakciókat a 6.1. ábrán feltüntetett módon vé-  
geztem. A termékelegy ammonolizise után a töltés nél-  
küli termékek megoszlásos kromatográfiás elválasztásá-  
val megállapítottam, hogy 59c és 59b esetén 2' illetve  
3' szubsztituált melléktermékek a foszforilezés során  
0.5 %-nál kisebb arányban képződtek, e dezoxiribonukleo-  
zidok esetén tehát a Yoshikawa foszforilezés nagyfoku  
szelektivitással hajtható végre.

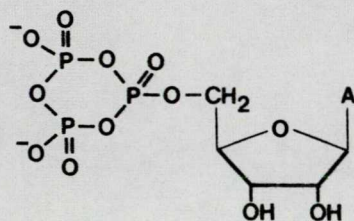
Az 5' és 3' /ill. 2'/ diamidátok elválaszthatóságát  
a szelektív foszforilezések esetén, a meghosszabbított  
reakcióidővel nyert diszubsztituált származékok parciális  
lúgos hidrolizise során keletkező 3' illetve 2' izomert  
tartalmazó kromatográfiás kontroll felhasználásával  
ellenőriztem.



6 Nukleozid 5'-trifoszfátok nukleozid 5'-foszfodikloridát intermedieren keresztül haladó szintézise

6.1. Bevezetés

Adenozin 5'-trifoszfát  $\gamma$ -foszfát csoportjának DCC-vel történő aktivitását követően az  $\alpha$  és  $\gamma$  foszfát csoport részvételével intramolekuláris kondenzáció játszódik le és a folyamat során adenozin 5'-trimetafoszfát /61a/ keletkezik<sup>59,60,61</sup>.



61a

61a ciklikus anhidrid tributilammónium sója DMF-ben vízmentes körülmények között stabil, alkoholok, illetve aminok jelenlétében a gyűrű felnyílásához vezető nukleofil támadás minden esetben 61a két, nem közvetlenül adenozinhoz kötött P atomjainak valamelyikén történik [ $\beta/\gamma$ / pozíciók] és a  $P^\alpha-O-P^{\beta/\gamma}$  anhidrid kötés hasadása során  $\gamma$ -szubsztituált ATP származékok keletkeznek<sup>59</sup>.

61a vegyület hidrolizise kvantitativ ATP-t ad.<sup>59,60</sup>

61a ciklikus trimetafoszfát észter szintézisére alternatív utat kínál a  $P^\alpha$  atomon két reakció képes szubsztituenst tartalmazó aktivált nukleotid származék bifunkciós nukleofil



ágenssel: pirofoszfát anionnal történő reakciója. Mivel nukleozid 5'-foszfodikloridátok a megfelelő nukleozidból a Yoshikawa foszforilezéssel egy lépésben jó termeléssel nyerhetők, e reakció ily módon a 4. fejezetben felsorolt vegyületek mellett nukleozid 5'-trifoszfátok szintézisének alapjául is szolgálhat. E szintézis lehetőséget először adenin bázist tartalmazó ribo, illetve dezoxiribonukleozidok 5'-trifoszfátjainak szintézisével igazoltam<sup>62</sup>. Az alábbiakban először e vegyületek előállítását, majd a reakció mechanizmusának vizsgálatát és e reakció-típus általánosításának lehetőségeit ismertetem.

6.2. Adenozin 5'-trifoszfát /62a/; 2'-dezoxiadenozin 5'-trifoszfát /62b/ és 3'-dezoxiadenozin 5'-trifoszfát /62c/ szintézise

Adenozint /59a/; 3'-dezoxiadenozint /59c/ a Yoshikawa módszer szerint  $\text{POCl}_3$ -val trimetilfoszfátban  $0^\circ\text{C}$ -on; 2'-dezoxiadenozint /59b/ az eljárás módosításával  $-20^\circ\text{C}$ -on foszforileztem /6.1. ábra/. Az 5'-monoszubsztituált termékek /60 /a-c// maximális arányu képződéséhez szükséges reakcióidőt a reakcióelegy elhidrolizált mintáinak vékonyrétegekromatográfiás analízisével állapítottam meg. Az alkalmazott reakció körülmények /30%  $\text{POCl}_3$  felesleg, 1.5 ó/ során az 5'-monofoszfátokra /64 /a-c// elérhető hozamok 80-90 % között voltak.

Nukleozid 5'-trifoszfátok 62/a-c/ szintézise során az 5'-foszfodikloridátok hidrolízise helyett, a reakcióelegy-

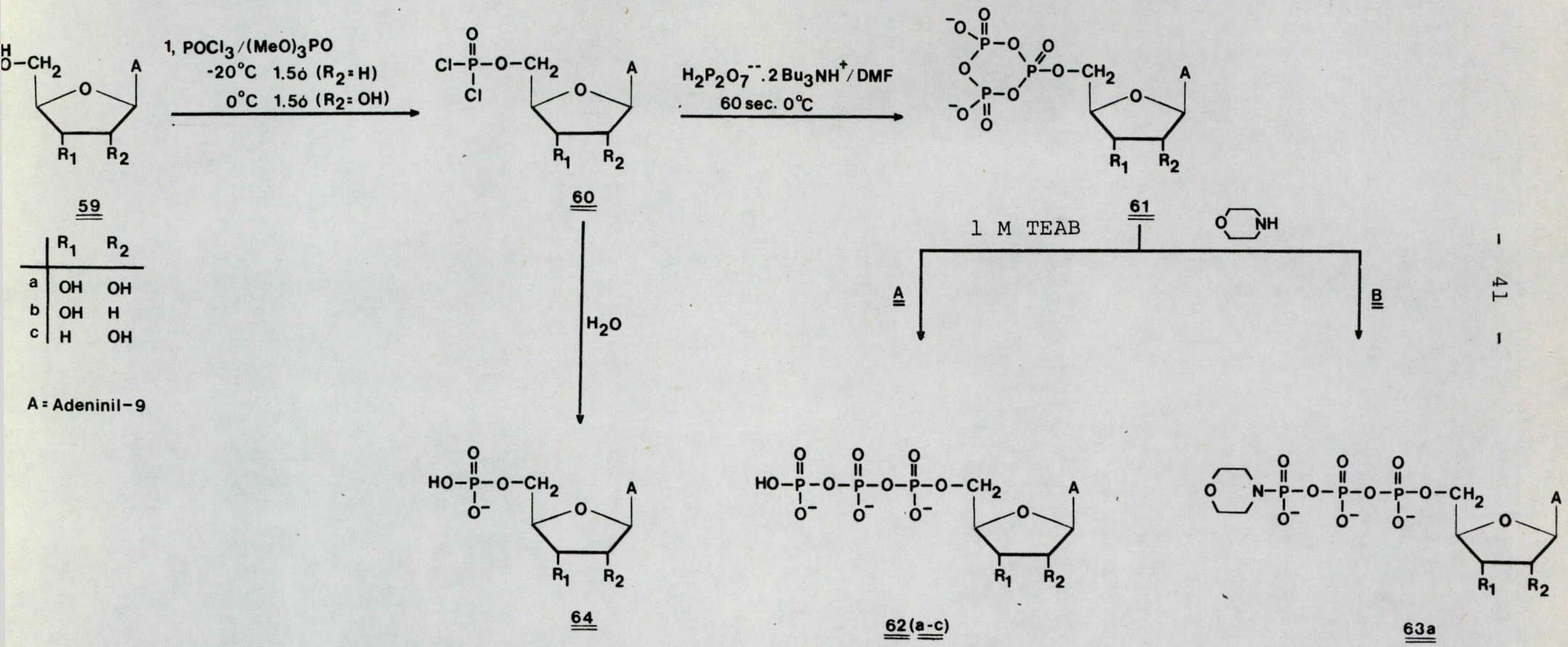


hez 4-szeres moláris feleslegű bis-tri-n-butilammónium pirofoszfát 0.5 M-os dimetilformamidos oldatát adtam, majd 1 perc állás után a reakcióelegyet 1.0 M-os trietilammónium bikarbonát oldattal hidrolizáltam. A termékek izolálását ioncserés oszlopkromatográfiával DE-32[HCO<sub>3</sub>] oszlopon végeztem. Az eluciós diagrammokat 6.2 ábrán tüntettem fel.

A reakció főterméke minden esetben a 0.25-0.30 M sókoncentrációnál eluálódó nukleozid 5'-trifoszfát 62/a-c /IV peak/ volt. A termékelemek ezenkívül elreagálatlan nukleozidot /I/, illetve a 2'-dezoxiadenozin foszforilezése esetén adenint /Ia/; adenozin esetében a 2'/3'/OH foszforileződéséből adódó adenozin 2'3' ciklofoszfátot /II/, a foszfodikloridát intermedier hidroliziséből levezethető 5'-monofoszfátot 64/a-c /III/ - valamint csekély mennyiségben - nem vizsgált szerkezetű - 0.3 M-nál magasabb sókoncentrációnál eluálódó melléktermékeket tartalmaztak. A termékelemek százalékos összetételét a 6.2 ábrán tüntettem fel.

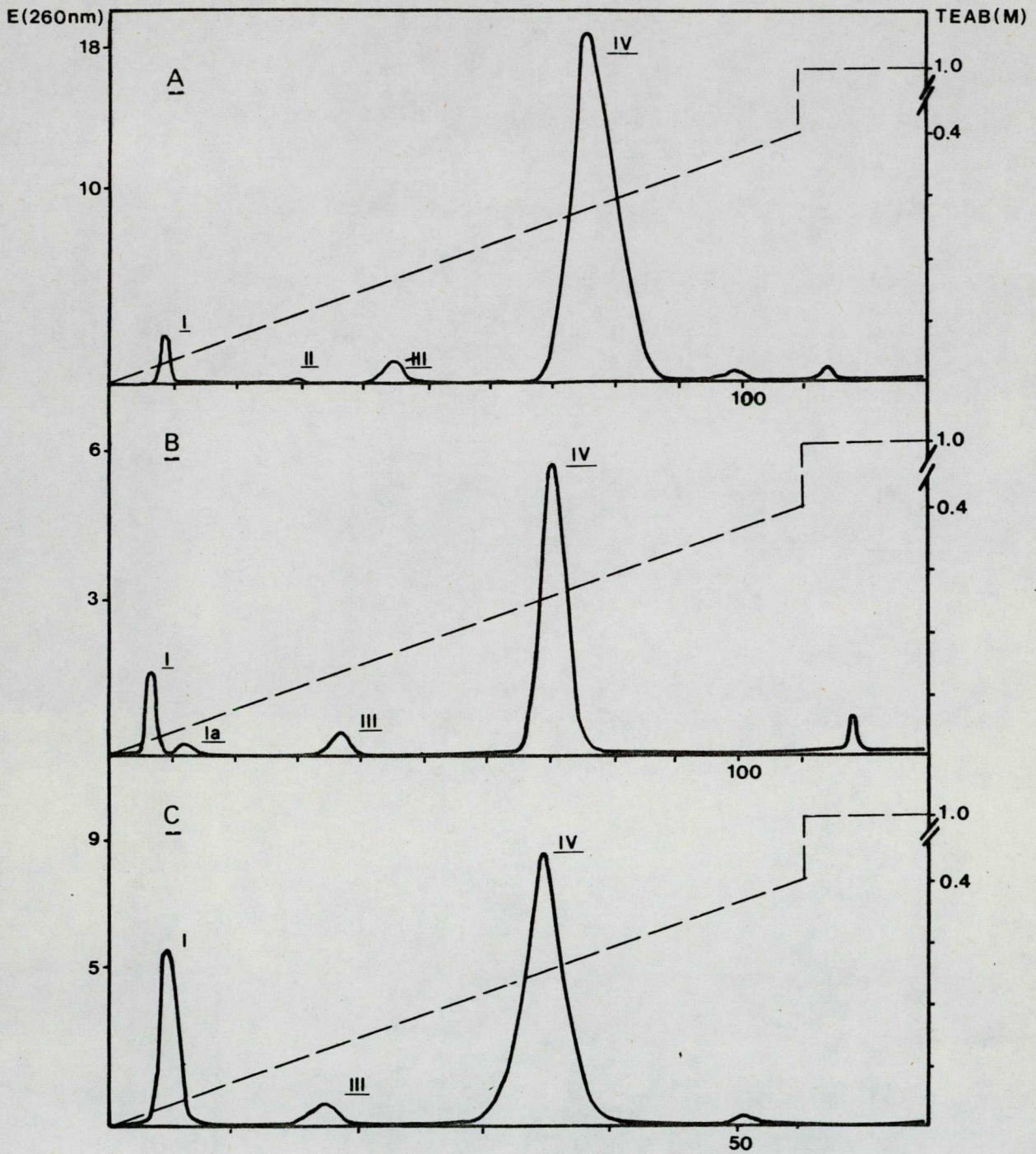
A vizsgált vegyületek szerkezetének igazolását vékonyrétegekromatográfiásan autentikus kontroll anyagok felhasználásával végeztem. 62/a-c vegyületek alkalikus foszfátazzal végzett enzimatis hidrolizisének egyedüli UV abszorbeáló terméke a kiindulási nukleozid volt, tehát a heterociklusos bázis modifikációja a reakció során nem következett be. A hidrolizis során keletkező anorganikus





6.1 Ábra





	<u>I</u>	<u>Ia</u>	<u>II</u>	<u>III</u>	<u>IV</u>
<u>A</u>	4%		0.5%	4.5%	86%
<u>B</u>	11%	2%		3%	79%
<u>C</u>	19%			4%	70%

6.2. ábra: 62/a-c/ izolálása DE-32[ $\text{HCO}_3^-$ ] oszlopkromatográfiával.



foszfát és nukleozid mólaránya 62a esetén 2.98:1, 62b esetén 2.96:1 az elméleti 3:1 aránynak megfelelő volt, míg 62c esetén e vegyület  $^{31}\text{P}$  NMR spektrumának felvételével igazoltam azt, hogy a termékek anorganikus polifoszfát szennyezést nem tartalmaznak.

### 6.3. A reakció mechanizmusának vizsgálata

Az előző fejezetben leírt reakció menetét ATP szintézise során részletesebben is megvizsgáltam. Megállapítottam, hogy 60a pirofoszfáttal történő reakciója után 1.0 M-os TEAB helyett morfolint adva a reakcióelegyhez /6.1 ábra B ut/ az analóg reakcióban hidrolízis során képződő ATP-vel azonos termeléssel  $\text{P}^3\text{-morfolino-P}^1\text{-[adenozin-5']-trifoszfát}$  /63a/ keletkezik.

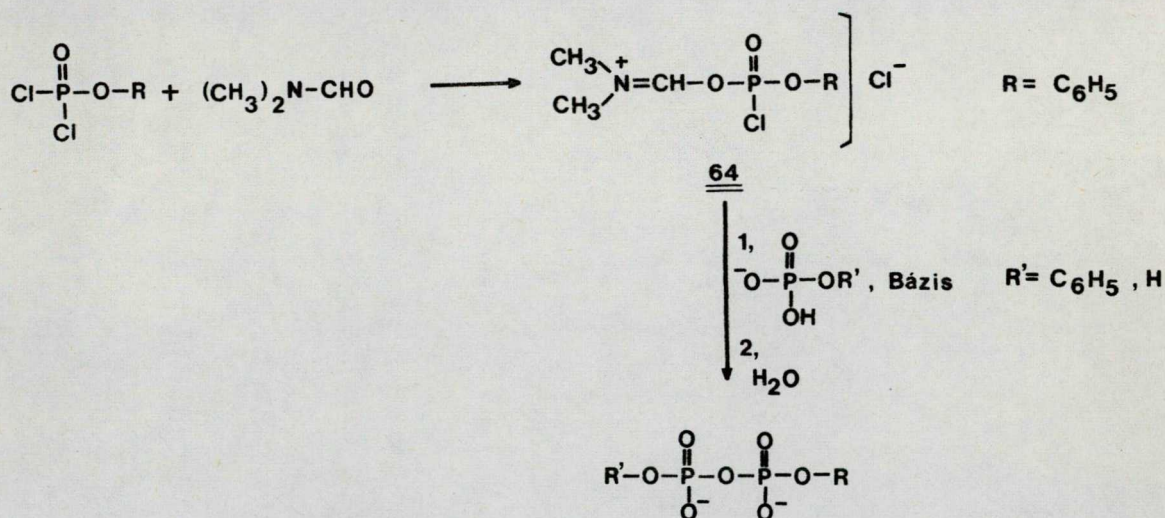
63a-t Dowex 1x8[ $\text{HCO}_3^-$ ] oszlopon, trietilammóniumhidrogénkarbonát lineáris gradiensével izoláltam. Savas hidrolízise /0.1 M HCl, 30 perc, 20°C/ során kvantitativ ATP keletkezett. Alkalikus foszfáttal 63a nem hidrolizálható, ami a molekulán lévő sav labilis szubsztituens  $\gamma$  helyzetét igazolta. További szerkezetigazolásul szolgál, hogy 63a kromatográfiás viselkedése megegyezett az ATP-ből DCC-vel történő aktiválással és ezt követő aminolízissel előállított anyag tulajdonságaival.<sup>63</sup>

Az a tény, hogy a belépő morfolino csoport  $\gamma$  pozícióba kerül egyértelműen igazolja, hogy 60a és a pirofoszfát anion reakciója során 61a ciklikus trimetafoszfát észter



jött létre, 62a és 63a vegyületek azonos termeléssel való képződése /6.1. ábra A ill. B ut/ pedig arra utal, hogy a gyűrűzárás az alkalmazott reakciókörülmények során teljesen végbement.

61a ciklikus trimetafoszfát észter kialakulásának értelmezése Cramer és mtsai fenilfoszfodikloridáttal végzett kísérletei alapján lehetséges<sup>64</sup>. Vezető képességi titrálásokkal kimutatták, hogy fenilfoszfodikloridát dimetilformamiddal 1:1 mólarányu komplexet képez /64/. 64 imidoilfoszfát kialakulása a komponensek egyesítésekor pillanatszerűen történik.



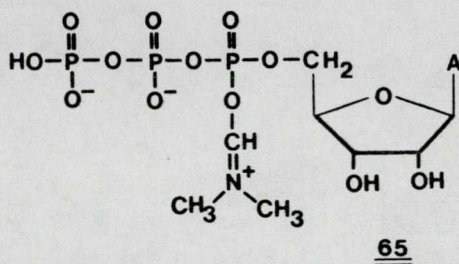
64 a foszforsavészterek és karbodiimidek reakciói során keletkező imidoilfoszfátokhoz hasonlóan /2.2. fejezet/ erélyes foszforilező ágens.

Foszforsavval, illetve foszforsav észterrel való reakciója során tercier amin jelenlétében már rövid reakcióidő /5-10 perc/ során is jó termeléssel pirofoszforsav mono-

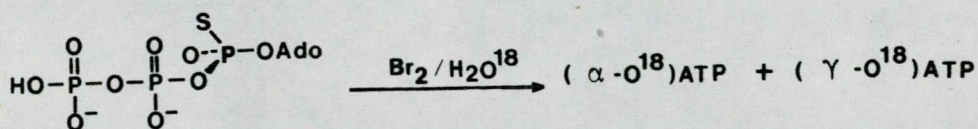


észter /R' = H; R = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>/ illetve pirofoszforsav di-  
észter /R' = C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>/ keletkezett, míg DMF távollétében  
a fenilfoszfodikloridát és a foszfát anionok közötti  
reakció két nagyságrenddel lassabban ment végbe.

Az általam vizsgált reakcióban a fentiek analógiájára  
szintén 64 /R = adenzin 5'-il/ imidoil foszfát képző-  
dése valószínűsíthető. E vegyület és a pirofoszfát  
anion reakciója után, a második P-Cl kötés aktiválása  
során létrejövő α-imidoil ATP /65/ - a 2.2. fejezetben  
ismertetett γ-imidoil ATP-hez hasonló intramolekuláris  
ciklizálása vezet 61a kialakulásához.



Egy 65-höz hasonló, az α foszfor atomon aktivált P-X kötést  
tartalmazó ATP származék intramolekuláris ciklizálását  
adenozin 5'[(R)α<sup>18</sup>O] trifoszfát adenzin 5'[(S)α-tio] tri-  
foszfátból kiinduló szintézise során is megfigyelték<sup>65</sup>.



A P-S kötés Br<sub>2</sub>-val történő aktiválása során, a reakciót  
H<sub>2</sub><sup>18</sup>O-ban végezve a <sup>18</sup>O 1:4 arányban oszlott meg a termék  
α és γ foszfát csoportjai között /<sup>31</sup>P NMR/. /γ-O<sup>18</sup>/ ATP  
képződése ez esetben szintén 61a intermedieren keresztül  
történt.





#### 6.4 Alkalmazási lehetőségek

Az előző fejezetben 62 a-c vegyületek szintézisének példáján bemutatott eljárás - a 2. fejezetben ismertetett csoportosítás szerint az A csoportba tartozik; tehát az aktivált nukleotid származék szintézise a nukleozidból kiindulva egy lépésben történik. Ez esetben azonban a 2. fejezetben ismertetett eljárásoktól eltérően a bifunkciósan aktivált nukleotid származék /60 a-c/ és a pirofoszfát anion reakciója során első lépésben ciklikus trimetafoszfát észter képződik, amelynek vizes trietilammónium hidrogénkarbonát /pH = 7.5/ oldattal történő hidrolizise adja a terméket. ATP /62a/; 2'dATP /62b/; 3'dATP /62c/ szintézise során a nukleozid trifoszfátok, a Yoshikawa foszforilezés termékelegyeinek hidrolitikus feldolgozása során nyert 5'-monofoszfátokkal megközelítően azonos hozammal képződtek, tehát e módszer a nukleozid trifoszfátok szintézisére egyik leggyakrabban használt megoldás; amely a nukleozid szelektív foszforilezését a Yoshikawa módszerrel, majd az izolált 5'-monofoszfátok aktiválását végzi /2. fejezet, B ut/ - jelentős egyszerűsítésének tekinthető.

Az alkalmazott rövid reakcióidő alatt a termék difoszfát-tá bomlása nem következik be - amely a  $P^{\beta}-O-P^{\alpha}$  kötés kialakulásának szokásos körülményei között elkerülhetetlen - tehát a termékelegyek egyszerűbbek a morfolidátos, imidazolidátos eljárás termékelegyeinél.



Az eljárás preparatív alkalmazásánál tekintettel kell lenni, a nukleozid 5'-foszfodikloridát kialakítására használt Yoshikawa foszforilezés melléktermékeire. Ribonukleozidok esetén a 2'/3'/OH foszforilezéséből 2'/3'/ klórciklofoszfát keletkezik /5. fejezet/, amelyből a reakció során keletkező 2'/3'/ ciklofoszfát / 6.2. ábra A/II csucs/ egyszerűen elválasztható a terméktől.

Dezoxiribonukleozidok foszforilezése során - az eljárás alkalmazásának alapfeltétele, csakugy mint 5'-monofoszfátok szintézisének, az Yoshikawa foszforilezés szelektivitása az adott nukleozid esetén, vagy a 3' és 5' trifoszfátok kromatográfiás elválaszthatósága.

E módszert a 6.3 fejezetben leírt vegyületeken kívül, eddig guanozin, /E/-5-/2-brómvinil/-uridin; /E/-5-/2-brómvinil/2'-dezoxiuridin 5'-trifoszfátjainak szintézisére alkalmaztuk laboratóriumunkban.

A reakció 3'-O csoportján polimer hordozóhoz kötött timidin 5'-trifoszfátjának szintézisére ugyancsak alkalmazhatónak bizonyult.

Irodalmi példák ismeretese 5-amino-4-imidazolkarboxamid-ribozid-5'-trifoszfát<sup>66</sup>, és 5 szubsztituált 2'-dezoxiuridin illetve 2'-dezoxicitidin származékok<sup>67</sup> 5'-trifoszfátjainak szintézisére is. Ez utóbbi esetben tiszta 5'-trifoszfátokat HPLC-vel izoláltak.

E példák alapján valószínű, hogy az eljárás kiterjeszhető a legtöbb - Yoshikawa reakcióval foszforilezhető nukleozid - 5'-trifoszfátjának szintézisére is.



Az alábbiakban a dolgozat célkitűzésének megfelelően; az eljárás pppA2'p5'A2'p5'A szintézisére való felhasználásával foglalkozom.



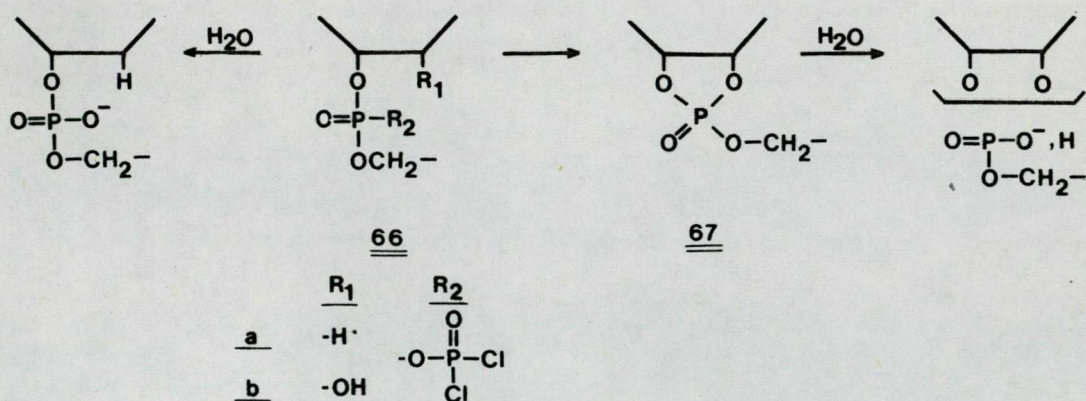
7 pppA2'p5'A2'p5'A /1/ szintézise

7.1. Bevezetés, szintézisterv

pppA2'p5'A2'p5'A 5'-trifoszfát csoportjának kiépítésére az előző fejezetben ismertetett trifoszfát szintézist alkalmaztam.

A Yoshikawa foszforilezés nem védett dinukleozid foszfátok 5'-OH csoportjának foszforilezésére is kiterjeszhető<sup>68,69,21</sup>. Ez esetben nukleozidok foszforilezéséhez hasonlóan bázis illetve 2'/3'/OH védőcsoportok alkalmazására nincs szükség, viszont az interribonukleotid kötés izomerizálódásának elkerülése érdekében - az internukleotid kötés melletti cisz α OH csoport védeése szükséges.

POCl<sub>3</sub> hatására az internukleotid kötés is foszforileződik és diészter- diklórfoszfát vegyes anhidrid képződik<sup>21</sup> /66a-b/.



E reakció végtermékei aszerint különböznek, hogy lehetőség nyílik e a cisz α OH csoport részvételével 67 ciklikus



triészter kialakulására. Így diribonukleozid foszfátból kiindulva  $/R_1 = OH/$  a termék 67 hidroliziséből keletkező 2'-5' illetve 3'-5' internukleotid kötésű izomereket tartalmaz 1:1 arányban, míg  $R_1 = H$  esetben a kiindulási internukleotid kötés regenerálódik a feldolgozás során. Láncasadáshoz vezető degradációt sem 67, sem 66a hidrolizise során nem észleltek.

Mivel védetlen adenilil-/2'-5'/-adenilil-/2'-5'/-adenozin foszforilezésénél a fentiek szerint - a teljes izomerizáció miatt az 5'-O-foszforilezett, 2'-5' internukleotid kötést tartalmazó termék várható hozama  $\leq 25\%$  - munkám során a 3'-OH csoportjain a Yoshikawa foszforilezés körülményei között stabil o-nitrobenzil éter védőcsoportokat<sup>70</sup> tartalmazó vegyület: 3'-O-/o-nitrobenzil/-adenilil-/2'-5'/-3'-O-/o-nitrobenzil/-adenilil-/2'-5'/-3'-O-/o-nitrobenzil/-adenozin /78c/ foszforilezését vizsgáltam. A 3'-O védőcsoport a szintézis utolsó lépésében - az 5'-trifoszfát terminális kialakítása után - fotolitikusan távolítható el. 78c vegyületet a ribooligonukleotid szintézis foszfortriészter módszerével<sup>38</sup> szintetizáltam.

Az alkalmazott szintézis stratégia ennek megfelelően az alábbi lépésekből áll:

- 1./ A foszfortriészter módszer védett monomerjeinek szintézise /7.2. fejezet/
- 2./ A /NB/ 2'p5'A/NB2'p5'A/NB/ /78c/ szintézise /7.3. fejezet/
- 3./ 78c parciálisan védett trimer foszforilezése: /7.4. fejezet/



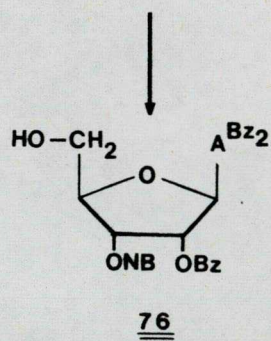
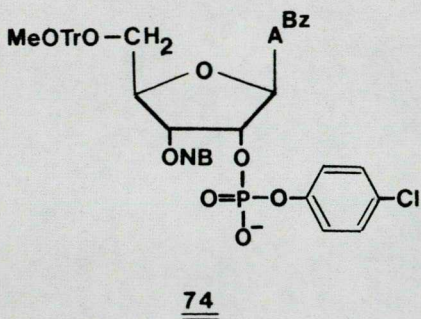
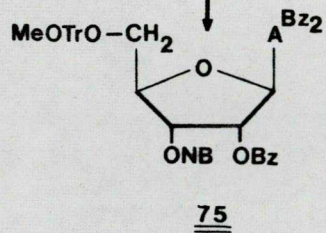
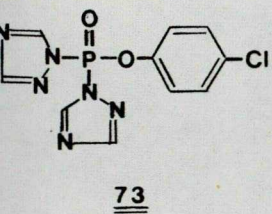
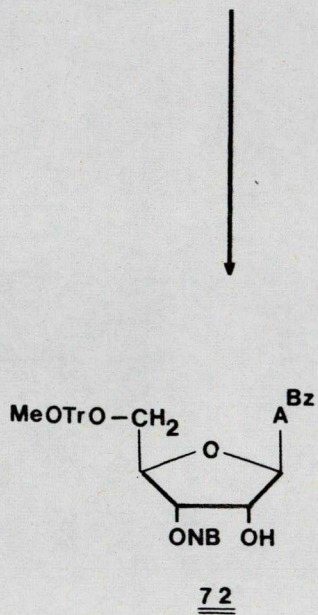
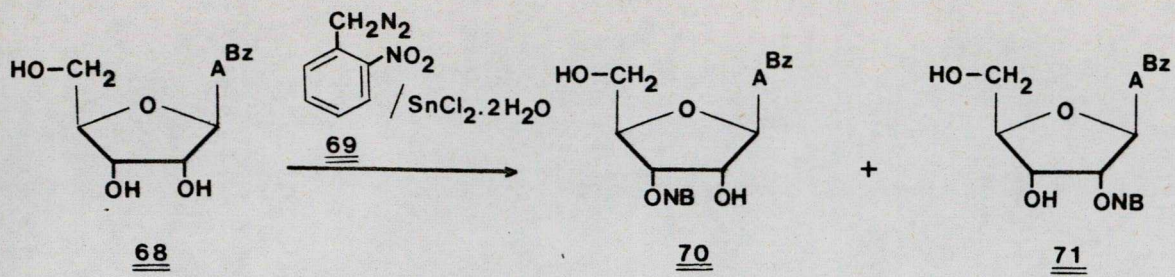
## 7.2. Védett monomerek szintézise

A triészter módszer kiindulási vegyületeit a 7.1 ábrán összefoglalt reakció sorozat alapján állítottam elő.

Adenozint piridinben benzoilklorid feleslegével benzoileztem, majd az alkoholos hidroxil csoportokról a benzoilcsoportokat lugos hidrolizissel távolítottam el<sup>71</sup>. Az így nyert N<sup>6</sup>-benzoil-adenozin /68/ mono alkilezését o-nitrofenil diazometánnal /69/ katalitikus mennyiségű ón/II/ klorid jelenlétében vizmentes DMF-ben végeztem<sup>72</sup>. Az eljárás során a 2'-/3'-O-o-nitrobenzilezett izomerek /70 és 71/ megközelítőleg 1:1 arányban képződtek. A további átalakításokhoz felhasznált 70 vegyületet az izomerkeverék etanolmentes kloroformból végzett frakcionált kristályosítással nyertem. A 3'-o-nitrobenzil-N<sup>6</sup>-benzoil-adenozin kristályosítással történő előállítása - az irodalomban leírt oszlopkromatográfiás eljárással szemben - jelentősen leegyszerűsítette a kiindulási anyag szintézisét. 71-t az anyalugból szilikagél oszlopkromatográfiával izoláltam. Az o-nitrobenzil csoportok helyzetét 70 és 71 vegyületekben vékonyrétegkromatográfiás tulajdonságaik és a <sup>1</sup>H NMR spektrumok összehasonlítása alapján állapítottam meg<sup>72</sup>. 70 és 71 fotolizise /λ = 366 nm/ kvantitatíve a kiindulási 68-t szolgáltatta.

A kristályosítással nyert 70 vegyületből ezt követően piridinben monometoxitritilkloriddal 5'-O-monometoxitritil-N<sup>6</sup>-benzoil-3'-O-/o-nitrobenzil/-adenozint /72/ készítettem,





7.1. ábra



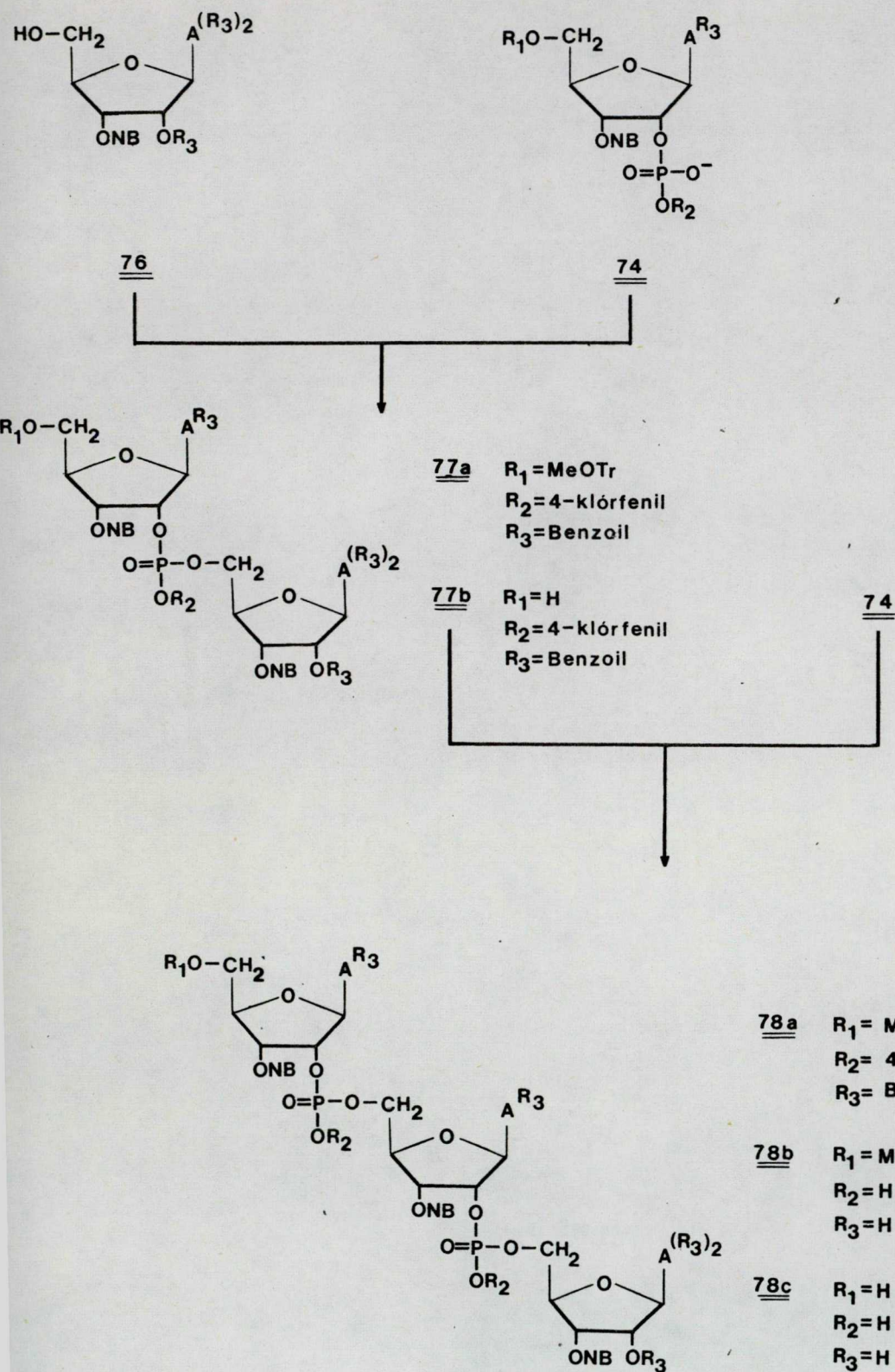
amit szilikagél oszlopkromatográfiával izoláltam. 72 szolgált a védett foszfát komponens /74/ és hidroxil komponens /76/ szintézisének közvetlen prekursorául. 76 előállításához 72-t első lépésben piridinben 2.5-szeres feleslegű benzoil kloriddal acileztem. Az eljárás során mind a 2'-OH mind a 6NH<sub>2</sub> csoport benzoileződött, a kapott 5'-OH-monometoxitritil-3'-O-/o-nitrobenzil/-2'-O,N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-tribenzoil-adenozin /75/ 5'-OH védőcsoportját 80 %-os CH<sub>3</sub>COOH-val eltávolítva nyertem 76-vegyületet, amit szilikagél oszlopkromatográfiásan izoláltam.

74 foszfát komponens szintéziséhez 72-t p-klórfenil-foszfoditriazolidáttal /73/ vízmentes piridinben foszforileztem<sup>73</sup>, majd a reakcióelegy hidrolizise<sup>74</sup> után 74-t kloroformos extrakcióval és szilikagél oszlopkromatográfiával tisztítottam.

### 7.3. A /NB/2'p5'A/NB/2'p5'A/NB/ 78c szintézise

78c vegyület szintézisének menetét a 7.2. ábrán mutatom be. Első lépésben 76 lánczárótag és 74 foszfát komponens 1.3-szoros feleslegének piridinben végzett kapcsolásával 77a védett dimert állítottam elő. Kapcsoló ágensként triizopropil benzol szulfonil-klorid /TPSCl/ és N-metilimidazol 1:3 molarányu keverékét alkalmaztam, az Efimov által dezoxiribooligonukleotidok szintézisére kidolgozott eljárás szerint<sup>75</sup>. A 76 hidroxil komponens kvantitatív foszforilezéséhez szükséges reakcióidő 1 óra volt.





7.2. ábra



A 77a védett dimert izolálás nélkül detritileztem /2 % p-toulolszulfonsav, kloroform:metanol = 7:3, 30 perc/<sup>76</sup>, majd a szabad 5'-OH terminális dimert /77b/ szilikagél oszlopkromatográfiával izoláltam.

77b és 74 a dimer szintézisnél leirtak szerint megismételt kapcsolása szolgáltatatta 78a védett trimer vegyületet. A reakcióelegy vékonyrétegkromatográfiás analizise ez esetben 1 órás reakcióidő után még 5-10 % elreagálatlan hidroxil komponens jelenlétét mutatta.

Mivel 77b és 78a  $R_f$  értékei / $S_6$ / egymáshoz nagyon közeli, a reakcióelegy szilikagél oszlopkromatográfiája után nyert 78a trimer kevés 77b-t tartalmazott szennyezésként - aminek további eltávolítására - tekintettel arra, hogy a teljes deblokkolás utáni termékek egy foszfát disszociációval különböznek - nem törekedtem.

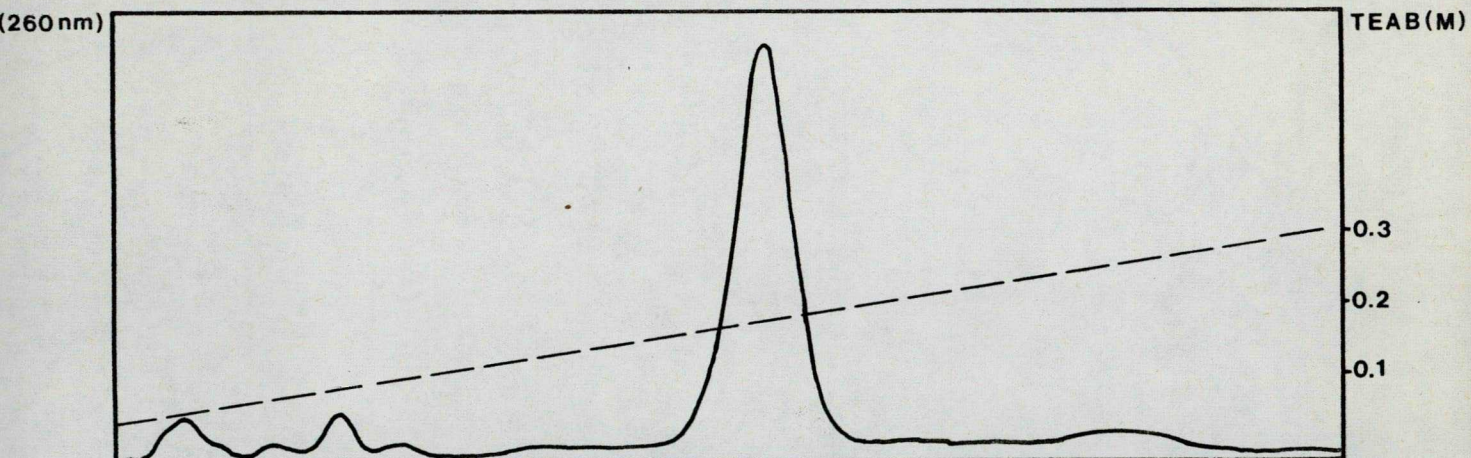
A termék p-klórfenil és benzoil csoportjainak egyidejű lehasítására a Narang által bevezetett<sup>76</sup> egyszerű eljárást választottam, 78a-t piridin cc  $NH_4OH = 1:1$  elegyben 5 órát  $60^\circ C$ -on hevitettem, majd 78b izolálása nélkül a monometoxitritil csoportot savas hidrolizissel /80 %-os  $CH_3COOH$ , 2 óra,  $20^\circ C$ / távolítottam el. 78c DE-32[ $HCO_3^-$ ] oszlopon való tisztítása után nyert termék vékonyrétegkromatográfiásan homogén volt  $S_3$ ;  $S_4$  rendszerekben /Kísérleti rész/, azonban  $S_2$  rendszerben /szilikagél/ .ButOH:EtOH:  $H_2O = 16:2:5$ / nyomnyi mennyiségű, a termékénél nagyobb  $R_f$ -vel vándorló szennyeződést tudtam kimutatni. A termék



végző tisztítását ezért preparatív vékonyrétegkromatográfiával is elvégeztem /S<sub>2</sub> rendszer/ és tiszta 78c-t liofilizett bisz-trietilammóniumsójaként 76 monomer OH komponensre vonatkoztatott 36 %-os termeléssel izoláltam.

### Szerkezetigazolás

78c enzimátikus lebontása foszfodieszteráz I enzimmal a 3'-OH szubsztituens jelenléte miatt nem lehetséges, ezért az enzimátikus hidrolízist az o-nitrobenzil csoportok fotolitikus eltávolítása után végeztem el.<sup>77</sup> A védőcsoportok teljes eltávolítása után kapott adenilil-/2'-5'/-adenilil-/2'-5'/-adenozint [79] DEAE-Sephadex oszlopon tisztítottam /7.3. ábra/.



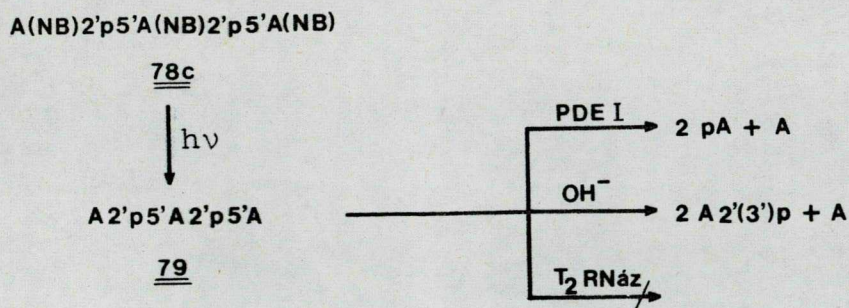
7.3. ábra. 6  $\mu\text{M}$  78c deblokkolása során nyert 79 oszlop-kromatográfiás tisztítása. Oszlop: DEAE-Sephadex [ $\text{HCO}_3^-$ ], Gradiens: 600-600 ml 0,05-0,4 M TEAB. Termelés: 4.37  $\mu\text{M}$  /72,8 %/.



79 vegyület foszfodieszteráz I enzimmel kvantitativén adenozinná és adenozin 5'-foszfáttá hidrolizált. A termékek mólaránya /pA:A = 2:1/ az enzim hasítási helyeinek ismeretében egyértelműen igazolja 79 trinukleoziddifoszfát szerkezetét.

Az interribonukleotid kötések meglétét igazolja, hogy 79 lúgos hidrolízise /0.5 M NaOH, 15 ó, 25°C/ adenozint és adenozin 2'/3'/ foszfátot adott. Az interribonukleotid kötések 2'-5' helyzetét bizonyítja, hogy 79 T<sub>2</sub> RNázal szemben - amely enzim 3'-5' interribonukleotid kötések hasít<sup>78,37</sup> rezisztensnek bizonyult.

Végül 78c <sup>31</sup>P NMR spektruma /δ:/dioxán:D<sub>2</sub>O = 2:1/ = 0.68 ppm /s/; 0.71 ppm /s// alátámasztja a deblokkolt vegyület lebontásos szerkezetigazolásával nyert eredményeket. 78c szerkezet igazolását az alábbi séma foglalja össze.





7.4. A/NB/2'p5'A/NB/2'p5'A/NB/ /78c/ foszforilezésének vizsgálata

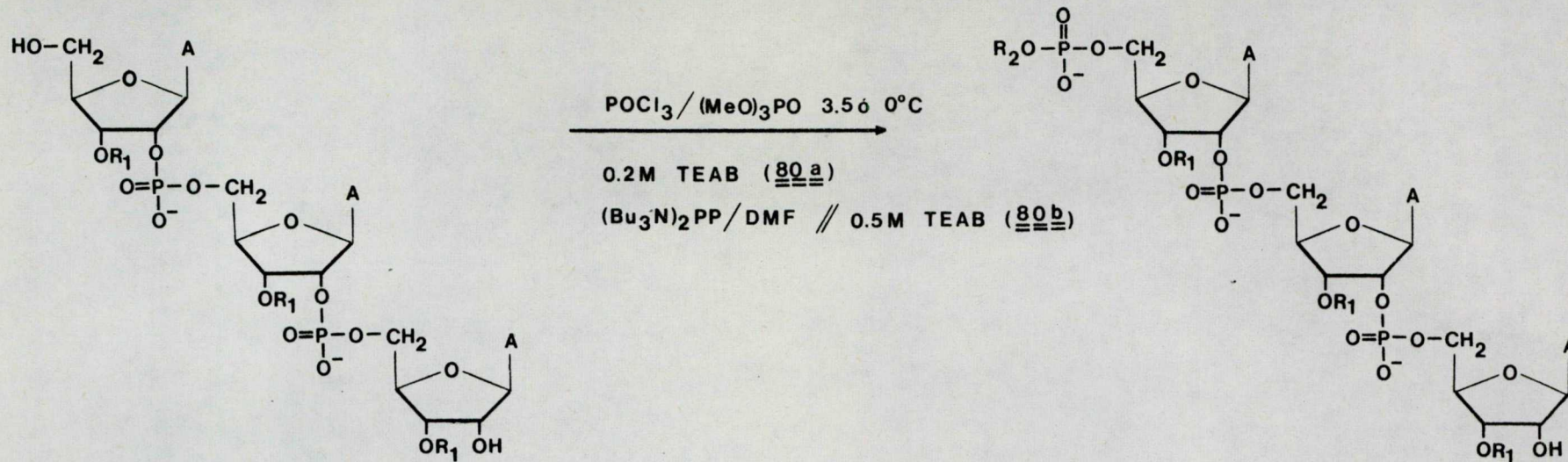
7.4.1. pA/NB/2'p5'A/NB/2'p5'A/NB/ /80a/ szintézise

Első lépésben 3'OH csoportjain o-nitrobenzil éter védőcsoportokat tartalmazó triribonukleozid difoszfát /78c/ POCl<sub>3</sub>-val való foszforilezésének optimális kísérleti körülményeit állapítottam meg. A bevezetésben említett reakciót: védetlen adenilil/2'/3'/-5'/ adenzin trietilammóniumsójának foszforilezését POCl<sub>3</sub> 27-szeres moláris feleslegével végezték. 2 órás reakció időt alkalmazva az 5'-O foszforilezett A2'p5'A-t és A3'p5'A-t 65 %-os termeléssel izolálták.

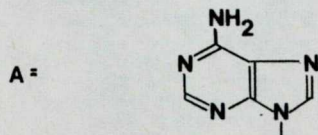
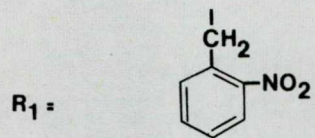
E reakciókörülményeket megnövelt feleslegű POCl<sub>3</sub>-t és hosszabb reakcióidőt alkalmazva 78c vegyület esetén is alkalmazhatónak találtam. 78c bisz trietilammóniumsóját POCl<sub>3</sub> 35-szoros moláris feleslegével trimetilfoszfátban 0°C-on foszforileztem /7.4. ábra/.

A reakció menetét a reakcióelegy 0.2 Mólós trietilammónium hidrogénkarbonát pufferral elhidrolizált mintáinak vékonyrétegekromatográfiás analízisével követtem /S<sub>3</sub> rendszerben/. 3.5 óra után a kiindulási vegyület elreagált és S<sub>3</sub> rendszerben egy a 78c-nél kisebb R<sub>f</sub>-vel vándorló termék jelent meg. A reakció terméket: 80a vegyületet DE 32[HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] oszlopon TEAB puffer lineáris gradiensével izoláltam.





78c



	$R_1$	$R_2$	$R_1$	
<u>80a</u>	NB	H	H	<u>81a</u>
<u>80b</u>	NB		H	<u>1</u>

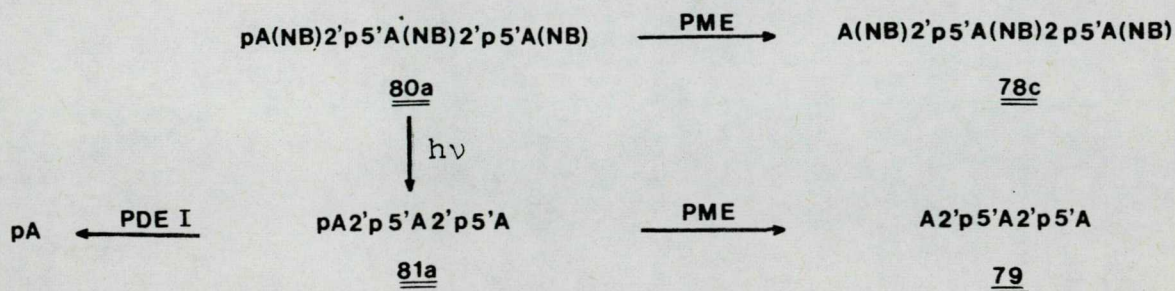
7.4. ábra



A termékben foszforsavmonoészter csoport meglétét igazolja, hogy 80a foszfomonoészterázzal kvantitativ 78c kiindulási vegyületté alakítható. Az o-nitrobenzil védőcsoportok eltávolítása után nyert 81a; 79 vegyülethez hasonlóan /7.3. ábra/ DEAE-Sephadex oszlop-kromatográfia során egyetlen csucsként eluálódott, ami arra utal, hogy izomerizáció a foszforilezés és a deblokkolás során nem következett be.

81a-ban az internukleotid kötés 2'-5' helyzetét igazolja, hogy e vegyület foszfomonoészterázzal a kiindulási 78c fotolizisekor kapott termékkel azonos vegyületté alakítható /79/ - amely T<sub>2</sub> RNÁzzal nem hidrolizálható tovább. A foszforsavmonoészter csoport helyzetére, azaz a foszforilezés szelektivitására 81a foszfodiészteráz I-vel való teljes hidrolizálhatóságából lehetett következtetni. A hidrolízis egyedüli terméke adenzin 5'-foszfát volt, míg aszelektív foszforilezés során keletkező A2'p5'A2'p5'A2'p-ből p5'A2'p-nek is kellett volna keletkeznie az enzimikus hidrolízis során.

80a szerkezetigazolását az alábbi séma foglalja össze:

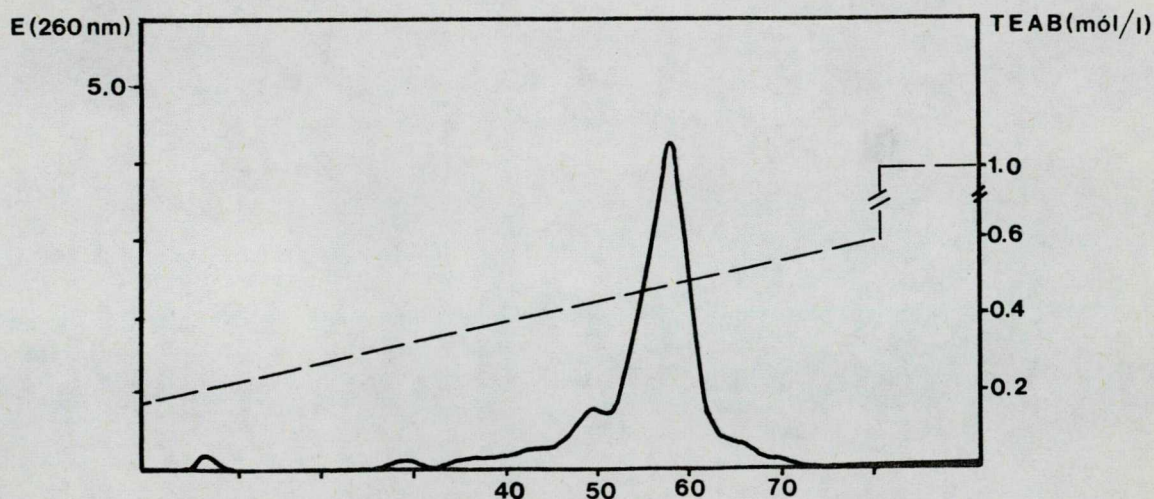




7.4.2. pppA/NB/2'p5'A/NB/2'p5'A/NB/ /80b/ és  
pppA2'p5'A2'p5'A /1/ szintézise

80b szintézisének kiindulási anyaga 80a szintéziséhez hasonlóan 78c részlegesen védett trimer volt. 78c-t  $\text{POCl}_3$ -val trimetilfoszfátban foszforileztem 80a előző fejezetben ismertetett szintézisének megfelelően /7.4. ábra/.

Az 5'-trifoszfát csoport kialakítását a foszforilezés során keletkező 5'-foszfodikloridát terminálisu trimer és tri-n-butilammónium pirofoszfát in situ reakciójával és a termékelegy ezt követő hidrolízisével végeztem az adenzin 5'-trifoszfát - 6. fejezetben ismertetett - adenzinből kiinduló egy lépéses szintézisének analógiájára. 80b-t ioncserés oszlopkromatográfiával DE-32[ $\text{HCO}_3^-$ ] oszlopon trietilammónium hidrogénkarbonát lineáris gradiensével izoláltam. A 7.5. ábra 20  $\mu\text{M}$  78c foszforilezése során nyert termékelegy oszlopkromatográfiás feldolgozását mutatja be.



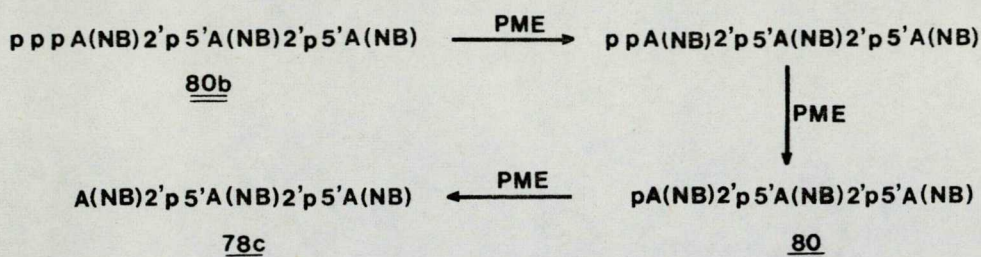
7.5. ábra. pppA/ONB/2'p5'A/ONB/2'p5'A/ONB/ izolálása. Oszlop: DE-32[ $\text{HCO}_3^-$ ] /1.5x60 cm/. Eluciós sebesség: 78 ml/óra. Frakciótérfogát: 19.5 ml. Gradiens: 1000-1000 ml 0,2-0,7 M TEAB.



52-62 frakciók vékonyrétegkromatográfiásan homogén 80b-t /12  $\mu$ Mól, 60%/ , 46-52 frakciók 80b és a 5'-difoszfát terminális trimer keverékét tartalmazták.

80b foszfomonoészterázos emésztése egyedüli UV abszorbeáló termékként a kiindulási 78c-t adta. /A felhasznált foszfomonoészteráz: Escherichia coli alkálikus foszfatáz a P-O-P/O//OH/2 pirofoszfát kötést is elhasítja/<sup>79</sup>.

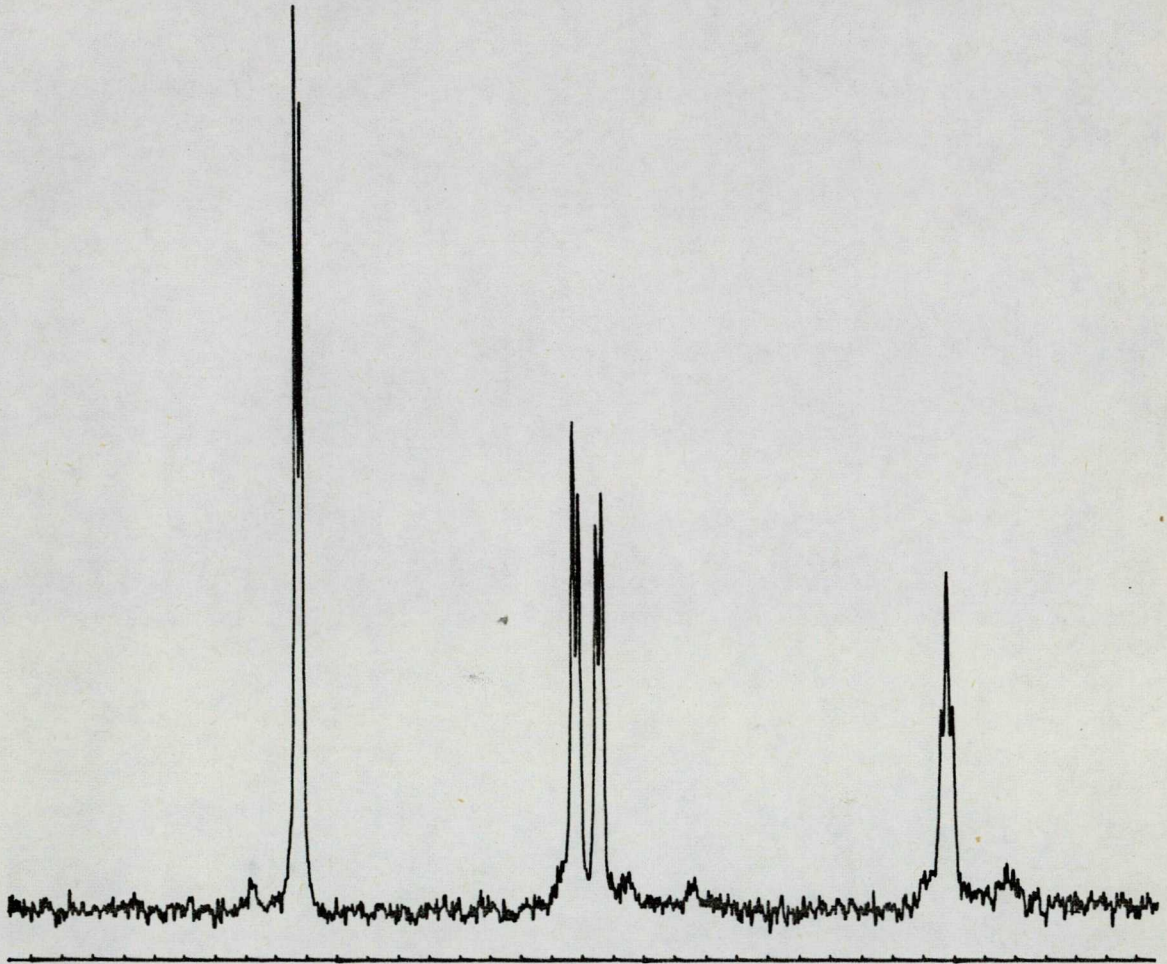
A foszfomonoészterázos emésztés vékonyrétegkromatográfiás követésével /S<sub>3</sub> rendszer/ kimutattam, hogy a 78c-hez vezető hidrolízis két intermedieren keresztül haladt, melyek közül az apolárosabb termék 80a; 5'-monofoszfáttal azonos.



E reakció során nyert ppA/NB/2'p5'A/NB/2'p3'A/NB/ szolgált az elució 47-52 frakcióinak azonosításához.



80b 5'-trifoszfát csoportjának meglétét egyértelműen e vegyület  $^{31}\text{P}$  NMR spektrum igazolja /7.6. ábra/.<sup>37</sup>

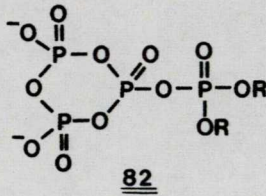


7.6. ábra. 80b  $^{31}\text{P}$  NMR spektruma.  $\delta$  /ppm/ /dioxán:  $\text{D}_2\text{O}=2:1/=$   
0.30 /s/; 0.13 /s/; -8,83 /d/,  $J = 18.4 \text{ Hz}$  / $\text{P}^\gamma$ //;  
-9,58 /d/,  $J = 18.9 \text{ Hz}$  / $\text{P}^\alpha$ /; -20.80 /t/  $J = 19.2 \text{ Hz}$   
/ $\text{P}^\beta$ /.

Az internukleotid kötések foszforileződése során létrejövő vegyes anhidrid /66b  $\text{R}_1 = \text{ONB}$ / és a pirofoszfát anion reakciójából levezethető 82 vegyület a foszforsav diészter -



foszforsav vegyes anhidridek ismert hidrolizis érzékenysé-  
ségevel összhangban<sup>80</sup> - a termékelegy feldolgozása során  
az internukleotid kötés regenerálódása közben elbomlik.



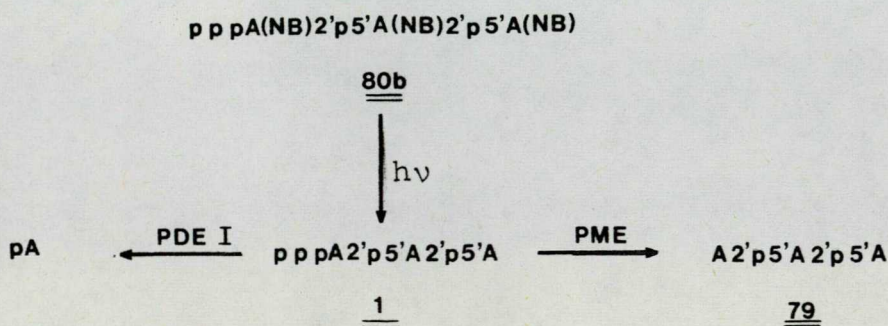
80b <sup>31</sup>P NMR spektrumában a 0.30 és 0.13 ppm-nél jelentkező  
két jel szubsztituálatlan internukleotid kötések jelenlé-  
tét igazolja.

80b o-nitrobenzil csoportjainak fotolitikus eltávolí-  
tása során nyert terméket /1/ DEAE-Sephadex oszlopon  
TEAB lineáris gradiensével izoláltam.

1 5'-trifoszfátcsoportjának megléte a védett 80b <sup>31</sup>P NMR  
spektrumából következik. /Az 5'-trifoszfát terminális a  
fotolizis körülményei során nem változik/.

1 foszfodiészteráz I-vel végzett hidrolizisének egyetlen  
UV abszorbeáló terméke adenzin 5'-foszfát. Ez a kísérlet  
igazolja, hogy nem történt bázis modifikáció az 5'-tri-  
foszfát terminális kiépítése során.

1 internukleotid kötéseinek 2'-5' helyzetét igazolja,  
hogy a foszfomonoészterázos emésztés után a T<sub>2</sub>RNÁzzal  
szemben rezisztens 79-vegyület keletkezik.





1 vegyület szerkezetének közvetett igazolását jelentik az elvégzett biológiai kísérletek eredményei. 1 kalciumfoszfátos koprecipitációs technikával BHK sejtbe juttatva  $10^{-7}$  M-os koncentrációban a Sindbis-virus szaporodását 70 %-osan gátolta - ami 1 gátló hatására közölt irodalmi értékkel megegyezik.<sup>9</sup>

#### 7.4.2.1. Az eljárás értékelése

5'-O-trifoszforil-adenilil-/2'-5' /-adenilil-/2'-5' /-adenozin /1/ előző fejezetben ismertetett szintézise során a  $P^{\alpha}\text{-O-C}^{5'}$  kötés kiépítése a trimer molekulán történik és a foszforilezés elsődleges termékeként keletkező 5'-foszfodikloridát terminális intermedier szolgál a trifoszfát csoport kiépítésének kiindulási anyagaként - tehát e szintézis a 3. fejezetben választott csoportosítás szerint az A.2. csoportba tartozik.

Az ugyancsak e csoportba tartozó 22 foszforilező ágenssel szemben ez esetben az egyszerű foszforilkloriddal történik az aktivált 5'-foszfát csoport kiépítése és a  $P^{\alpha}\text{-O-C}^{5'}$  valamint a  $P^{\alpha}\text{-O-P}^{\beta}$  kötések együttesen 60 %-os hozammal alakíthatók ki, szemben a 22 alkalmazásával elért 25 %-os termeléssel.

Az eljárás preparatív szempontból az o-nitrobenzil védőcsoportok hidrogenolitikus eltávolításával egyszerűsíthető.





## 8. Az eredmények összefoglalása

A Yoshikawa reakció - azaz nem védett nukleozidok  $\text{POCl}_3$ -val trialkilfoszfátokban történő foszforilezése - főtermékeként keletkező nukleozid 5'-foszfodikloridátok hidrolitikus bontása nukleozid 5'-foszfátok előállítására széleskörűen használt: mind természetes mind módosított szerkezetű nukleozidok foszforilezésére alkalmas eljárás. Munkámban az e foszforilezési módszer primer termékeként keletkező nukleozid 5'-foszfodikloridátok szintetikus felhasználásának néhány lehetőségét vizsgáltam.

1./ A foszforilezés primer termékelegyenek ammonolízisével és az így kapott nukleozid 5'-foszfodiamidátok és 3'-foszfodiamidátok kromatográfiás elválasztásával a foszforilezés szelektivitásának vizsgálatát végeztem el 5-Fluoro és 5-Alkil dezoxiuridin származékok, 2'-dezoxiadenozin és 3'-dezoxiadenozin esetében.

Módszert dolgoztam ki 5-Fluoro és 5-Alkil 2'-dezoxiuridin 5'-foszfátoknak a megfelelő 5-foszfodiamidátokon keresztül történő előállítására.

2./ Adenozin, 2'-dezoxiadenozin és 3'-dezoxiadenozin esetében igazoltam, hogy a nukleozid 5'-foszfodikloridátok a megfelelő nukleozid 5'-trifoszfátok szintézisének alkalmas kiindulási anyagai - így lehetővé vált egy nukleozidból kiinduló egyszerű, jó hozamu nukleozid 5'-trifoszfát szintézis kidolgozása.



3./ Fenti módszer oligoribonukleotidok foszforilezésére való kiterjesztésével - egy az interferon hatásmechanizmusában kulcsszerepet játszó természetes vegyület: 5'-O-trifoszforiladenilil /2'-5'/ adenilil /2'-5'/ adenzin /pppA2'p5'A2'p5'A/ szintézisét végeztem el.



## 9. KISÉRLETI RÉSZ

### Anyagok:

A nukleozidokat felhasználás előtt 110 °C-on csökkentett nyomáson foszforpentoxid felett 4-6 órát szárítottam. Adenozin, 2'-deoxiadenozin; 2'-deoxiuridin, timidin, 5-fluor-2'-deoxiuridin kereskedelmi termékek /Sigma/ voltak.

A 3'-deoxiadenozint irodalmi eljárás alapján<sup>81</sup> szintetizáltam, az 5-izopropil-2'-deoxiuridint a Központi Kémiai Kutatóintézet Nukleotid Kémiai Kutató csoportjában állították elő.

A foszforil kloridot; trimetilfoszfátot, morfolint 1 Hgmm nyomáson desztilláltam. A dimetilformamidot és a piridint foszforpentoxidról történő desztillációval vízmentesítettem. Az abszolútizált oldószereket molekulaszintén /4 Å/ tároltam.

A benzoil klorid /Lachema-Brno/, hidrazinhidrát /Carlo Erba/, p-toulol szulfonsav klorid /Reanal/, o-nitrobenzaldehyd /Merck/, 1,2,4-Triazol /Fluka/, N-metilimidazol /EGA/, triizopropilbenzol-szulfonsav klorid /Fluka/, monometoxitritil klorid /EGA/ - kereskedelmi termékek voltak. A p-klórphenil foszfodikloridát irodalmi eljárás szerint készült<sup>76</sup>.

A szerkezetigazolásokhoz felhasznált enzimek:  
Escherichia coli alkalikus foszfatáz /EC 3.1.3.1/, T<sub>2</sub>  
Ribonukleáz /EC 2.7.7.17/, Foszfodiészteráz I /EC 3.1.4.1/



/Sigma/, az oszlopkromatográfiás ioncserélők: DOWEX 1x8, 200-400 mesh /Serva/, DOWEX 50x8, 200-400 mesh /Serva/, DEAE cellulóz, DE-32 /Whatman/, DEAE-Sephadex A-25 /Sigma/, megoszlásos kromatográfiához használt hordozó: cellulóz CC 31 /Whatman/, az adszorpciós kromatográfiához használt szilikagél: Kieselgel 60, 40-63  $\mu$  /Merck/ kereskedelmi termékek voltak.

#### Módszerek:

Az oldatok bepárlását 1 Hgmm nyomáson 30 °C-os vízfürdőről rotációs bepárlón /Rotavapor, Büchi/ végeztem. Az oszlopkromatográfiás elválasztások nyomonkövetése az anyagok UV fényelnyelése alapján /Spektromom 303/, illetve az egyes frakciók vékonyrétegkromatográfiás analízise alapján történt.

Az abszorpciós spektrumokat Cary-15 spektrofotométeren regisztráltam. A  $^{31}\text{P}$  NMR spektrumok felvétele JEOL FX 60 spektrométeren /55-58 vegyületek/, illetve Bruker-250 FT spektrométeren történt /78c, 80b vegyületek/ 24,2 MHz, illetve 101,2 MHz frekvencián. A megadott kémiai eltolódások 85 %-os  $\text{H}_3\text{PO}_4$  külső standardra vonatkoznak.

Az o-nitrobenzil védőcsoportokat tartalmazó vegyületekkel csökkentett megvilágítás mellett dolgoztam.

Az anorganikus foszfát meghatározását Eibl és Lands módszere szerint végeztem<sup>83</sup>.



Az enzimatis hidroliziseket a vizsgált anyagok 50 n móljával végeztem /37°C, 2 ó/. Az alkalikus foszfatázt /0.1 egység/ 10 µl 0.5 M /NH<sub>4</sub>/<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> oldatban /pH = 9.5/, a foszfodieszteráz I-t /0.1 egység/ 10 µl 0.1 M nátrium-karbonát - nátriumhidrogén karbonát pufferben /pH = 10.4/ a T<sub>2</sub> ribonukleázt /5 egység/ 0.1 M ammóniumacetát /pH = 4.5/ pufferban alkalmaztam. Az enzimatis hidrolizisek termékeit autentikus kontrollanyagokkal /Sigma/ való vékonyrétegkromatográfiás összehasonlítással azonosítottam.

A vékonyrétegkromatográfiás vizsgálatokat saját készítésű cellulóz: szilikagél = 8:2 rétegeken, szilikagél készrétegeken /Silica Gel 60 F<sub>254</sub>, Merck/, cellulóz készrétegeken /cellulóz F<sub>254</sub>, Merck/ és PEI cellulóz anioncserélő készrétegeken /Polygram Cel 300 PEI/UV<sub>254</sub>, Macherey-Nagel/ végeztem. A rétegeken az anyagokat UV-fényelnyelésük alapján 254 nm hullámhosszúságú fényben /Desaga UVIS/ detektáltam.

Az alkalmazott kromatográfiás rendszerek:

- S<sub>1</sub> : n.butanol:etanol:0.1 M TEAB = 16:2:5 /cellulóz-szilikagél = 8:2/
- S<sub>2</sub> : n.butanol:etanol:H<sub>2</sub>O = 16:2:5/szilikagél
- S<sub>3</sub> : n-propanol:ccNH<sub>4</sub>OH:H<sub>2</sub>O = 11:7:2/szilikagél
- S<sub>4</sub> : n.butanol:ecetsav:H<sub>2</sub>O = 5:3:2/cellulóz
- S<sub>5</sub> : kloroform:etanol = 10:1/szilikagél
- S<sub>6</sub> : kloroform:etanol = 97:3/szilikagél
- S<sub>7</sub> : etanol:1 M ammóniumacetát = 5:2/szilikagél
- S<sub>8</sub> : kloroform:metanol = 8:2/szilikagél



S<sub>9</sub> : 0.25 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>/PEI

S<sub>10</sub>: 0.3 M NaCl /PEI

S<sub>11</sub>: 0.5 M NaCl/PEI

S<sub>12</sub>: 1.5 M NaCl/PEI

S<sub>13</sub>: tel. /NH<sub>4</sub>/<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:1 M nátriumacetát:i.propanol = 80:18:2/  
/cellulóz-szilikagél = 8:2

S<sub>14</sub>: n.propanol:ccNH<sub>4</sub>OH:H<sub>2</sub>O = 11:7:2/cellulóz-szilikagél =  
8:2

Az R<sub>f</sub> értékeket az 5.1 és 9.1 táblázat foglalja össze.

Az ioncserés oszlopkromatográfiás elválasztásoknál használt trietilammónium-hidrogénkarbonát, pH = 7.5 puffer<sup>83</sup> szerint készült.







---

Vegyület száma	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>9</sub>	S <sub>10</sub>	S <sub>11</sub>	S <sub>12</sub>	S <sub>13</sub>	S <sub>14</sub>
<u>1</u>		0.31						0.10					
A2' / 3' / p											0.39		
											0.28		
ppA		0.16						0.31					
ppA2' p5'-													
-A2' p5' A		0.35						0.24					

---



5-Fluoro-2'-deoxiuridin 5'-foszfodiamidát /55a/

54a /246 mg, 1 mmól/ jól kevertetett trimetilfoszfátos oldatához /2.5 ml/ 0°C-on frissen desztillált foszforil kloridot 10.2 ml 2.2. mmól adtam. A kevertetést 0°C-on 24 órát folytattam, majd 7.0 M-os ammónium-hidroxid oldatot /10 ml/ adtam a reakcióelegyhez és az oldatot szárazra pároltam.

A párlási maradékot deszt. vizben oldottam és az oldatot DEAE-cellulóz [ $\text{HCO}_3^-$ ] oszlopon /1.6x53 cm/ bocsátottam át /eluciós sebesség 20 ml/perc/frakció/.

54-57a vegyületek keveréke 10-30 frakció között eluálódott. E frakciókat egyesítettem és szárazra pároltam. A párlási maradékot n. butanol/etanol/0.1 M trietilammónium hidrogénkarbonát, pH = 7.5 16:2:5 elegyével ekvilibrált cellulóz /Whatmann CC-31/ oszlopra vittem fel. Az eluciót ugyanezen szolvenssel végeztem /eluciós sebesség: 4.5 ml/ 20 perc/frakció/.

54a 12-31 frakciókban; 56a 42-50 frakciókban; 55a 52-80 frakciókban és 57a 124-160 frakciókban eluálódott.

A termékelegy összetételét az 5.1. táblázatban tüntettem fel. A megfelelő frakciók bepárlása után az anyagok sómentesítését vízzel való ismételt bepárlással végeztem el.

$^{31}\text{P}$  NMR / $\text{D}_2\text{O}$ , pD = 7.0/ $\text{H}_3\text{PO}_4$ /:

$\delta$  = 20.61 /55a/; 19,79 /56a/; 19.79 és 20.24 ppm /két egyenlő intenzitású jel /57a/

12 órás állás után /pD = 1.0/ a hidrolizis termékek spektrumai:



$^{31}\text{P}$  NMR / $\text{D}_2\text{O}$ , pD = 1.0/ $\text{H}_3\text{PO}_4$ /

$\delta$  = -0.16 /55a/; -0.89 /56a/; -0.26 és -0.93 ppm /két egyenlő intenzitású jel /57a/

5-Fluoro-2'-dezoxiuridin 5'-foszfát /58a/

Az előző folyamat során nyert 55a-t /0.45 mmól/  
50 %-os vizes ecetsavban /45 ml/ oldottam és az oldatot  
50 °C-on 5 órát tartottam, majd szárazra pároltam.  
Az ecetsav nyomokat vízzel való ismételt bepárlással  
távolítottam el. A párlási maradékot deszt.vizben oldottam,  
majd DEAE-cellulóz [ $\text{HCO}_3^-$ ] oszlopra /1.6x53.0 cm/ kötöttem  
fel. Az eluciót viz és 0.2 M trietilammónium hidrogén-  
karbonát oldat lineáris gradiensével végeztem.  
/2000 ml, eluciós sebesség: 20 ml/20 perc/frakció/.  
A legnagyobb intenzitású, 0.15 M puffer koncentrációnál  
eluálódó csucst bepároltam, majd az anyagot vízzel való  
ismételt bepárlással sómentesítettem.  
A párlási maradékot vízben /1 ml/-ben oldottam.  
Az oldat liofilezése után 58a-t /0.231 g, 97 %/ bis-  
-triethylammóniumsóként izoláltam.  
 $^{31}\text{P}$  NMR / $\text{D}_2\text{O}$ , pD = 1.0/ $\text{H}_3\text{PO}_4$ /:  $\delta$  = -0.26 ppm.



2'-dezoxinukleozid 5'-foszfodiamidátok /55b, 55c, 55d/

E vegyületek szintézisét 54b /0.5 mmól/, 54c /1 mmól/ és 54d /0.1 mmól/-ből kiindulva az 55a vegyület szintézisének leirtak szerint végeztem el. 54b és 54c esetén a foszforilezés reakcióideje 7 óra volt. A termékelegyek összetételét az 5.1. táblázatban tüntettem fel.

2'-dezoxinukleozid 5'-foszfátok /58b, 58c, 58d/

E vegyületek szintézisét 55b-c-ből kiindulva 58a szintézisének leirtak szerint végeztem el.

Termelések: 58b: 0.133 g /93 %/, 58c: 0.260 g /95 %/

58d: 0.023 g /95 %/

$^{31}\text{P}$  NMR / $\text{D}_2\text{O}$ , pD = 1,0 / $\text{H}_3\text{PO}_4$ /:  $\delta$  = -0.22 /58b/, -0.28 /58c/, -0.30 ppm /58d/.



Bisz-tri-n-butylammónium pirofoszfát /0.5 M-os oldat  
DMF-ben/

$\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  /2.23 g; 5 mmól/ vizes oldatát /50 ml/ DOWEX 50x8 [ $\text{H}^+$ ] gyantával feltöltött oszlopon /30 ml/ csurgattam át. /V = 60 ml/ó/; majd az oszlopot desztillált vízzel /70 ml/ semlegesre mostam. Az oszlopról lejöő oldatot etilalkohol /20 ml/ és tri-n-butylamin /2.38 ml; 10 mmól/ keverékébe csepegtettem; a szedő edényt jeges vízzel hűtöttem. Bepárlás után az olajos párlási maradékot etilalkohollal /2x30 ml/ és DMF-vel végzett együttes bepárlással vízmentesítettem.

A párlási maradékot DMF-ben oldottam és 10 ml-es mérőlombikban jelig töltöttem. Az oldatot molekulaszita /4 Å/ felett tároltam.

Adenozin 5'-trifoszfát /62a/

59\_a-t /53.44 mg, 0.2 mmól/ trimetilfoszfátban /0.5 ml/ szuszpendáltam, majd jeges vizes fürdőben  $0^\circ\text{C}$ -ra hűtöttem /30 perc/. Foszforil kloridot /24  $\mu\text{l}$ ; 0.264 mmól/ adtam a reakcióelegyhez és a kevertetést  $0^\circ\text{C}$ -on 1.5 órát folytattam.

Az intenzíven kevertetett reakcióelegybe 0.5 M-os bisz-tri-n-butylammónium pirofoszfát dimetilformamidos oldatának /2 ml/ és tri-n-butyl amin /200  $\mu\text{l}$ / keverékét pipetáztam, majd 1 perc állás után a reakcióelegyet 1 M-os



triethylammónium hidrogénkarbonát oldatra öntöttem /5 ml/. Az oldatot szobahőmérsékleten 20 percet kevertettem, majd bepároltam és a bepárlás megismétlésével TEAB mentesítettem. A párlási maradékot desztillált vízben /10 ml/ feloldottam és a DE-32[HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] oszlopra kötöttem /1.5x60 cm/.

Az eluciót 1000 ml víz és 1000 ml 0.4 M-os TEAB lineáris gradiensevel végeztem /6.2. ábra, A./Átfolyási sebesség: 60 ml/ó, frakció térfogat: 19 ml/.

A 66-85 frakciókban eluálódó kromatográfiásan homogén /S<sub>3</sub>/ 62a-t tartalmazó frakciókat egyesítettem és szárazra pároltam.

Termelés 2550 OD/260 nm /86 %/.

3'-deoxiadenozin-5'-trifoszfát 62c és 2'-deoxiadenozin-5'-trifoszfát 62b

62c és 62b előállítását, 59c-ből, illetve 59b-ből kiindulva a 62a-nál leírtak szerint végeztem el. 59b foszforilezését -20 °C-on 2 órás reakcióidőt alkalmazva végeztem. A termékelemek összetételét a 6.2. ábrán tüntettem fel.

P<sup>3</sup>-morfolino-P<sup>1</sup>-[adenozin-5'-trifoszfát] /63a/

59a-t /53.44 mg, 0,2 mmól/ trimetilfoszfátban /0.5 ml/ szuszpendáltam, majd jeges vízben 0 °C-ra hűtöttem. Foszforil kloridot /24 µl, 0.264 mmól/ adtam a reakcióelegyhez és a kevertetést CaCl<sub>2</sub>-os csővel lezárt lombikban 0 °C-on 1.5 órát folytattam. Az intenzíven kevertetett reakció-



elegybe 0.5 M-os bisz-tri-n-butilammónium pirofoszfát dimetilformamidos oldatának /2 ml/ és tri-n-butilamin /200 µl/ keverékét pipettáztam, majd 1 perc állás után a reakcióelegyhez morfolint /348 µl, 4 mmól/ adtam. A keletkező csapadékos oldatot 10 percig kevertettem, majd 1 M TEAB hozzáadása után /4 ml/ szárazra pároltam. A bepárlást metanol /2x10 ml/ hozzáadásával megismételtem, majd a reakcióelegy vizes oldatát /10 ml/ DOWEX 1x8 [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] oszlopra kötöttem. Az eluciót 1000 ml H<sub>2</sub>O és 100 ml 1 M TEAB lineáris gradiensével végeztem. 63a 0.85 - 0.92 M pufferkoncentrációnál eluálódott. A megfelelő frakciókat egyesítettem és bepároltam. Termelés 2457 OD/260 nm /82.5%/.



N<sup>6</sup>-benzoil adenzin /68/

Piridinben /60 ml/ szuszpendált adenzinhez /5.04 g, 20 mmól/ jeges vizes hűtés és kevertetés közben benzoil-kloridot /16 ml, 138 mmól/ adtam. A reakcióelegyet 20 órát kevertettem, majd jeges vízre /1200 ml/ öntöttem. A keletkezett fehér csapadékot kloroformba /3x400 ml/ ráztam át. A kloroformos fázist vízzel /2x200 ml/ mostam, majd nátriumszulfáton szárítottam és bepároltam. A reakcióelegy vékonyrétegkromatográfiás ellenőrzése /Benzol:Éter = 1:1, szilikagél/ egységes termékként /R<sub>f</sub> = 0.8/ N,N,O<sup>2'</sup>,O<sup>3'</sup>, -O<sup>5'</sup>-pentabenzoil adenzin keletkezését mutatta. A párlási maradékot 40 ml piridinben feloldottam, majd további 60 ml etilalkoholt adtam. A homogén oldathoz 2.0 N nátrium-hidroxid/etilalkohol elegyét /160 ml/ öntöttem, intenzív kevertetés közben. 7 perc után a reakcióelegyet Dowex 50x8 /piridinium/ gyantával semlegesítettem. A gyantát leszűrtem és 20 %-os vizes piridinnel mostam. Az oldatot szárazra pároltam. A párlási maradékot etilalkoholból /800 ml/ átkristályosítottam. 20 órás hűtőszekrényben való állás után a kivált szintelen kristályokat nuccsoltam, éterrel /200 ml/ mostam és csökkentett nyomáson foszforpentoxid felett szárítottam.

A kromatográfiásan homogén, benzoésav mentes termék sulya: 4,98 g. Termelés: 67 %.



O-Nitrobenzaldehyd-tozilhidrazon

O-nitrobenzaldehyd /7.83 g, 51.6 mmól/ metanolban /15.6 ml/ készült oldatához jeges hűtés és kevertetés közben metanolban /4.7 ml/ oldott tozilhidrazidot /9.79 g, 52,4 mmól/ adtam. A reakcióelegyet 30 percet kevertettem, majd 1 órára  $-20^{\circ}\text{C}$ -ra hűtöttem le. A kivált halványsárga kristályokat nuccsoltam, hideg metanollal /30 ml/ mostam és csökkentett nyomáson, foszforpentoxid felett szárítottam. Termelés: 14.7 g /90 %/.

O-nitrofenil diazometán /69/

O-nitrobenzaldehyd-tozilhidrazont /19,2 g, 60 mmól/ 2.0 M nátriumhidroxidban /60 ml/ feloldottam, majd a sötét-piros oldatot 3 órán keresztül szobahőmérsékleten állni hagytam. A kivált narancssárga kristályokat leszivattam, vízzel /10 ml/ mostam, majd a nuccsnedves anyagot kloroformban /80 ml/ feloldtam. Az anyagban maradt víz a kloroformtól elvált. A fázisokat elválasztottam. A kloroformos fázist kb. 3-5 ml térfogatra bepárooltam. Az így kapott oldatot azonnal felhasználtam  $\text{N}^6$ -benzoiladenozin alkilezéséhez.

$\text{N}^6$ -benzoil-3'-O-/o-nitrobenzil/-adenozin /70/ és

$\text{N}^6$ -benzoil-2'-O-/o-nitrobenzil/-adenozin /71/

$\text{N}^6$ -benzoiladenozint /68/ /4.0 g, 10.77 mmól/ és  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -t /192 mg, 0,85 mmól dimetilformamidban



/110 ml/ oldottam, majd az o-nitrobenziltozilhidra-  
zonból /19.2 g, 60 mmól/ frissen készített o-nitro-  
fenildiazometán kloroformos oldatát /3 ml/ adtam hozzá.  
A reakcióelegyet, sötétben 22 órát 45<sup>o</sup>-on tartottam.  
A reakció menetét vékonyrétegekromatográfiásan követtem  
/szilikagél, kloroform/etanol = 20/1/. 22 óra után a  
kiindulási /68/ már csak nyomokban volt jelen. A reak-  
cióelegy fő komponensként /70/-t és a vele izomer  
/71/-t tartalmazta. Az alkilező ágens feleslegét mono-  
klór ecetsav /360 mg/ metanolban készült /10 ml/ olda-  
tával elbontottam, majd bepárlás; /40<sup>o</sup>/ után az olajos  
párlási maradékot piridinben /10 ml/ oldottam fel, és az  
oldatot n. hexánba csepegtettem /600 ml/. A hexánt  
dekantáltam, az olajos piridines oldatot szárazra párol-  
tam és toulollal /30-30 ml/ való többszöri koevaporációval  
piridinmentesítettem. A párlási maradékot 10 ml diklórmetán-  
ban feloldottam és szilikagél oszlopra vittem. /Kieselgel  
200, 24x4 cm/. Diklórmetános mosás /1000 ml/ után /70/  
és /71/ keverékét 4 % etilalkohol tartalmu diklórmetánnal  
eluáltam. A megfelelő frakciókat egyesítettem és az olda-  
tot etilalkohol /20 ml/ hozzáadása után bepároltam. A  
párlási maradék halványsárga hab, amit 100 ml etanol-  
mentes kloroformban feloldottam. Hűtőszekrényben való  
állítás /20 óra/ után a kiváló fehér kristályokat, leszűrtem  
majd n.hexánnal mostam. Az anyalugot 50 ml-re való bepár-  
lás után újra kristályosítottam. Termelés: /1,25 g, 23 %/.



Az anyag izomer mentességét vékonyrétegkromatográfiásan, /R<sub>f</sub> táblázat/ ellenőriztem.

Az anyalug ismételt oszlopkromatográfiával izomermentes 71-t tudtam előállítani.

<sup>1</sup>H NMR DMSO-d<sub>6</sub>: 70 δ = 6.25 /H'<sub>1</sub>/ J<sub>1',2'</sub> = 6 Hz

71 δ = 6.15 /H'<sub>1</sub>/ J<sub>1',2'</sub> = 6 Hz

Irodalmi érték<sup>72</sup>:

70 δ = 6.25 /H'<sub>1</sub>/ J<sub>1',2'</sub> = 6 Hz

71 δ = 6.12 /H'<sub>1</sub>/ J<sub>1',2'</sub> = 6 Hz

N<sup>6</sup>-Benzoil-3'-O-/o-nitrobenzil/-5'-monometoxitritil  
adenozin /72/

N<sup>6</sup>-Benzoil-3'-O-/o-nitrobenzil/-adenozin /70/ /0.99 g, 1.95 mmól/ piridines oldatához /14 ml/ monometoxitritil kloridot /1.04 g, 3.37 mmól/ adtam, és a reakcióelegyet 16 órát 20<sup>o</sup>C-on tartottam. Ezután etilalkoholt /40 ml/ adtam hozzá és 30 perc állás után bepároltam. A bepárlást kloroform-toulool elegyben való oldás után többször megismételtem és az ily módon piridinmentesített párlási maradékot kloroformban /50 ml/ oldottam és szilikagél oszlopra vittem /Kieselgel 60, 40 g/.

A terméket kloroform:etanol = 20:1 szolvenssel eluáltam. A termék 900-1000 ml eluens térfogatnál jött le az oszlopról. A megfelelő frakciókat összeöntöttem és bepároltam. A kapott fehér hab súlya 1.32 g /86.7 %/.



N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>,2'-O-tribenzoil-3'-O-/o-nitrobenzoil/-adenozin /76/

N<sup>6</sup>-benzoil-3'-O-/o-nitrobenzil/-5'-O-monometoxitritil-adenozint /72/ /0.388 g, 0.5 mmól/ feloldottam piridinben /970 ml/, majd benzoilkloridot /232 ml, 2.25 mmól/ adtam hozzá. A reakció menetét vékonyrétegkromatográfiásan követtem. 3.5 óra után a reakcióelegy /R<sub>F</sub> 1,5 % EtOH : CHCl<sub>3</sub> = 0.760/ egyetlen tritil pozitív termékeket tartalmazott /75/. A reakciót metanol /3 ml/ hozzáadásával állítottam le, majd 1 óra állás után szárazra pároltam. A bepárlást kloroform-benzol elegyben való oldás után többször megismételtem, majd az ily módon piridinmentesített párlási maradékot kloroformban /3 ml/ oldottam és 20 ml 80 %-os ecetsavat adtam hozzá. 3 óra állás után az oldatot szárazra pároltam és metanol-kloroform eleggyel megismételt bepárlással eltávolítottam az ecetsav maradékát. A párlási maradékot kloroformban /5 ml/ feloldottam és szilikagél oszlopra kötöttem fel /Kieselgel 60, 40 g/. Az oszlopot kloroformmal mostam /5000 ml/, majd a terméket kloroform:metanol = 50:1 szolvenssel eluáltam. Az egyesített frakciókat szárazra pároltam. Termelés:  $E_{260 \text{ nm}}^{\text{EtOH}} = 9040 \text{ OD. /90,4 \%/.}$

N<sup>6</sup>-benzoil-3'-O-/o-nitrobenzil/-5'-O-monometoxitritil-adenozin-2'-foszfát-p-klórphenilészter trietilammónium-só /74/

A. Foszforsav-p-klórphenilészter-dikloridot /480.6 µl, 3.0 mmól/ absz. piridinben /8.2 ml/ oldottam keverés



közben, majd 1,2,4-triazolt /464 mg, 6.75 mmól/ adtam a reakcióelegyhez és a kevertetést szobahőmérsékleten kalciumkloridos csővel lezárt lombikban 30 percet folytattam.

B. N<sup>6</sup>-benzoil-3'-O-/o-nitrobenzil/-5'-O-monometoxitritil-adenozint /72/ /1.168 g, 1.5 mM/ absz. piridinben /10 ml/ oldottam és az oldatot szárazra pároltam. A párlási maradékot absz. piridinben /7.5 ml/ oldottam és az oldatot az A./ pontban leirt módon előkészített foszforilező ágenshez adtam.

A reakció menetét 10 % etilalkohol-kloroform rendszerben, szilikagél rétegen követtem. 30 perc után 15 ml piridin 5.1 ml trietilamin és 1.5 ml viz elegyének hozzáadásával állítottam le a reakciót, majd 10 perc állás után telített Nátriumhidrogénkarbonát vizes oldatára /100 ml/ öntöttem a reakcióelegyet. Kloroformmal /2x100 ml/ extraháltam, majd a kloroformos fázist telített nátriumhidrogénkarbonát oldattal /2x100 ml/ mostam, nátriumsulfáton szárítottam és toulol /20 ml/ hozzáadása után szárazra pároltam.

A párlási maradékot diklórmetánban /10 ml/ oldottam és szilikagél oszlopra /Kieselgel 60, 30 g/ vittem. A terméket 10 % etilalkohol-diklórmetán szolvenssel eluáltam. A megfelelő frakciókat bepároltam, és 74-t fehér szilárd habként izoláltam. Termelés: 1.16 g /72 %/.



N<sup>6</sup>-benzoil-3'-O-/o-nitrobenzil/-5'-O-monometoxitritil-  
-adenilil-/2'-5'/-N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>,2'-O-tribenzoil-3'-O-/o-nitro-  
benzil/-adenozin-p-klórfenilészter /77a/ és  
N<sup>6</sup>-benzoil-3'-O-/o-nitrobenzil/-adenilil-/2'-5'/-  
-N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>,2'-O-tribenzoil-3'-O-/o-nitrobenzil/-adenozin-  
-p-klórfenilészter /77b/

A kapcsolási reakció foszfát komponensének /74/  
/643.2 mg, 600 µM/ és hidroxil komponensének /76/  
/356.5 mg, 500 µM/ absz. piridines oldatát /10 ml/  
szárazra pároltam. A fehér habszerű párlási maradékot  
absz. piridinben /5 ml/ oldottam, majd az oldathoz  
TPSCI-t /454.2 mg, 1,5 mM/ és N-metilimidazolt /246  
µl, 3 mM/ adtam. A homogén oldatot 1 órát állni hagy-  
tam, majd hűtés közben vizre /15 ml/ öntöttem. A fehér  
csapadékos oldatot bepároltam, majd diklórmetán  
/3x10 ml/ hozzáadásával a bepárlást megismételve, piri-  
dinmentesítettem. A reakcióelegy vékonyrétegekromatográfiás  
elemzése /77a/-re jellemző diasztereomerek jelenlétét  
mutatta /lásd R<sub>f</sub> táblázat/.

Az előző eljárás szerint nyert 77a vegyületet kloroform-  
ban /20 ml/ oldottam. Az opálos oldathoz 2 % p-toulol-  
szulfonsavat tartalmazó kloroform/metanol /7/3/ elegyet  
/30 ml/ adtam. A reakcióelegyet 30 percet szobahőmérsék-  
leten hagytam állni, majd 5 %-os NaHCO<sub>3</sub> oldattal /30 ml/  
ráztam össze. A CO<sub>2</sub> fejlődés megszűnése után a fázisokat



szeparáltam, és a kloroformos fázist szárítás /Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ után szárazra pároltam.

A párlási maradékot diklórmetánban oldottam, és 77b-t szilikagél /Kieselgel 60, 20 g/ töltetű oszlopra kötöttem fel. A metoxitritanolt diklórmetánnal /700 ml/, majd 77b-t 2 % metilalkohol-diklórmetánnal eluáltam. A kromatográfiásan homogén frakciókat egyesítettem és szárazra pároltam. 77b-t szilárd fehér habként izoláltam. Termelés: 555,7 mg /333 μM/ 66.6 %.

N<sup>6</sup>-benzoil-3'-O-/o-nitrobenzil/-5'-O-monometoxitritil-  
-adenilil-/2'-5'-N<sup>6</sup>-benzoil-3'-O-/o-nitrobenzil/-adenilil-  
-/2'-5'/-N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>,2'-O-tribenzoil-3'-O-/o-nitrobenzil/-adeno-  
zin-di-p-klórfenilészter /78a/ és  
3'-O-/o-nitrobenzil/-adenilil-/2'-5'/-3'-O-/o-nitrobenzil/-  
-adenilil-/2'-5'/-3'-O-/o-nitrobenzil/-adenozin /78c/

A kapcsolási reakció foszfátkomponensének /74/ /462 mg, 430 μM/ és hidroxil komponensének /77b/ /557.7 mg, 333 μM/ absz. piridines oldatát /10 ml/ szárazra pároltam. A kapott sárgásfehér habot piridinben /3.3 ml/ oldottam, majd az oldathoz TPSCl-ot /298 mg, 990 μM/ és N-metilimidazolt /158 μl, 1.98 mM/ adtam. 1 órás állás után a reakcióelegyet hűtés közben deszt. vízre /15 ml/ öntöttem és a csapadékos oldatot bepároltam, majd diklórmetánnal /3x10 ml/ való ismételt bepárlással piridin mentesítettem.





A párlási maradékot diklórmetánban /5 ml/ oldottam és szilikagél oszlopkromatográfiával tisztítottam. /Kieselgel 60, 20 g/. Eluens: metilalkohol:diklórmetán = 98:2. A terméket /78a/ tartalmazó frakciókat /amelyek kevés elreagálatlan 77b-t is tartalmaztak/ bepároltam és az alábbi kétlépcsős eljárással deblokkoltam.

A párlási maradékot piridinben /20 ml/ oldottam, majd cc.  $\text{NH}_4\text{OH}$ -t /20 ml/ adtam hozzá és 48 órát szobahőmérsékleten állni hagytam, majd ezt követően 5 órát  $60^\circ\text{C}$ -on hevitettem a jól lezárt lombikot.

Bepárlás után 78b-t metanolban /3 ml/ oldottam és 80 %-os ecetsavat /25 ml/ adtam a reakcióelegyhez. A homogén oldatot szobahőmérsékleten 3 órát állni hagytam, majd szárazra pároltam. Az ecetsav nyomokat vízzel történő koevaporációval távolítottam el, majd a párlási maradékot piridinben /3 ml/ oldottam és deszt. vízzel higitottam kezdődő opálosodásig. A 78c-t tartalmazó oldatot  $\text{DE}[\text{HCO}_3^-]$  oszlopra kötöttem fel. Az eluciót 1500 ml  $\text{H}_2\text{O}$  - 1500 ml 0,4 M TEAB lineáris gradiensevel végeztem. A 78c-t tartalmazó frakciókat egyesítettem és szárazra pároltam.

A bepárlást metilalkohollal /5x10 ml/ megismételtem, majd a TEAB mentes anyagot 1:1 dioxán: $\text{H}_2\text{O}$ -ban /2 ml/ feloldottam és liofilizáltam.

A termék súlya: 182 mg /118.7  $\mu\text{Mól}$ /. Termelés: 36 %.

Az így nyert termékből nyomnyi mennyiségű /<1 %/ apolárosabb kontaminánst  $\text{BuOH}:\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$  16:2:5 rendszerben, szilikagél rétegen végzett preparatív vékonyrétegekromatográfiával távolítottam el.



5'-O-foszforil-3'-O-/o-nitrobenzil/-adenilil-/2'5'/-3'-  
-O-/o-nitrobenzil/-adenilil-/2'-5'/-3'-O-/o-nitrobenzil/-  
-adenozin - tetrakis trietilamminiumsó /80a/

Liofilizált,  $P_2O_5$  felett szárított 78c-t /3.9  $\mu M$ ól,  
5.97 mg/ trimetilfoszfátban /195  $\mu l$ / oldottam, majd jeges  
vizes fürdőben kevertetés közben  $O^0$ -ra hűtöttem.  $POCl_3$ -t  
/12.5  $\mu l$ , 135  $\mu M$ ól/ adtam a reakcióelegyhez és a kever-  
tetést  $CaCl_2$ -os csővel lezárt lombikban,  $O^0$ -on 3,5 órát  
folytattam.

Az intenzíven kevert reakcióelegybe 1 M-os TEAB-ot /2 ml/  
pipettáztam, majd az oldatot 30 perc állás után szárazra  
pároltam. A párlási maradékot vízben /20 ml/ oldottam és  
0.05 M TEAB-vel ekvibrált DE-32  $HCO_3$  /1.5x30 cm/ oszlopra  
kötöttem fel. Az eluciót 600 ml 0.05 M TEAB és 600 ml  
0.6 M TEAB lineáris gradiensevel végeztem. /Frakciótérfo-  
gat: 19.5 ml/, átfolyási sebesség: 78 ml/óra/. 80a-t  
tartalmazó frakciókat /32-40/ bepároltam, majd TEAB mente-  
sitettem. A kromatográfiásan homogén termék: 126 OD egység/  
260 nm; a 80b-nél megállapított  $\epsilon_{260}$  szerint: 2.73  $\mu M$ ól,  
70 %.

5'-O-trifoszforil-3'-O-/o-nitrobenzil/-adenilil/2'-5'/-3'-  
-O-/o-nitrobenzil/-adenilil-/2'-5'/-3'-O-/o-nitrobenzil/-  
-adenozin - hexakis tretilammóniumsó /80b/

Liofilizált,  $P_2O_5$ -felett exsikátorban 24 órát szárított



78c-t /20  $\mu\text{Mól}$ , 30.64 mg/ trimetilfoszfátban /1 ml/ feloldottam, majd jeges vizes fürdőben kevertetés közben  $0^{\circ}\text{C}$ -ra hűtöttem. Foszforilkloridot /64  $\mu\text{l}$ , 691  $\mu\text{Mól}$ / adtam a reakcióelegyhez és a kevertetést  $\text{CaCl}_2$ -es csővel lezárt lombikban  $0^{\circ}\text{C}$ -on 3.5 órát folytattam.

Az intenzíven kevertetett reakcióelegybe 0.5 M-os bisz-tri-n-butilammónium pirofoszfát dimetilformamidos oldatának /4 ml/ és tri-butilamin /0.4 ml/ keverékét pipettáztam, majd 1 perc után a reakcióelegyet 0.5 M-os TEAB oldatra öntöttem /30 ml/. Az oldatot szobahőmérsékleten 3 órát kevertettem, majd szárazra pároltam és a bepárlás megismétlésével TEAB mentesítettem. A párlási maradékot deszt. vízben /40 ml/ oldottam és az oldat pH-ját cc.

$\text{NH}_4\text{OH}$ -val 7.5-re állítottam be, majd 0.2 M-os TEAB-val ekvibrált DE-32 $[\text{HCO}_3^-]$  oszlopra kötöttem /1.5x60 cm/.

Az eluciót 1000 ml 0.2 M TEAB és 1000 ml 0.7 M TEAB lineáris gradiensével végeztem. /Átfolyási sebesség:

78 ml/óra, frakciótérfogat: 19.5 ml/. Az 50-62 frakciókban eluálódó kromatográfiásan homogén /S<sub>3</sub>/ 80b-t tartalmazó frakciókat egyesítettem és szárazra pároltam. A párlási maradékot metilalkohollal végzett ismételt bepárlással sómentesítettem, majd dioxán:H<sub>2</sub>O = 1:1-ben oldva /2 ml/ liofilizáltam. Termelés: 24.73 mg /12.12  $\mu\text{Mól}$ /.

$\epsilon_{260\text{nm}} = 46200$ .



Adenilil- /2'-5' /-adenilil- /2'-5' /-adenozin /79/;

5'-O-foszforyl-adenilil- /2'-5' /-adenilil- /2'-5' /-

-adenozin /81a/ és

5'-O-trifoszforyl-adenilil- /2'-5' /-adenilil- /2'-5' /-

-adenozin /1/.

/Általános eljárás az o-nitrobenzil csoport eltávolítására/.

78c, 80a és 80b vegyületet /2-2  $\mu$ Mól/ etilalkohol:viz = 1:1 elegyben feloldottam /120 ml/ és az oldatokat Desaga Uvis UV-lámpa alatt 366 nm hullámhosszúságu UV fényel 2 órát besugároztam.

Az oldatokat 5-10 ml-re bepároltam és DEAE-Sephadex [ $\text{HCO}_3^-$ ] /1.5x30 cm/ -oszlopra vittem fel. Az eluciót TEAB lineáris gradiensével végeztem. Az eluciók adatait az alábbi táblázat tartalmazza.

Vegyület	Gradiens	TEAB-koncentráció	Termelés* / % /
<u>79**</u>	0.05 - 0.4 M 600 - 600 ml	0.18 - 0.20	72.8
<u>81a</u>	0.1 - 0.5 M 600 - 600 ml	0.33 - 0.35	73.0
<u>1</u>	6.15 - 0.6 M 500 - 500 ml	0.42 - 0.44	76.0

\*a termelés számításához felhasznált  $\epsilon$  értékek irodalmi adatok<sup>38</sup>,

\*\*7.3. ábra.



A megfelelő frakciókat egyesítettem és bepároltam. A termékek sómentesítését metanollal való ismételt bepárlással végeztem. A biológiai vizsgálatokhoz és enzimatis hidrolizisekhez szükséges  $\text{Na}^+$  sókat, az anyagok vizes oldatainak Dowex 50x8  $\text{Na}^+$  formájú oszlopon  $1 \times 15$  cm/ való átbozsátásával nyertem.



IRODALOM

- 1./ I.M. Kerr és R.E. Brown, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 256 /1978/.
- 2./ C. Baglioni, Cell, 17, 255 /1979/.
- 3./ B.R.G. Williams és I.M. Kerr, Trends Biochim.Sci. 5, 138 /1980/.
- 4./ P. Lengyel, Ann. Rev. Biochim. 51, 251 /1982/.
- 5./ P.F. Torrence, Molec.Aspects Med., 5, 129 /1982/.
- 6./ E.M. Martin, N.J.M. Birsdall, R.E. Brown és I.M. Kerr, Eur. J. Biochem. 95, 295 /1979/.
- A.G. Hovenassian, R.E. Brown, E.M. Martin, W.K. Roberts, M. Knight és I.M. Kerr, Methods in Enzymology, 79, 184 /1981/.
- B.G. Hughes, P.C. Srivastava, D.D. Muse és R.K. Robins Biochemistry, 22, 2116 /1983/.
- 7./ K.K. Ogilvie és N.Y. Theriault, Tetrahedron Lett., 2111 /1979/.
- A.K. Markham, R.A. Porter, M.J. Gait, R.C. Sheppard és I.M. Kerr, Nucl. Acid Res., 6, 2569 /1979/.
- J. Engels és J. Krahmer, Angew. Chem., 91, 1007 /1979/.
- R. Charubala és W. Pfeleiderer, Tetrahedron Lett. 1333 /1981/.
- R. Charubala, E. Uhlmann és W. Pfeleiderer, Liebigs Ann. Chem., 2392 /1981/.
- J.B. Chattopadhyaya, Tetrahedron Lett. 4113 /1980/.
- G.Gioeli, M. Kwiatkowski, B. Öberg és J.B. Chattopadhyaya, Tetrahedron Lett. 1741 /1981/.



- T. Shimidzu, K. Yamana és A. Murakomi, Nucl. Acid Res. Spec. Publ. 9, 183 /1981/.
- M.J. Karpeisky, L.N. Beigelmann, S.N. Mikhailov, N.S. Padukova, és J. Smrt, Coll. Chech. Chem. Comm. 47, 156 /1982/.
- J. Imai és P.F. Torrence, Methods in Enzymology, 79, 233 /1981/.
- H.L. Sleeper és L.E. Orgel, J. Mol. Evol. 12, 357 /1979/.
- 8./ K. Kwiatkowski, G. Gioeli, B. Öberg és J.B. Chattopadhyaya, Chemica Scripta, 18, 95 /1981/.
- J. Engels, Tetrahedron Lett. 4339 /1980/.
- G. Gosselin és J.L. Imbach, Tetrahedron Lett. 4699 /1981/.
- A. Jäger és J. Engels, Nucl. Acid Res. Spec. Publ. 9, 149 /1981/.
- R. Charubala és W. Pfeleiderer, Tetrahedron Lett. 4789 /1982/.
- G. Gioeli, J.B. Chattopadhyaya, A.F. Drake, B. Öberg, Chemica Scripta, 19, 13 /1982/
- J. Imai, M.I. Johnston és P.F. Torrence, J. Biol. Chem., 257, 13739 /1982/.
- D.A. Eppstein, Y.V. Marsh, B.B. Schryver, M.A. Larsen, J.W. Barnett, J.P.H. Verheyden és E.J. Prisbe, J. Biol. Chem., 257, 3990 /1982/.
- 9./ B.R.G. Williams és I.M. Kerr, Nature, 276, 88 /1978/.
- A.G. Hovanessian és J.N. Wood, Virology, 101, 81 /1980/.
- Y. Higashi, és Y. Sokawa, J. Biochem. /Tokyo/, 91, /2021/ 1982.



- 10./ M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, Bull. Chem. Soc. /Japan/, 42, 3505 /1969/.
- 11./ M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, Tetrahedron Lett., 5067 /1967/.
- 12./ L.A. Slotin, Synthesis, 737 /1977/.
- 13./ F. Eckstein, Kontakte /Merck/, 3, 3 /1978/.
- 14./ K.H. Scheit, Nucleotide Analogs, Synthesis and Biological Function, Wiley, New York, 1980.
- 15./ L. Xinuan, Y. Kun, Z. Yaoki, J. Jinren, W. Yumei, L. Yanchun, L. Boliang és W. Debao, Scientia Sinica, 26, 809 /1983/.
- 16./ A.M. Michelson, Biochim. Biophys. Acta, 91, 1 /1964/.
- 17./ H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc. 76, 3517 /1954/.  
H.G. Khorana, Some Recent Developments in the Chemistry of Phosphate Esters of Biological Interest, Wiley, New York, 1961, p. 126.
- 18./ M. Smith és H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 80, 1141 /1958/.
- 19./ R.W. Chambers és H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 80, 3749 /1958/.
- 20./ A. Simoncsits és J. Tomasz, Nucl. Acid Res. 2, 1223 /1975/.
- 21./ J. Tomasz, A. Simoncsits, M. Kajtár, R.M. Krug és A.J. Shatkin, Nucl. Acid. Res., 5, 2945 /1978/.
- 22./ R.W. Chambers és J.G. Moffatt, J. Am. Chem. Soc., 80, 3752 /1958/.



- 23./ J.G. Mofatt és H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 83,  
649 /1961/.
- 24./ V.V. Shumyantzeva, N.I. Sokolova és Z.E. Shabarova,  
Nucl. Acad Res., 3, 903 /1976/.
- 25./ G.F. Mishenina, V.V. Samukov és T.N. Shubina, Bioorg.  
Khim., 2, 179 /1976/.
- 26./ T. Mukaiyama és M. Hashimoto, J. Am. Chem. Soc., 94,  
8528 /1972/.
- 27./ D.G. Knorre és V.F. Zarytova, Phosphorus Chemistry  
directed towards Biology /Ed. W.J. Stec/ Pergamon  
Press, 1980. p. 13.
- 28./ Bottka, S. Doktori disszertáció, Szeged, 1981.
- 29./ J.H. van Boom, R. Crea, W.C. Luyten és A.B. Vink,  
Tetrahedron Lett., 2779 /1975/.
- 30./ J.A.J. den Hartog és J.H. van Boom, Recl. Trav. Chim.  
Pays-Bas, 100, 285 /1981/.
- J.H. van Boom, P.M.J. Burgers, R. Crea, W.C. Luyten,  
A.B.J. Vink és B.C. Reese, Tetrahedron, 31, 2953 /1975/.
- 31./ F.Cramer, H. Schaller és H. Staab, Chem. Ber. 94, 1612  
/1961/.
- H. Schaller, H. Staab és F. Cramer, Chem. Ber., 94,  
1621 /1961/.
- F. Cramer és H. Neuenhoffer, Chem. Ber., 95, 1664  
/1962/.
- 32./ D.E. Hoard és D.G. Ott, J. Am. Chem. Soc., 87, 1785  
/1965/.



- 33./ M.B. Gottikh, M.G. Ivanovskaya és Z.E. Shabarova,  
Bioorg. Khim. 9, 1063 /1983/.
- 34./ F. Cramer és H. Schaller, Chem. Ber., 94, 1634 /1961/.  
K.H. Scheit, Chem. Ber., 101, 1141 /1968/.
- 35./ A.F. Cook, M.J. Holmann és A.L. Nussbaum, J. Am. Chem. Soc., 91, 1522 /1969/.
- 36./ C.B. Reese és L. Yau, J. Chem. Soc. Chem. Commun.,  
1050 /1978/.
- 37./ J. A.J. den Hartog, R. A. Wijnands, J.H. van Boom,  
és R. Crea, J. Org. Chem., 46, 2242 /1981/.
- 38./ M. Ikehara, K. Oshie, A. Hasegawa és E. Ohtsuka, Nucl. Acid Res., 9, 2003 /1981/.
- 39./ I. Imai és P.F. Torrence, J. Org. Chem., 46, 4015 /1981/.
- 40./ S.S. Jones és C.B. Reese, J. Am. Chem. Soc. 101,  
7399 /1979/.
- 40b/ H. Sawai, T. Shibata és M. Ohno, Tetrahedron Lett.,  
4573 /1979/  
H. Sawai, T. Shibata és M. Ohno, Tetrahedron, 37,  
481 /1980/.  
M. Ikehara, K. Oshie és E. Ohtsuka, Tetrahedron Lett.  
3677 /1979/.
- 41./ Nucleic Acid Chemistry Part 2 /Ed.: L.B. Townsend and  
R.S. Tipson/ J. Wiley, New York, 1978, p. 793, 827,  
861, 963.
- 42./ B.G. Hughes, P.C. Srivastava, D.D. Muse és R.K. Robins,  
Biochemistry, 22, 2116 /1983/.
- 43./ C.I. Hong és G.B. Chhedda, J. Med. Chem., 16, 956 /1973/.



- 44./ A.M. Marray és M.R. Atkinson, Biochemistry, 7, 4023 /1968/.
- 45./ P.A. Frey, Tetrahedron, 38, 1541 /1982/.
- 46./ D.W. Hutchinson, Phosphorus Chemistry Directal towards Biology /Ed.: W.J. Stec/ Pergamon Press 1980 p. 111.
- 47./ J. Tomasz, J. Carbohydrates-Nucleosides-Nucleotides, 8, 557, /1981/.
- 48./ A. Simoncsits és J. Tomasz, Tetrahedron Lett. 3995 /1976/.
- 49./ J. Tomasz és A. Simoncsits, J. Carbohydrates-Nucleosides-Nucleotides, 5, 503 /1978/.
- 50./ J. Tomasz, Nucleosides-Nucleotides, 2, 63 /1983/.
- 51./ S. Bottka és J. Tomasz, Tetrahedron, 35, 2909 /1979/.
- 52./ J.H. Kim és A. Rosowsky, J. Carbohydrates-Nucleosides-Nucleotides, 6, 229 /1979/.
- 53./ I. Tazawa, S. Tazawa, I.L. Aldorfer és P.O.P. Ts'o, Biochemistry, 11, 4931 /1972/.
- 54./ W.H. Dawson, R.L. Cargill és R.B. Dunlap, J. Carbohydrates-Nucleosides-Nucleotides, 4, 363 /1977/.
- 55./ L. Cunnigham, J. Am. Chem. Soc., 80, 2546 /1958/.
- 56./ R. Saffhill és J. Hall, J. Carbohydrates-Nucleosides-Nucleotides, 8, 573 /1981/.
- 57./ E. Declerg és P.F. Torrence, J. Carbohydrates-Nucleosides-Nucleotides, 5, 187, /1978/.
- 58./ J. Ludwig és J. Tomasz, Synthesis, 32 /1982/.
- 59./ D.G. Knorre, V.A. Kurbatov és V.V. Samukov, FEBS Lett. 70, 105 /1976/.
- 60./ M.R. Webb, Biochemistry, 19, 4744 /1980/.



- 61./ T. Glonek, R.A. Kleps és T.G. Myers, Science, 185,  
352 /1974/.
- 62./ J. Ludwig, Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.  
16, 131 /1981/.
- 63./ W.E. Wehrli, D.L. M. Verheyden és J.G. Moffatt, J. Am.  
Chem. Soc., 87, 2265 /1965/.
- 64./ F. Cramer és M. Winter, Chem. Ber., 94, 989 /1961/.  
H. Brederock, R. Gomper, R. Klemm és H. Rempfer, Chem.  
Ber., 92, 837 /1959/.  
F. Cramer, S. Rittner, W. Reinhard és P. Desai, Chem.  
Ber., 99, 2252 /1966/.
- 65./ G. Lowe, G. Tansley és P.M. Cullis, J. Chem. Soc. Chem.  
Commun. 595 /1982/.
- 66./ T.R. Webb, Nucleosides-Nucleotides, 2, 291 /1983/.
- 67./ I.L. Ruth és Y.C. Cheng, Mol. Pharmacol, 20, 415 /1981/.
- 68./ A. Holy, J. Carbohydrates-Nucleosides-Nucleotides, 2,  
63 /1975/.
- 69./ H. Köster, H. Blöcker, R. Frank, S. Geussenhainer, W.  
Heidmann, W. Kaiser és D. Skrock, Liebigs Ann. Chem.  
854 /1978/.
- 70./ M. Ikehara, S. Tanaka, T. Fukui és E. Ohtsuka, Nucl.  
Acid Res. 3, 769 /1964/.
- 71./ R.H. Hall, Biochemistry, 3, 769 /1964/.,
- 72./ E. Ohtsuka, S. Tanaka és M. Ikehara, Chem. Pharm. Bull.,  
25, 949 /1977/.
- O.G. Bartholomew és A.D. Broom, J. Chem. Soc. Chem.  
Commun. 38 /1975/.



- E. Ohtsuka, T. Wakabayashi, S. Tanaka, T. Tanaka, K. Oshie, A. Hasegawa és M. Ikehara, Chem. Pharm. Bull., 29, 318 /1981/.
- 73./ R. Charubala, E. Uhlmann és W. Pfeleiderer, Liebigs Ann. Chem. 2392 /1981/.
- 74./ J.B. Chattopadhyaya és C.B. Reese, Tetrahedron Lett. 5059 /1979/.
- 75./ V.A. Efimov, A.A. Buryakova, S.V. Reverdatto, O.G. Chakmakheva, és Yu. A. Ovchinnikov, Nucl. Acid Res., 11, 8369 /1983/.
- V.A. Efimov, S.V. Reverdatto és O.G. Chakmakheva, Tetrahedron Lett., 23, 961 /1981/.
- 76./ J. Stawinski, T. Hozumi és S.A. Narang, Nucl. Acid Res., 4, 353 /1977/.
- 77./ E. Ohtsuka, K. Fujiyama és M. Ikehara, Nucl. Acid Res., 9, 3503 /1981/.
- 78./ Procedures in Nucleic Acid Research /Ed.: G.L. Cantoni and D.R. Davies/ Hasper and Row, New York /1967/ p. 46.
- 79./ L.A. Heppel, D.R. Harkness, R.J. Hilme, J. Biol. Chem., 237, 841 /1962/.
- 80./ Topics in Phosphorus Chemistry Vol. 7. /Ed.: E.J. Griffith and M. Grayson/ Wiley 1972. p. 182.
- 81./ A.A. Achrem, G. Zajceva, E.W. Kalinichenko és I.A. Mikhajlopulo, Bioorg. Khim., 2, 1325 /1976/
82. H.Eibl és W.E.M. Lands, Anal. Biochem., 30, 51 /1969/
- 83./ M. Smith és H.G. Khorana, Methods Enzymol., 6, 645 /1960/.