

NUKLEOZID-5'-FOSZFODIAMIDÁTOK

doktori értekezés

Bottka Sándor

Szeged

1981



Értekezésemet az MTA Szegedi Biológiai Központjának Biofizikai Intézetében készítettem. Köszönetet mondok Dr. Keszthelyi Lajosnak, a fizikai tudományok doktorának, az Intézet igazgatójának, hogy munkám elkészítését lehetővé tette.

Köszönetemet és hálámat fejezem ki Dr. Tomasz Jenőnek, a kémiai tudományok kandidátusának, aki a nukleotidkémia területén tett első lépéseimet gondos szakmai irányításával támogatta, és aki dolgozatom elkészülését mindvégig figyelemmel kísérte, tanácsaival hathatósan elősegítette.

Köszönetet mondok továbbá Dr. Tamás József professzor Urnak, Dr. Radics Lajos tudományos főmunkatársnak és Dr. Peredyné Kajtár Mária tudományos munkatársnak a tömeg-, illetve ^{13}C NMR-spektrumok felvételéért, valamint László Katalin laboránsnak a kísérleti munka során nyújtott segítségéért.



TARTALOM

	oldal
BEVEZETÉS	1
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
1.1. A diamidofoszfát-észterek előállítására szolgáló szintézisek rendszerezése	3
1.2. Diamidofoszfát-észterek előállítása	6
1.3. Nukleozidok foszfodiamidát származékai	11
1.3.1. /N-e/ és /O-e/ csoportbeli szintézisek	11
1.3.2. A P-O-C kötés kiépítése régioszelektív foszforilezéssel	15
1.3.3. Oxido-redukciós kondenzáció	17
1.4. A diamidofoszfát-észterek kémiai sajátosságai	19
1.4.1. Savkatalizált hidrolízis	19
1.4.2. Lugos hidrolízis	22
1.4.3. A foszfodiamidát-származékok szintetikus alkalmazásai	25
2. NÉHÁNY NUKLEOZID-5'-FOSZFODIAMIDÁT ELŐÁLLÍTÁSA	29
2.1. A szintézisut	29
2.1.1. A Yoshikawa-foszforilezés	30
2.1.2. Az aminolízis	33
2.1.3. A termékek szerkezetének igazolása	34
2.2. Mellékreakciók, melléktermékek	35
2.2.1. A foszforilezés aszelektivitása	36
2.2.2. Metilezés a bázison	40
2.2.3. Aminolízis helyett hidrolízis	44
2.3. A termékek izolálása	45
3. A NUKLEOZID-5'-FOSZFODIAMIDÁTOK TULAJDONSÁGAI	49
3.1. Az adenzin-sorozat oldhatósága	49
3.2. A nukleozid-5'-foszfodiamidátok kémiai stabilitása	50
3.2.1. Szubsztituálatlan és szubsztituált származékok savkatalizált hidrolízise	50
3.2.2. Nukleozid-5'-foszfamidátok előállítása fluoridion katalízis segítségével	54
3.2.3. A nukleozid-5'-foszfodiamidátok viselkedése lugos közegben	58
4. ÖSSZEFOGLALÁS	60
5. KISÉRLETI RÉSZ	61
IRODALOM	73

BEVEZETÉS

A nukleozid-foszfodiamidátok neve sokszor még a nukleotidkémiaiban járatosak számára is idegenül hangzik. Olyan vegyületcsalád ez, amelynek meglehetősen kis számu képviselője ismeretes, és még azok sem túl hosszú ideje. A kezdeti tapasztalatok azonban arra mutattak, hogy e vegyületek a nukleotidkémiai szintézis értékes intermedierei lehetnek.

A rendelkezésre álló kevés adat indokolta, hogy az irodalom feldolgozásánál azokat az analóg szerkezetű vegyületeket is figyelembe vegyem, amelyeknek észtereszitő csoportja nem nukleozid, hanem valamilyen más, egyszerűbb alkohol. Az így fellelhető bőséges adathalmaz nemcsak támpontokat adott a további munkához, hanem lehetővé tette az előállítási módszerek rendszerezését is.

A legegyszerűbb szerkezetű, ammóniából levezethető nukleozid-5'-foszfodiamidátok néhány tagjának szintézisét¹ Simoncsits András és Tomasz Jenő valósították meg először. Módszerük egyszerű, gyors megoldást kínál, amely kidolgozva egy általános nukleozid-5'-foszfodiamidát szintézis alapja lehet.

Célom az volt, hogy ezt az eljárást alapul véve

- megjavítsam annak hatásfokát,
- megvizsgáljam a reakciósor befolyásoló tényezőket és a mellékreakciókat,

- előállítsam a négy fő ribonukleozid ammóniából származó foszfodiamidát-származékát, valamint
- új N-szubsztituált nukleozid-5'-foszfodiamidátok előállításával megállapítsam a módszer alkalmazhatósági körét.

A munkám során létrejött vegyületsorozat alkalmas modellként jó lehetőséget adott a szubsztituálatlan és a különböző mértékben szubsztituált foszfodiamidát-csoport kémiai stabilitási viszonyainak vizsgálatára.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

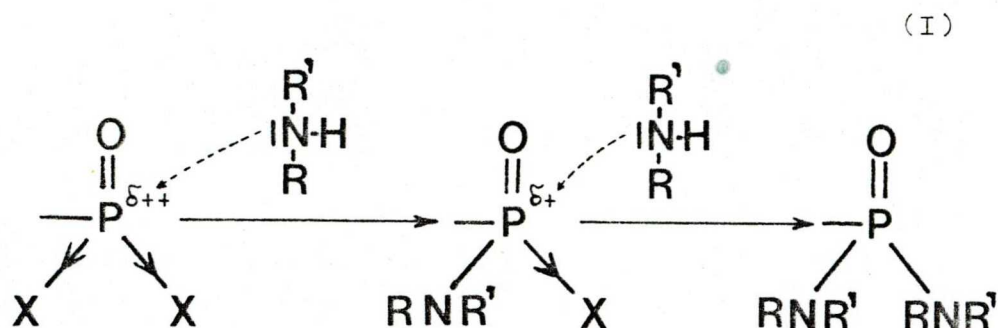
1.1. A diamidofoszfát-észterek előállítására szolgáló szintézisek rendszerezése

A nukleozid-5'-foszfodiamidátok a diamidofoszforsav észterei. Előállításukra elvben mindazok a módszerek alkalmazhatók, melyeket az egyszerű alkoholok diamidofoszfát-észtereinek előállítására kidolgoztak. Célszerű először ezeket a módszereket áttekintenünk.

A diamidofoszfát-észterek számos képviselője - elsősorban A. Michaelis munkája nyomán² - már régóta ismert. A későbbi növényvédőszer-kutatások is jelentősen hozzájárultak e terület fejlődéséhez. A létrejött eljárások sokasága³ néhány alapvető reakcióutra vezethető vissza, ami lehetőséget nyújt a rendszerezésre.

A diamidofoszfát-észterek előállítása két P-N és egy P-O-C kötés kiépítését jelenti. A szintéziseket a kötések kialakításának sorrendje alapján célszerű csoportosítani. Az első csoportba sorolhatók azok a módszerek, melyekben először a két P-N kötést alakítják ki, míg a másodikba azok, melyek során először a P-O-C kötést hozzák létre. A továbbiakban az első csoportot N-nel, míg a másodikat O-val jelölöm.

A P-N kötések kialakítása az esetek döntő többségében az (I) általános séma szerint történik.



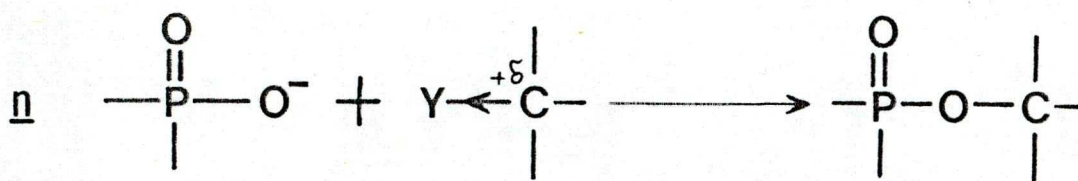
R, R' = H, alkil vagy aril X = halogén

Az ammónia vagy az amin két egymást követő lépésben nukleofil támadást hajt végre a halogénatomok -I effektusa által pozitívan polározott foszforatomon.

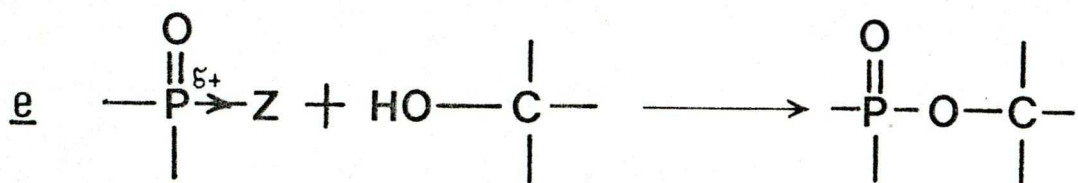
A P-O-C kapcsolat létrehozását mind az N mind az O csoportbeli szintézisekben elvileg kétféleképpen lehet megvalósítani⁴. Ennek alapján elvégezhető a módszereknek egy másfajta csoportosítása is. Az egyik csoportba azok a folyamatok kerülnek, melyek során valamilyen foszfát-anion hajt végre nukleofil támadást egy pozitív polározottságú szénatomon (II). A másik csoportba, ahová a szintézisek zöme tartozik, azokat az eljárásokat sorolhatjuk, amelyek során valamilyen alkoholos hidroxilcsoport vagy alkoholátion intéz nukleofil támadást egy pozitívan polarizált foszforatomon (III).

A két csoportot a továbbiakban a foszfátkomponens nukleofil, illetve elektrofil szerepére utalva n, ill. e betűvel jelölöm. A reakcióutak általános egyenletei a következőképp írhatók fel.

(II)



(III)



Y, Z = Cl, Br

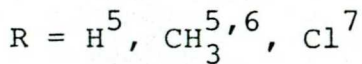
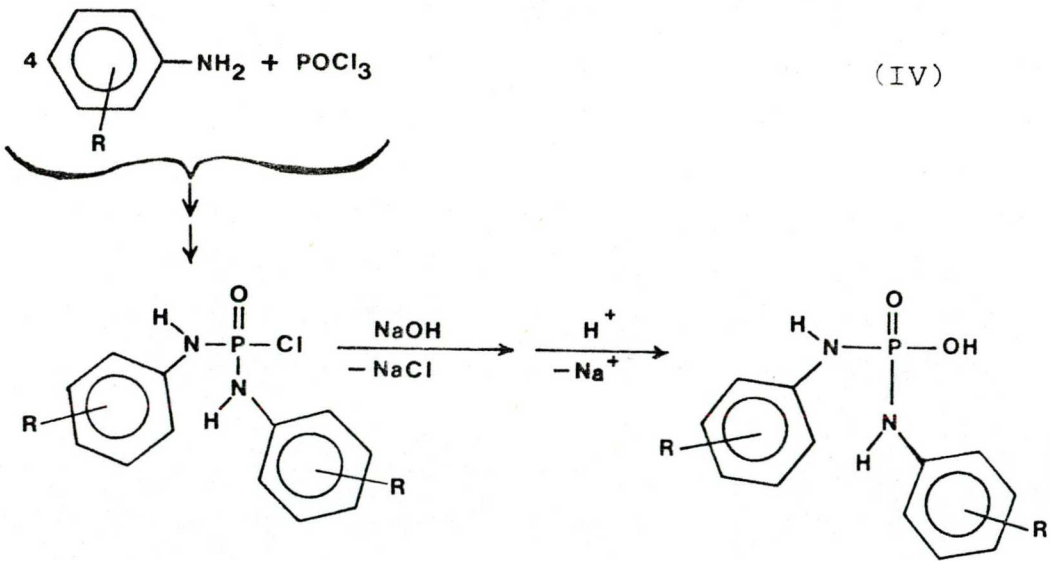
A kötések kiépítésének sorrendje és a P-O-C kötés kialakítási módja figyelembevételével tehát a diamidofoszforsav-észterek szintézisére felhasználható reakcióutakat a következő négy csoportba sorolhatjuk: /N-n/, /N-e/, /O-n/, /O-e/. Az irodalmi példák a négy párhuzamos lehetőség közül három reakcióút általános felhasználásáról tanuskodnak. Az /O-n/ cso-



portnak megfelelő eljárás, bár elvileg lehetséges, legjobb tudomásom szerint máig is kihasználatlan.

1.2. Diamidofoszfát-észterek előállítása

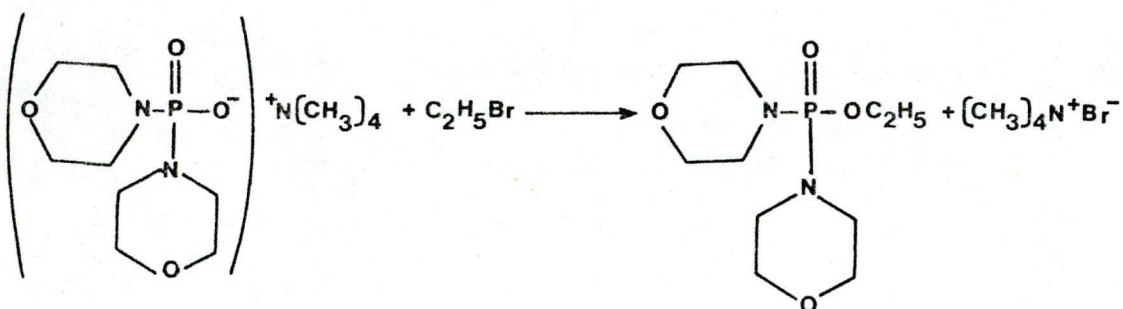
Az /N-n/ csoportba tartozó eljárások száma viszonylag kicsi. A szintézisek első lépéseként a megfelelő diamidofoszforsavat hozzák létre. E célra általánosan használt eljárás az (I) reakció szerint készített savkloridok hidrolizise, amelyet legjobban az aromás diamidofoszforsavak előállítása (IV) példáz.



A diamidofoszforsavat a második lépésben valamilyen alkilhalogeniddel reagáltatják. Példaként Cheymol és munkatársai munkáját⁸ érdemes kiemelni, akik foszforsav-

-bisz(dialkilamid)-ok tetrametilammónium sói és alkilhalogenidek egymásrahatásával készítették el a szóbanforgó vegyületeket, így az etilfoszfát-dimorfolidátot (V).

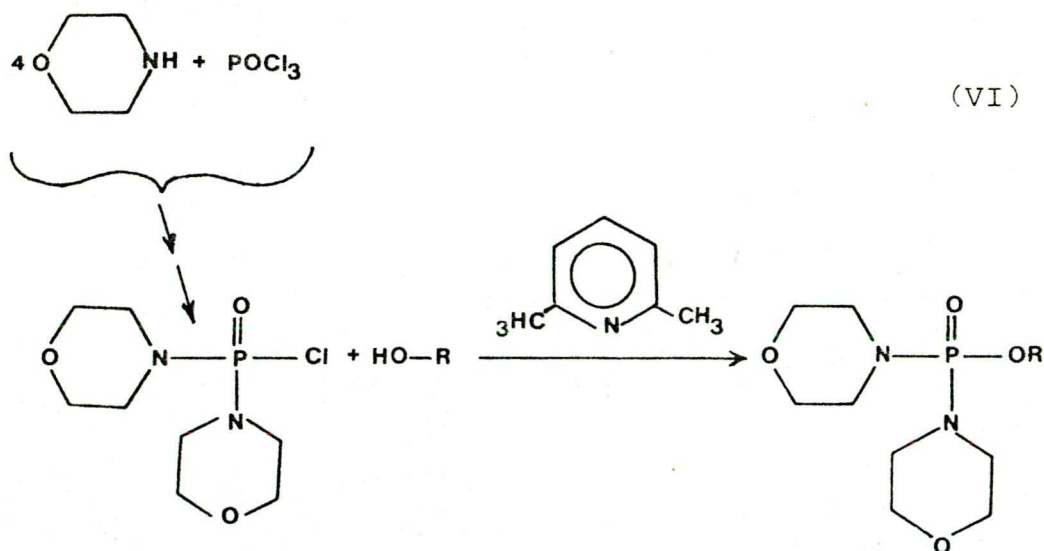
(V)



Az /N-e/ csoportba tartozó eljárások első lépése a diamidofoszforil-halogenid (klorid vagy -bromid) előállítása. Ezt a legtöbb esetben (IV) reakcióval analog módon hajtják végre. A reakciósor második lépése, a lúgos hidrolízis, ilyenkor természetesen elmarad. A diamidofoszforil-halogenidek alkoholokkal nem, vagy csak igen lassan reagálnak, viszont alkálialkoholátokkal az átalakulás készségesen végbemegy⁹. A folyamatot inert oldószerekben vagy az illető alkohol feleslegében¹⁰ hajtják végre. Tercier aminok hatására az észterképzési

reakció szabad alkoholokkal is lejátszódik.

Az /N-e/ csoportban a foszfodianilidátok és a foszfodimorfolidátok szintézise bizonyult a legfontosabbnak. Zetzsche és Büttiker a (IV) reakció első lépésének megfelelően készített dianilidofoszforil-kloridot piridin jelenlétében egy és többértékű alkoholokkal reagáltatta, és egy, ill. több dianilidofoszforil-csoportot tartalmazó észtereket kapott¹¹. Montgomery és Turnbull több különböző típusú dimorfolidofoszfát-észter szintézisét a (VI) reakciót szerint valósította meg¹².



Tercier bázisként a sztérikusan gátolt 2,6-lutidin volt a legmegfelelőbb.

Az /O-e/ csoportba sorolható szintézisek első lépése a P-O-C észterkötés létrehozása, amit általában

foszforil-klorid segítségével terciér bázis jelenlétében hajtanak végre (III).

Ily módon aktivált diklórfoszfát-észter származékokat kapnak, melyek ammóniával, primer vagy szekunder aminokkal készségesen reagálnak, és foszfodiamidátokká alakulnak át (I).

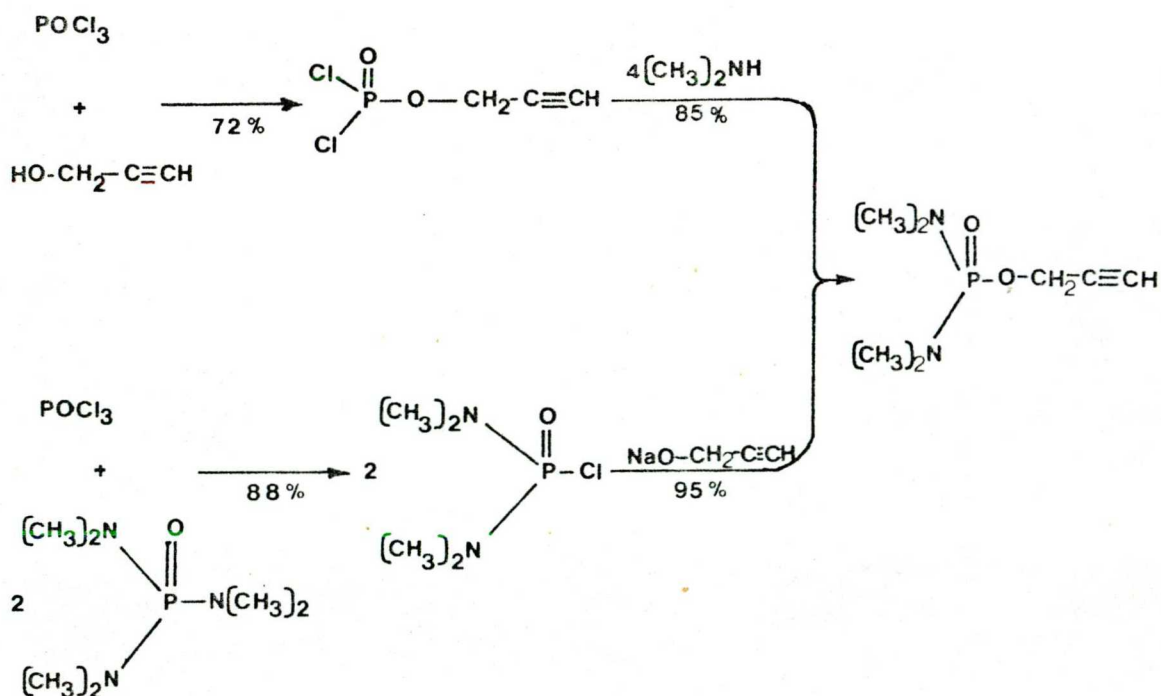
Az aminolizis egyaránt elvégezhető az észterképzést követően közvetlenül a reakcióelegyben vagy az izolált diklórfoszfáttal. Audrieth és Toy eredményei¹³ szerint mind a két út járható, bár az előbbi megoldással gyengébb hozamok érhetőek el, és nehézkes a termék izolálása is. Az aminolizist leginkább indifferens oldószerekben (kloroform¹³, éter¹⁴, benzol¹⁵) hajtották végre. Néhány esetben az átalakulást vizes közegben játszották le, amit a diklórfoszfát-származék viszonylag gyenge hidroliziskészsége tesz lehetővé. Ilyenkor mellékreakcióként a hidrolizis is fellép. Ennek ellenére az N-metil-szubsztituált diamidofoszforsav-észterek előállításában 85% körüli hozamokat értek el^{13,14}. Az ammóniából származó diamidátok szintézisét közel 100 %-os termeléssel tudták megvalósítani azáltal, hogy az ammonolizist cseppfolyós ammóniában vitték végbe¹⁶.

A P-N kötések szintézisének két egymást követő lépése (I) térben és időben elválasztható egymástól. Két ekvivalens ammónia vagy amin jelenlétében csak (I) reakció első lépése játszódik le, és csak újabb két ekvivalens

ammónia, illetve amin hozzáadása után megy teljesen végbe. Ha a második lépésben alkalmazott amin, ill. ammónia különbözik az első lépésben használttól, akkor aszimmetrikus foszfodiamidátok jönnek létre. Caven már 1902-ben szintetizálta ezek első képviselőjét¹⁷, az etilfoszfamidát-anilidátot. Az ilyen típusu vegyületek érdekessége, hogy királis foszforatomot tartalmaznak, vagyis két enantiomerjük létezik.

Az /N-e/ és az /O-e/ csoportbeli szintézisek összehasonlítására jó lehetőséget kínál Sturtz és munkatársai munkája¹⁸, mivel a 2-propinil-(N,N,N',N'-tetrametil)-foszfodiamidátot mind a két uton előállították (VII).

(VII)



A két módszer közül a gyakorlatban egyszerűsége és jobb hozama miatt az /N-e/ csoportbeli bizonyult megfelelőbbnek. A hozamok közti különbség különösen az észterkötés kiépítésében szembetűnő. A foszforil-kloriddal lejátszatott reakció termelése majdnem 20 %-kal elmarad a bisz-(dimetilamido)-foszforil-kloriddal lejátszatott reakcióhoz képest. Ez a különbség általánosítható az /O-e/ és az /N-e/ csoportra nézve. A foszforil-klorid trifunkciós reagens, ezért már nyomnyi víz jelenlétében is mód nyílik di- és triészterek, valamint kondenzált foszfát-származékok keletkezésére is. Ez összetetté teszi a termékelegyet és lerontja a hozamokat. A diamidofoszforil-kloridok használata ezt a problémát kiküszöböli, de csökkent reakciókészségük miatt az alkoholokat alkálialkoholáttá alakítva kell reakcióba vinni, vagy a reakcióidő tetemes megnövekedésével kell számolni.

1.3. Nukleozidok foszfodiamidát-származékai

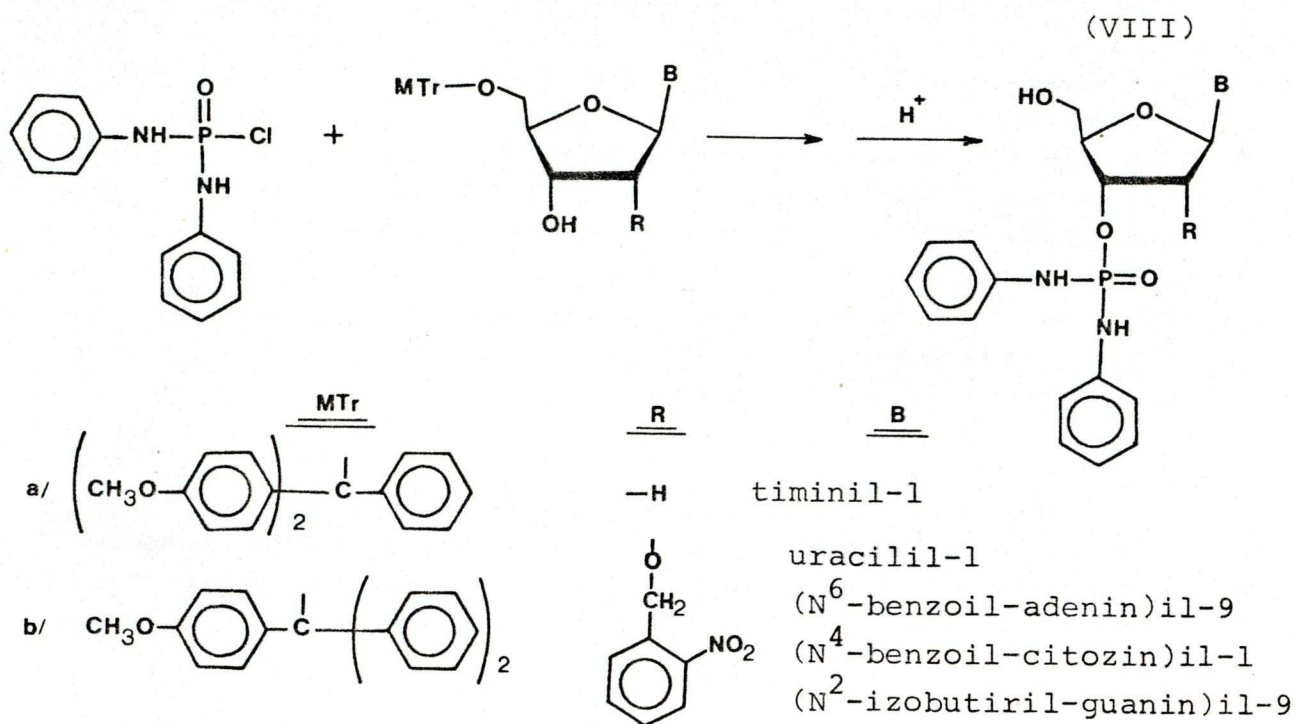
1.3.1. /N-e/ és /O-e/ csoportbeli szintézisek

A nukleozid-foszfodiamidátoknak, szemben az egyszerű alkoholokból származó diamidofoszfát-észterekkel, viszonylag kis számú képviselője ismeretes. A legegyszerűbb szerkezetű ammóniából levezethető nukleozid-foszfodiamidátok első képviselőinek előállítása csak

1975-ben valósult meg. Az irodalom emellett csak dimorfolidátok, dianilidátok és diimidazolidátok szintéziséről tesz említést. Ezeknek a vegyületeknek a szintézise az előző fejezetben leírt elvek alapján történik. A nukleozidszármazékok előállítására használt módszerek - egy kivétellel - vagy az /N-e/, vagy az /O-e/ csoportba tartoznak. Nukleozidokról lévén szó, az előzőekhez képest viszont újabb feladatot jelent annak biztosítása, hogy a reakció csakis a kiválasztott hidroxilcsoportot érintse, és változatlanul hagyja a többi reakcióképes csoportot.

A nukleozid-5'-foszfodimorfolidátok szintézise¹⁹ az /N-e/ csoportba sorolható. A P-N kapcsolatot foszforil-kloridból és morfolinból a (VI) reakció első lépésével azonos módon képezték ki, majd az így kapott dimorfolidofoszforil-kloridot 2',3' helyzetben izopropilidén-csoporttal védett uridinnal, citidinnel és ezek analógjaival reagáltatták. A piridines oldatban, magasabb hőmérsékleten végrehajtott reakció jó termeléssel szolgáltatja a 2',3'-O-izopropilidén-nukleozid-5'-foszfodimorfolidátokat.

Foszfodianilidát-származékok előállítására szintén /N-e/ csoportbeli eljárást használtak. Zieliński és munkatársai 2'-dezoxiribonukleozidokból²⁰ (VIII a), Ohtsuka és munkatársai pedig ribonukleozidokból^{21,22} (VIII b) indultak ki. Mindkét eljárásban 3' helyzetű foszfodianilidát-csoportot építettek ki.



Az 5' védőcsoportot ecetsavas kezeléssel, míg a 2' védőcsoportot ultraibolya-fénybesugárzással távolították el. Az NMR- és UV-spektrumok tanúsága szerint²¹ a di-anilidofoszfóril-klorid a nukleozidok bázisának nitrogénatomjaival is reakcióba lép, de az így létrejött kötések el is bomlanak az ecetsavas kezelés során.

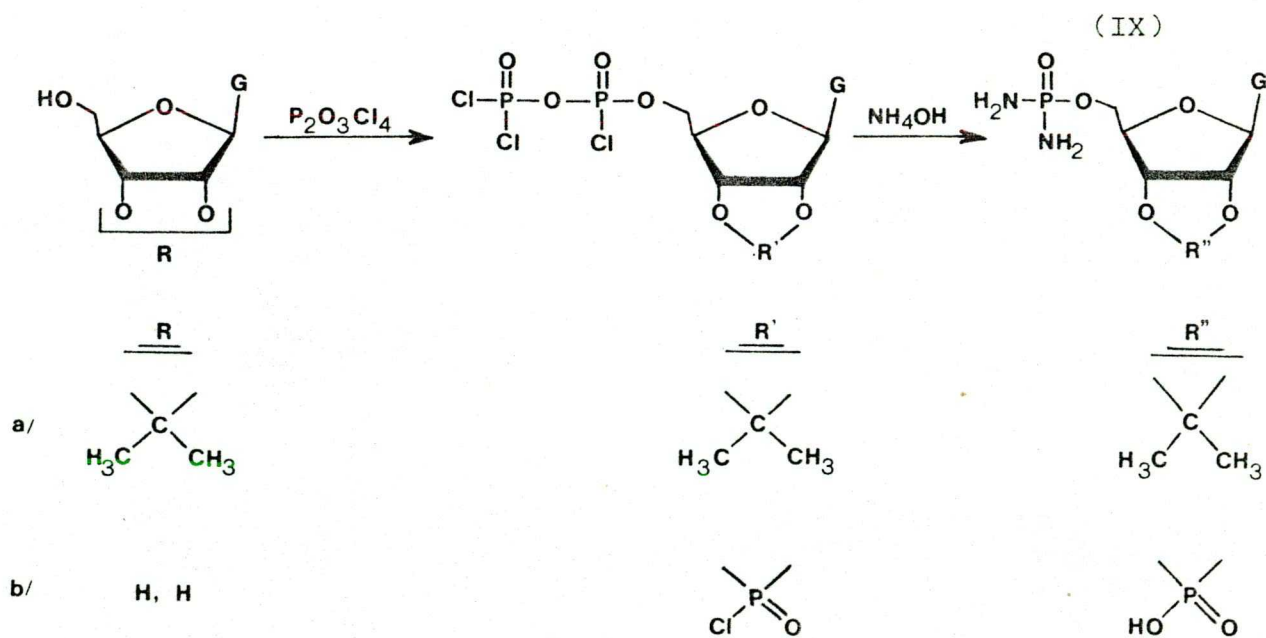
5'-foszfodianilidát-származékot (VIII) reakcióhoz hasonló módon N, O^{2'}, O^{3'}-tribenzoil-citidinből kiindulva alakítottak ki²³.

A timidin-5'-foszfodiimidazolidát előállításáról²⁴

F. Cramer és munkatársai számoltak be. A timidin-5'-diklórfoszfátot imidazollal reagáltatták, (/O-e/ csoport), de a diklórfoszfát-származék szintéziséről nem tettek említést. A reakciót vízmentes közegben hajtották végre, mert az imidazollal képzett savamid kötés gyengébb nukleofil ágensekkel, így vízzel szemben sem ellenálló.



Az ammóniából származó nukleozid-foszfodiamidátok első szintézisét Simoncsits A. és Tomasz J. valósította meg.¹ A szintézisek az /O-e/ csoportba sorolhatók. Védtelen és 2',3'-O-izopropilidén-csoporttal védett guanozinból indultak ki, az észterkötést pirofoszforil-klorid segítségével hozták létre. Az így nyert aktivált közti terméket ammóniumhidroxiddal reagáltatták (IX). A védett származékból 2',3'-O-izopropilidén-guanozin-5'-foszfodiamidát kaptak (IX a). A védtelen guanozinból pedig guanozin-2',3'-ciklofoszfát-5'-foszfodiamidát keletkezett (IX b). Ez úgy értelmezhető, hogy a pirofoszforil-klorid a 2' illetve a 3' OH-csoporttal is reakcióba lép, amit a vicinális cisz hidroxilcsoport részvételével gyűrűzárás követ. Az így kialakuló 2',3'-klórciklofoszfát klóratomja ammónia hatására lecserélődik, de a ciklofoszfamidát vizes közegben nem stabil, ezért ciklofoszfáttá alakul át.



G = guaninil-9

1.3.2. A P-O-C kötés kiépítése régioszelektív foszforilezéssel

A timidin-5'-foszfodiamidát szintézise¹, jóllehet ugyancsak az /O-e/ csoportba tartozik, munkán szempontjából kiemelt jelentőségű, ezért célszerű külön tárgyalni.

Az eljárás kiindulási anyaga védetlen timidin volt. Az észterkötést trimetil-foszfátos oldatban foszforil-klorid alkalmazásával hozták létre. Az első lépésben kialakult aktivált 5'-foszfát-származékot közvetlenül a reakcióelegyben ammóniumhidroxiddal kezelték, és timidin-5'-foszfodiamidátot izoláltak.

A trialkil-foszfátok, amint azt Yoshikawa és munkatársai 1969-ben közzétették²⁵, bármely tercier bázis jelenléte nélkül elősegítik a foszforil-kloriddal történő foszforilezést, és helyettesíthetik a korábban nagy feleslegben használt reagens egy részét is. A trialkil-foszfátok használatának ennél is nagyobb előnye az, hogy jelenlétükben a ribonukleozidok foszforilezése 90-95 %-os régioszelektivitással az 5' OH-csoporton következik be. A dezoxicitidin és a dezoxiinozin foszforilezése azonban csak 73, illetve 64 %-os szelektivitással ment végbe. Az átalakulás során HCl szabadul fel. A szerzők feltevése szerint az így létrejött savas közeg gátolja meg a szekunder hidroxilcsoportok reakcióba lépését. Hogy ezt a hatást fokozzák, néhány kísérletben

kis mennyiségű vizet (a nukleozidra számított 0.5-2 ekvivalenst) adagoltak a reakcióelegyhez. Ezáltal csekély mértékben nőtt az 5' helyzetű foszforilezés részaránya.

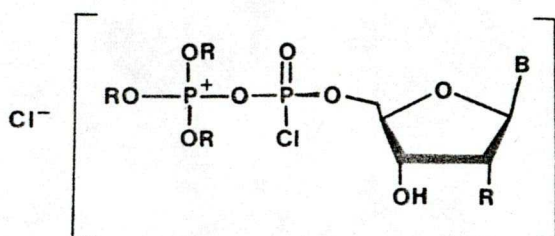
A nukleozidok foszforil-kloriddal történő szelektív foszforilezésének mechanizmusát az eddigi kutatások^{25,26} sem tudták teljesen tisztázni. Valószínűnek látszik azonban, hogy a szelektivitás biztosításához nem elegendő csupán a savas közeg, hanem fontos szerepet játszik a trialkil-foszfát és a foszforil-klorid kölcsönhatása is. Ezért Yoshikawa és munkatársai feltételezték, hogy az aktív foszforilező ágens a két anyag egymásrahatásaként alakul ki a (X) egyenlet szerint²⁵.



R = metil, etil

Valószínűsíthető az is, hogy a foszforilezés primer terméke diklórfoszfát-észter szerkezetű, de egyes szerzők azt sem zárják ki, hogy ez a primer termék az alábbi trimetoxifoszforán-származék²⁷, amely a foszforil-

-klorid és trialkil-foszfát ionos adduktjából alakult ki azáltal, hogy a foszforilezés során nem a trimetoxi-foszforil, hanem egy kloridion volt a távozó csoport.



R = OH vagy H

B = bármely bázis

Véleményem szerint ez utóbbi feltételezés valószínűsége kicsi, de a már kialakult diklór-foszforsav-észter a trialkil foszfáttal (X) reakcióhoz hasonló folyamatban létrehozhatja a fentebb bemutatott trimetoxifoszforán szerkezetet. A (X) reakcióban kialakuló ionos addukt létezése széles körben elfogadottá vált, de legjobb tudomásom szerint létezését máig sem igazolták.

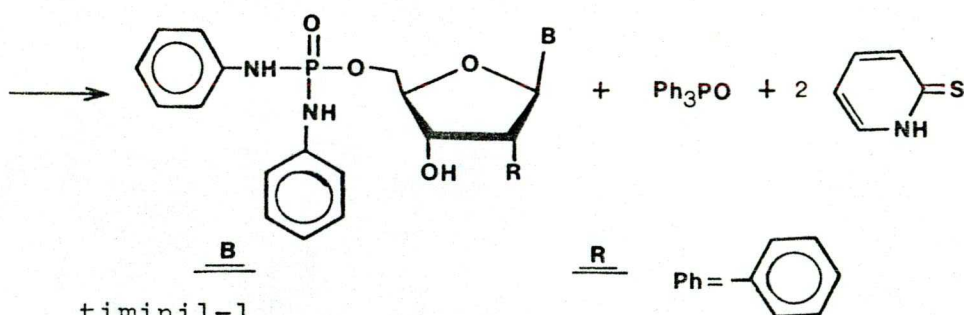
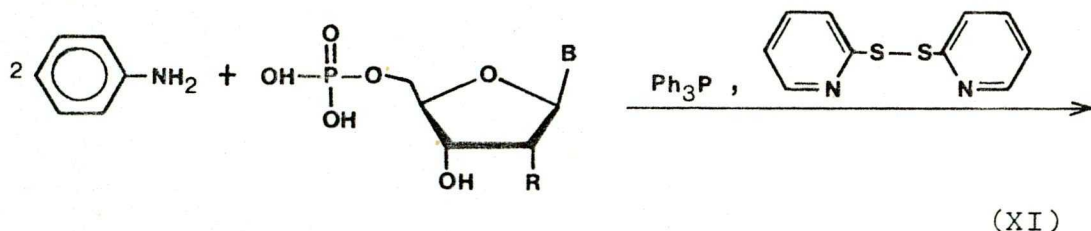
A Yoshikawa-foszforilezés alkalmazása két, közvetlenül egymás után végrehajtott reakciólépésben elérhetővé teszi a nukleozid-5'-foszfodiamidátokat. Ez a módszer egyszerűsége folytán alapját képezheti több új nukleozid-5'-foszfodiamidát szintézisének.

1.3.3. Oxido-redukciós kondenzáció

A nukleozid-5'-foszfodiamidátok előállításának létezik egy, az előzőektől teljesen eltérő megközelítése²⁸. A kiindulási anyag ebben az esetben nem a nukle-

ozid, hanem a megfelelő nukleotid. Egy gyenge oxidálószer és egy gyenge redukálószer keverékének segítségével váltják ki a kondenzációt a nukleotid foszfát-csoportja és az amin között. E kondenzációs lépésben egy molekula víz keletkezik, ennek alkotóelemeit veszik fel a reagensek - a redukálószer az oxigént, az oxidálószer a két hidrogént - és ezáltal segítik elő a kondenzációt.

Trifenil-foszfin és di-(2-piridil)-diszulfid elegyének segítségével 5'-foszfodianilidát-származékokat 60-65 %-os termeléssel tudtak előállítani²⁹ (XI).



timinil-1

(N⁶-benzoil-adenin)il-9 H

(N⁴-benzoil-citozin)il-1 OH

(N²-izobutiril-guanin)il-9 OH

A teljes reakció két egymást követő kondenzációs lépésen keresztül zajlik le, ezért a reakcióelegyben

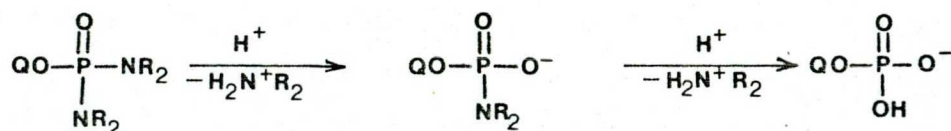
mindig jelen van a közti termék, a megfelelő mono-anilidát-származék is. Az eljárás elsősorban foszfodianilidátok előállítására alkalmas, a foszfodimorfolidátok szintézisében csak gyengébb konverziót tudtak elérni.

1.4. A diamidofoszfát-észterek kémiai sajátosságai

1.4.1. Savkatalizált hidrolízis

A diamidofoszfát-észterek nitrogénatomjai a karbon-savamidok nitrogénjéhez képest jobban megőrzik bázikus tulajdonságukat, mert a tetraéderes konfigurációjú foszforatomon keresztül egyszerű $p\pi-p\pi$ konjugáció nem alakulhat ki³⁰. A nitrogénatomok bázicitása folytán savas körülmények között a P-N kötések meglehetősen bomlékonyak³¹. A diamidofoszforsav-származékok sav hatására hidrolitos átalakuláson mennek keresztül, melynek eredményeképpen ammónia és a megfelelő foszfát-származékok keletkeznek³.

(XII)



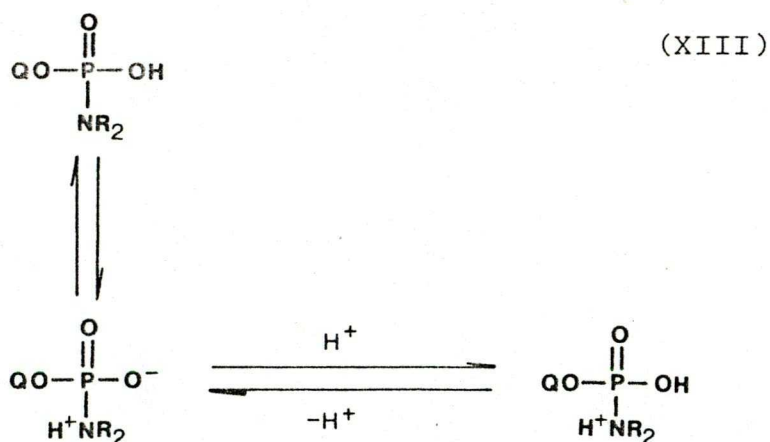
Q,R = H, alkil, aril

A reakció egyes lépései csak néhány esetben ismertek, de igen valószínűnek tűnik, hogy minden foszfodiamidát-származék a (XII) egyenletnek megfelelő két lépésben hidrolizál. Erre a mechanizmusra egyik közvetlen bizonyítékot a szubsztituálatlan nukleozid-5'-foszfodiamidátok (R = H) szolgáltatottak. Kiméletes körülmények között (0.01 N HCl) az egyik amidocsoport szelektíven lehasítható¹, így a (XII) egyenletben feltüntetett közti termék, nukleozid-5'-foszfamidát, keletkezik, amely izolálható, vagy erélyesebb savas behatással (1.0 N HCl) továbbalakítható nukleozid-5'-foszfáttá.

Az N-szubsztituált-foszfodiamidátok körében hasonló szelektív hidrolízisre csak egy példát ismerünk. A fenil-foszfodimorfolidátot hidrogén formáju kationcserélő gyanta segítségével 60 %-ban tudták fenil-foszfomorfolidáttá alakítani¹². A többi vizsgált esetben a hidrolízis közvetlenül foszfát-származékot eredményezett annak ellenére, hogy az amidofoszfát-észterek jól ismert, stabil vegyületek. Ennek kulcsa az amidátok stabilitási viszonyaiban keresendő. Az adenzin-5'-foszfomorfolidát félélettartama 0.1 N kénsavban, szobahőmérsékleten 5 perc³², míg a foszfodimorfolidátok hidrolíziséhez 100 °C-on 2 óráig tartó 0.1 N sósavas kezelés volt szükséges¹⁹. Az első amidocsoport hidrolízisét tehát csak olyan erélyes körülmények közt lehet kiváltani, amelyek között a második P-N kötés

nagy sebességgel felhasad, így a közbűlső állapot nem is detektálható.

A foszfodiamidátok savkatalizált hidrolizisének részletes mechanizmusát tudomásom szerint még nem tanulmányozták. A foszfamidátok hidroliziséről ellenben ismert, hogy a savkoncentráció növekedésével a reakciósebesség erőteljesen nő³⁰, ami arra utal, hogy a foszfamidát protonált alakjának hidroliziskészsége messze felülmúlja a protonálatlan alakét. A reakciót tehát savas közegben (XIII) előegyensúly előzi meg.



Q = H, alkil, aril

Az erősen savas tartományban létező kationos forma és a pH 1-7 tartományban domináns ikerionos alak a P-N kötés heterolizise útján monomolekuláris folyamatban hidrolizál³³. Ha viszont a nitrogénatom bázicitását egy erősen elektronvonzó csoport lecsökkenti, nagy mértékben csökken az N-protonálódás esélye is.

Ezért pl. benzolszulfonil-csoporttal szubsztituált foszfamidátok esetében még 8 M HClO_4 -ben sem tapasztalható savkatalízis³⁴. A fordított kinetikus izotópeffektus, vagyis a reakciósebesség megnövekedése nehézvízben a vízben mért értékhez képest, amelyet a foszfamidátok hidrolízise során több ízben tapasztaltak^{33,35,36} a reakciót bevezető protonálódási lépésre utal. Nagyon valószínűnek látszik, hogy a foszfodiamidátok hidrolízisét ugyancsak hasonló protonálódás vezeti be.

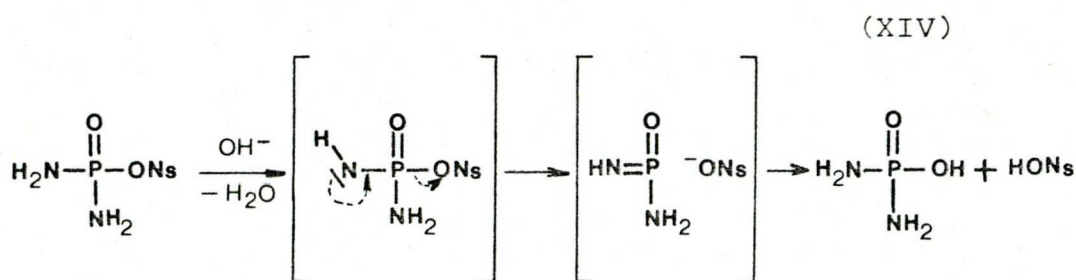
1.4.2. Lugos hidrolízis

A diamidofoszfát-észterek luggal szemben viszonylag jó stabilitást mutatnak. Ez azonban csak a teljesen szubsztituált amido-csoportokat tartalmazó vegyületekre igaz. Amennyiben az amido-nitrogénhez legalább egy hidrogén is kapcsolódik, akkor a vegyület lug hatására a megfelelő alkoholra és diamidofoszfátra bomlik.

Ezt a jelenséget az N-alkil-diamidofoszforil-fluoridok hidrolízisének vizsgálata során tapasztalták először³⁷. Az egymáshoz kémiaailag igen hasonló származékok lugos hidroliziskészségében igen komoly eltérések adódtak. Magyarázatképpen sztérikus hatásokat tétéleztek fel. F.H. Westheimer mutatott rá, hogy itt a hidrolízis mechanizmusának megváltozásáról van szó³⁸. Minden olyan diamidofoszforil-fluorid, amely anomálishan nagy sebességgel reagált lugban, legalább egy amidhidrogént tartalmaz. Ezáltal mód

nyílik egy eliminációs-addíciós mechanizmusra, amelynek közbülső állapota a feltételezett monomer metafoszfát-ion (PO_3^-) analógja. Bizonyítékként összehasonlították a teljesen szubsztituált (N,N,N',N'-tetrametil)-diamidofoszforszil-klorid és a csak két szubsztituenst hordozó (N,N'-dipropil)-diamidofoszforszil-klorid lugos hidrolizisét. Az utóbbi vegyület átalakulásának sebessége az előbbire vonatkoztatva több mint négymilliószorosnak adódott³⁹. Más nukleofilekkel hasonló mértékű eltérést nem tapasztaltak, ami kizárja a sztérikus gátlás feltételezését. A közelmúltban a metafoszfát intermedier létét un. három fázis teszt segítségével sikerült bizonyítani is⁴⁰. Ugyanakkor teljesen szubsztituált amido-csoportokat tartalmazó foszfodiamidát származékok esetében szabályos $\text{S}_{\text{N}}1$ ⁴¹, illetve $\text{S}_{\text{N}}2$ ⁴² mechanizmust találtak.

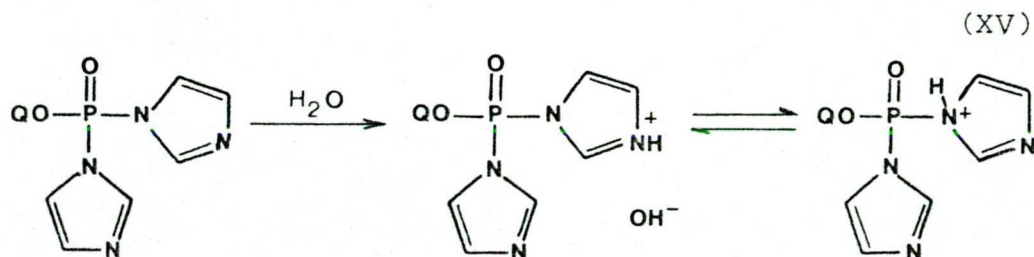
Mindezek alapján joggal tételezték fel, hogy az ammóniából származó nukleozid-5'-foszfodiamidátok feltűnő lugérzékenységének hasonló magyarázata lehet¹. Ezek a vegyületek ui. 0.1 N NaOH hatására 5 perc alatt szobahőmérsékleten teljes egészében nukleoziddá és diamidofoszfáttá bomlanak. A hidrolizis szintén eliminációs-addíciós mechanizmus (XIV) szerint játszódhat le.



Ns = 5'-nukleozidil maradék

A hidroxidion hatására az amid-protonok egyike disszociál. A szabad elektrópár egy új π kötést létesít a foszforatómmal a nukleozidil-anion lehasadása közben. Az így létrejött metafoszfimidát-amidát a többi metafoszfát származékhoz hasonlóan³⁸ igen reaktív, vizaddícióval azonnal stabilizálódik.

A foszfodiimidazolidát-észterek enyhén lúgos közegben a többi foszfodiamidát-származéktól eltérően viselkednek, nem alkohollá és diamidofoszfáttá bomlanak, hanem egy imidazolid-csoport távozásával foszfoimidazolidát-észterekké alakulnak²⁴. Ennek magyarázata feltételezhetően az imidazolgyűrű jellegzetes proton-fel-vevő és -leadó képességében keresendő. Az amid-nitrogén egy annuláris tautomer átalakulás folytán még enyhén lúgos közegben is protonált állapotba kerülhet (XV).



Q = H, alkil, aril



1.4.3. A foszfodiamidát-származékok szintetikus alkalmazásai

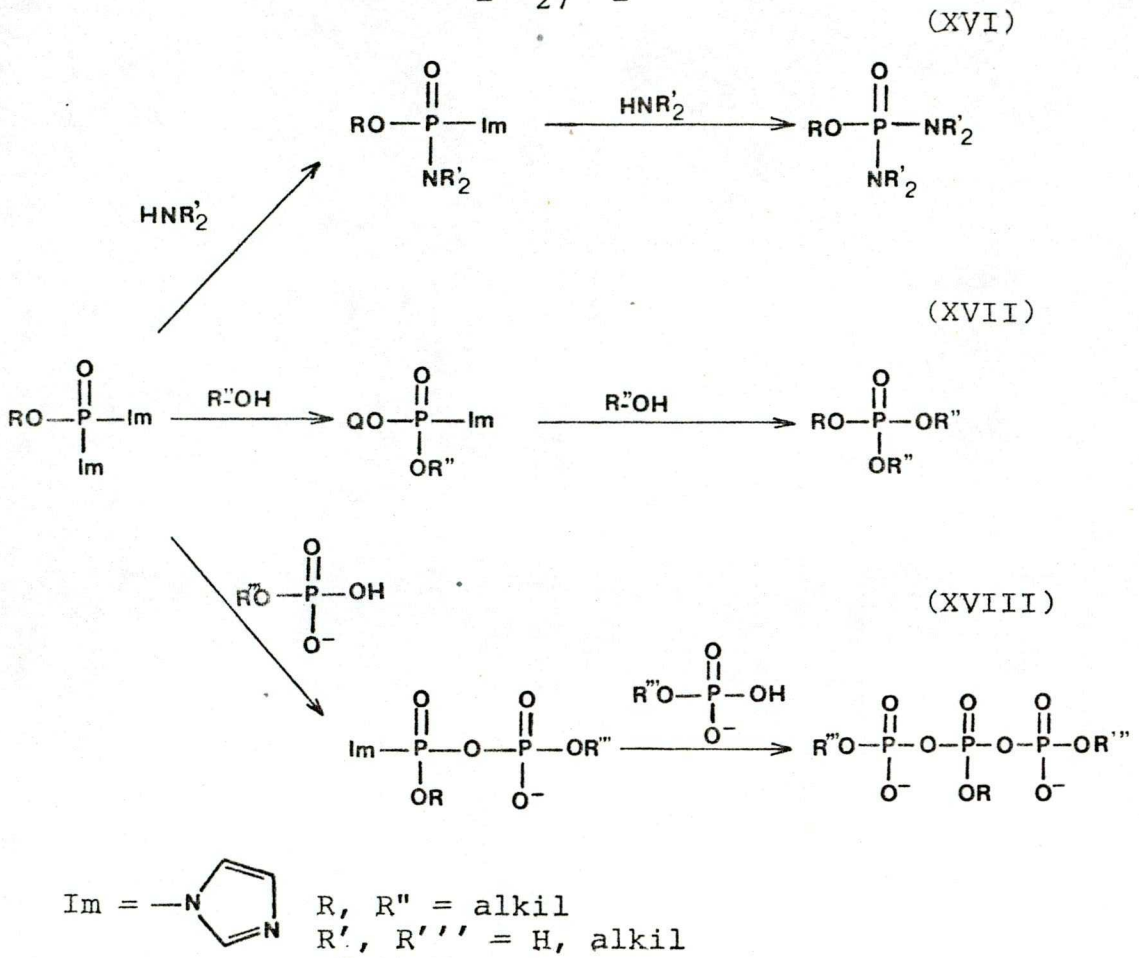
A diamidofoszfát-észtereket az esetek túlnyomó többségében nem célvegyületként, hanem szintetikus intermediereként hozták létre. Ezért kémiai tulajdonságaikról részletesebben a szintézisekben betöltött szerepük adhat felvilágosítást. Ezek az eljárások a szóbanforgó vegyületek két jellegzetes tulajdonságára építenek: a/ a két amido-csoport szubsztituenseitől függően eltérő mértékben, de általában készségesen vesz részt különféle nukleofil szubsztitúciókban, b/ az amido-csoportok megszüntetik a foszfát-csoport disszociációit, és lehetlenné tesznek mindennemű ionos kölcsönhatást, ami a szabad foszfát-észterek esetében fellelhető.

a/ Nukleofil szubsztitúciók

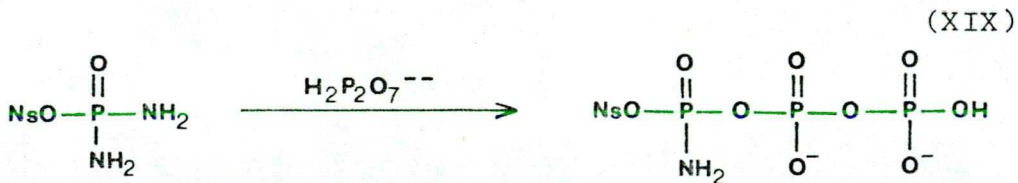
A savkatalizált hidrolizist, amely diamidofoszfát-észterekből foszfát-észterekhez vezet, gyakran alkalmazták foszfát-észterek előállítására^{11,12,19}. Ennek oka, hogy a diamidofoszforil-halogenidek a foszforil-csoport bevitelére sokkal hatásosabb reagensek bizonyultak, mint a foszforil-klorid. A morfolido-csoportokat hidrogén formájú kationcserélő gyanta¹², vagy 0.1 N HCl¹⁹, míg az anilido-csoportokat ecetsavas főzés¹¹ segítségével távolították el. Ez utóbbihoz azonban mellékreakciók, így acilvándorlás és defoszforileződés is társultak⁴³.

Az ammóniából származó nukleozid-5'-foszfodiamidátokról kiméletes savas kezeléssel az egyik amido-csoport szelektíven lehasítható¹. Ilymódon nukleozid-5'-foszfamidátok keletkeznek, amelyek viszont a pirofoszfát-szintézis lehetséges alapanyagai⁴⁴. Ezt a lehetőséget használták ki a guanozin-2',3'-ciklofoszfát-5'-trifoszfát¹ valamint a purinvázis nukleozidokat tartalmazó diribonukleozid-monofoszfátok di- és trifoszfát-származékainak⁴⁵ elkészítése során.

A gyengébben bázikus aminokból származó foszfodiamidát-észterek amido-csoportjai vizen kívül más nukleofil partnerrel is lecserélhetők. A szubsztitúciós készséget tekintve a foszfodiimidazolidátok messze felülmulják a vegyületcsoport többi tagját⁴⁶. Erősebben bázikus aminok vagy ammónia hatására foszfodiamidát észterek (XVI), alkoholok jelenlétében di- és triészterek (XVII), foszfátok vagy foszfát-észterek hozzáadásával pedig piro- és trifoszfát-származékok (XVIII) jönnek létre. A folyamatok két egymást követő szubsztitúcióból állnak, a közbülső termékek minden esetben elkülöníthetők. Az elágazó foszfát-láncot tartalmazó pszeudo-ATP szintézisét a (XVIII) egyenlet (R = adenzinil-5' maradék, R''' = H) szerint tudták megvalósítani⁴⁷.



A nukleozid-5'-foszfodiamidátok szubsztitúciója segítségével két nukleozid-5'-trifoszfát-analóg - szintézisét valósították meg. A P¹-(adenozin-5')-P¹-amido-trifoszfát és a P¹-(timidin-5')-P¹-amido-trifoszfát előállítása⁴⁸ a (XIX) egyenlet szerint történt.



Ns = adenzin-5'-, timidin-5'-maradék

b/ A foszfát-csoport védeése

A szabad foszfátdisszociációk az oligonukleotid egységek szintézise során pirofoszfát-származékok képződéséhez vezető mellékreakciókat okoznak, ezért védésük szükséges.

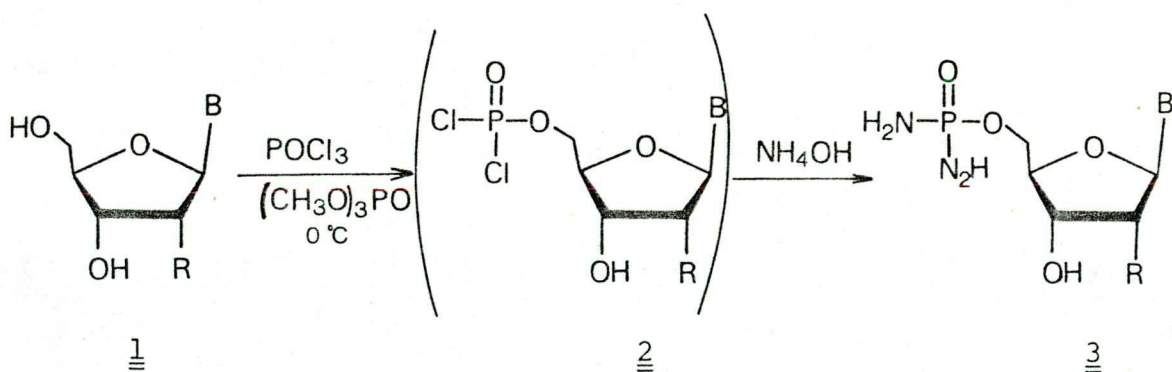
Zieliński, Ohtsuka és munkatársaik az oligonukleotid blokk szintézisének kezdetén foszfát-helyett közvetlenül foszfodianilidát-csoportot építettek be a 3' helyzetbe, és csak a blokk elkészülte után tették szabaddá a 3'-foszfát-terminálist, hogy ezáltal alkalmassá váljék egy másik oligomerrel való összekapcsolásra²⁰⁻²². Az anilido-csoportokat egy izoamil-nitrittel végrehajtott nitrozálási reakció segítségével távolították el. E módszer széleskörű alkalmazásának határt szab az a tény, hogy az anilido-csoportok lehasítása folyamán esetenként a nukleozidok részleges dezaminálódása is bekövetkezik.

A szubsztituátlan foszfodiamidát-csoportot timidilát dimerek szintézisében alkalmazták védett foszfátként az 5'-helyzetben⁴⁹. Kiméletes savas hidrolizissal 5'-foszfamidát-, erélyesebb savas körülmények között pedig 5'-foszfát terminális dimert nyertek. Az előbbi származék előnye, hogy közvetlenül felhasználható a pirofoszfát szintézisekben. A foszfodiamidát-csoport nem tekinthető azonban ideális védőcsoportnak, mert a kapcsoláskor jelenlévő foszfát-komponens hatására létrejöhethet egy (XIX) típusú átalakulás is.

2. Néhány nukleozid-5'-foszfodiamidát előállítása

2.1. A szintézisut

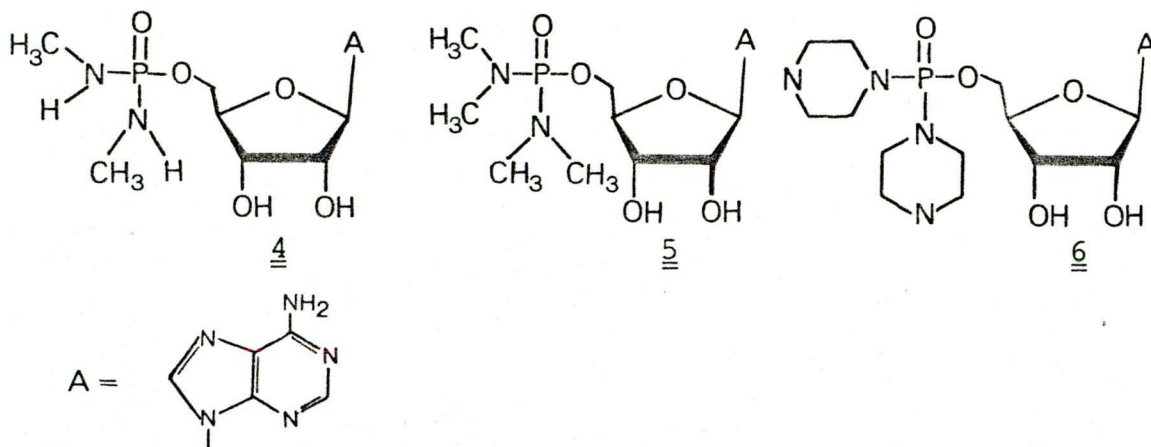
A nukleozid-5'-foszfodiamidátok P-O-C kötését a Yoshikawa és munkatársai által kidolgozott regio-szelektív foszforilezés²⁵ segítségével építettem ki az első lépésben, tehát ez az eljárás az /O-e/ csoportba sorolható. A védetlen nukleozidokat (1a-e) foszforil-kloriddal trimetil-foszfátban reagáltattam, majd az így keletkező nukleozid-5'-diklórfoszfátokat (2a-e) izolálás nélkül, 7.0 N ammóniumhidroxiddal vittem reakcióba.



<u>B</u>	<u>R</u>
a/ adenilil-9	OH
b/ citozinil-1	OH
c/ guanilil-9	OH
d/ uracilil-1	OH
e/ timinil-1	H

Ezzel a reakciósorral állítottam elő a négy fő ribonukleozid (1a-d) (adenozin, citidin, guanozin, uridin) és a timidin (1e) 5'-foszfodiamidát származékát (3a-e).

Elvégeztem három adenzin sorba tartozó, N-szubsztituált foszfodiamidát származék szintézisét is. Ebben az esetben a foszforilezés elsődleges termékét (2a) ammóniumhidroxid helyett in situ metilamin, dimetilamin, ill. morfolin vizes oldatával reagáltattam, így adenzin-5'-(N,N'-dimetil)-foszfodiamidátot (4), adenzin-5'-(N,N,N',N'-tetrametil)-foszfodiamidátot (5), illetve adenzin-5'-foszfodimorfolidátot (6) kaptam.



Az egyes szintézisek termelési adatait és a termékek olvadáspontját a Kísérleti részben található 9. táblázatban tüntettem fel.

2.1.1. A Yoshikawa-foszforilezés²⁵

A nukleozid-5-foszfodiamidátok előállításához a nukleozid 1 mmol-jára számított 2.2 mmol foszforil-

-kloridot és 22 mmol trimetil-foszfátot használtam fel. A trimetil-foszfát a reakció szempontjából igen kedvező oldhatósági körülményeket biztosított, mert az oldhatatlan nukleozid az átalakulás előrehaladtával fokozatosan feloldódott, végül homogén oldatot kaptam.

A foszforilezés sebességét igen erősen befolyásolta a nukleozid bázicitása. A reakcióidőket, a nukleozidok bázisának első protonálódására vonatkozó pK_a értékeket és a konverziókat az 1. táblázatban tüntettem fel.

1. Táblázat

Nukleozid	pK_a^{50}	Reakció- idő (óra)	Konverzió ^{a/} (%)
Citidin (<u>1b</u>)	4.15	1	99
Adenozin (<u>1a</u>)	3.5	1	97
Guanozin (<u>1c</u>)	1.6	2	91
Uridin (<u>1d</u>)	-	7	86
Timidin (<u>1e</u>)	-	7	80

a/ a foszforilezésre vonatkoztatva

Minél bázikusabb tehát egy nukleozid, annál gyorsabban foszforileződik, és annál magasabb konverzió érhető el. A reakcióidő további növelése nem volt célszerű, mert a meghosszabbított időtartam alatt főként a többszörös foszforilezés részaránya növekedett, és ezáltal a hozam alig változott.

Az adenzin- és a timidin-5'-foszfodiamidát (3a,e) előállítására kapcsán megvizsgáltam a módszer kidolgozóit által javasolt vizadagolás hatását. Ennek eredményeit a 2. táblázat tartalmazza.

2. Táblázat

A vizadagolás hatása a foszforilezésre

Nukleozid (1 mmol)	POCl ₃ (mmol)	H ₂ O (mmol)	Reakció- idő (óra)	Konverzió (%)
Adenzin (<u>1a</u>)	2.2	0	1	97
	8	3	6	98
Timidin (<u>1e</u>)	2.2	0	7	80
	8	3	7	41

A víz hatására a reakciók jelentősen lelassultak, a táblázatban feltüntetett konverziókat ugyanakkor csak majdnem négyszeresére növelt reagensfelesleggel sikerült elérni. Mivel tapasztalataim szerint a termékösszetételben a víz hatására jelentős változás nem történt, viszont a foszforil-klorid feleslege erősen megnehezítette a termék izolálását, ezért kísérleteimben nem alkalmaztam vizadagolást. A reakciók szelektivitása így is teljesen megfelelt a Yoshikawa és munkatársai által megadott mértéknek²⁵.

2.1.2. Az aminolizis

A foszforilezés elsődleges termékének aminolizise vizes közgben is jó hatásfokkal ment végbe. A viszonylag lomhán hidrolizáló diklórfoszforil-származékok (2) a viznél lényegesen nukleofilabb ammóniával, illetve aminokkal pillanatszerű hőtermelő átalakulásban vettek részt.

Az ammonolizishez, illetve az aminolizishez alkalmazandó optimális ammónia-, illetve aminkoncentráció meghatározását három párhuzamos sarzs összehasonlításából állapítottam meg. Az adenzin-5'-diklórfoszfátot (2a) 1.0; 7.0 és 14.0 N ammóniumhidroxidban reagáltattam el. Az első esetben 74 %, a másodikban 85 %, míg a harmadik esetben 83 % termeléssel tudtam a (3a) végterméket izolálni. Ezért a további kísérletekben 7.0 N ammóniumhidroxid, illetve amin oldatokat használtam fel.

Az ammóniából és az erősen bázikus aminokból jó termeléssel keletkeztek a megfelelő foszfodiamidátok (3-6). A vizes oldatban végrehajtott aminolizisnek azonban határt szab az alkalmazni kívánt amin alacsony nukleofilitása és vizoldékonysága. A kidolgozott eljárás szerint megpróbálkoztam adenzin-5'-foszfodianilidát előállításával is, de sikertelenül. A (2a) közti termék átalakítását 7.0 N vizes anilinban (pK_a : 4.70) játszottam le, de az átalakulás több termékből álló összetett elegyet eredményezett, mert a lassu aminolizis mellett a kompetitív

2.1.2. Az aminolizis

A foszforilezés elsődleges termékének aminolizise vizes közgben is jó hatásfokkal ment végbe. A viszonylag lomhán hidrolizáló diklórfoszforil-származékok (2) a viznél lényegesen nukleofilabb ammóniával, illetve aminokkal pillanatszerű hőtermelő átalakulásban vettek részt.

Az ammonolizishez, illetve az aminolizishez alkalmazandó optimális ammónia-, illetve aminkoncentráció meghatározását három párhuzamos sarzs összehasonlításából állapítottam meg. Az adenzin-5'-diklórfoszfátot (2a) 1.0; 7.0 és 14.0 N ammóniumhidroxidban reagáltattam el. Az első esetben 74 %, a másodikban 85 %, míg a harmadik esetben 83 % termeléssel tudtam a (3a) végterméket izolálni. Ezért a további kísérletekben 7.0 N ammóniumhidroxid, illetve amin oldatokat használtam fel.

Az ammóniából és az erősen bázikus aminokból jó termeléssel keletkeztek a megfelelő foszfodiamidátok (3-6). A vizes oldatban végrehajtott aminolizisnek azonban határt szab az alkalmazni kívánt amin alacsony nukleofilitása és vizoldékonysága. A kidolgozott eljárás szerint megpróbálkoztam adenzin-5'-foszfodianilidát előállításával is, de sikertelenül. A (2a) közti termék átalakítását 7.0 N vizes anilinban (pK_a : 4.70) játszottam le, de az átalakulás több termékből álló összetett elegyet eredményezett, mert a lassu aminolizis mellett a kompetitív

reakciók is érvényre jutottak. Az anilinhoz hasonló gyengén bázikus vagy sztérikusan erősen gátolt aminokból származó foszfodiamidátok előállítására tehát csak a vízmentes közegben végrehajtott aminolízis alkalmas.

2.1.3. A termékek szerkezetének igazolása

A nukleozid-5'-foszfodiamidátok (3-6) kémiai szerkezetét tömegspektrometria, ultraibolya- és ^{13}C NMR-spektroszkópia segítségével valamint kémiai lebontásokkal igazoltam.

A molekulasúly pontos meghatározását a nukleozid-5'-foszfodiamidátok trimetilszilil-származékain kellett elvégezni, mert a szubsztituálatlan diamidofoszforil-csoportot tartalmazó vegyületek (3a-e) a nagyfelbontású tömegspektrum felvételi körülményei között elbomlottak. Az így nyert molekulasúlyok jó pontossággal megegyeznek a számított értékekkel.

A nukleozid-származékok UV-spektruma pH függő, mivel a kromofórok különböző pH-tartományban ionizálódó csoportokat tartalmaznak. Ezért a 3-6 vegyületek spektrumát a nukleotidkémiaiában szokásos módon 3 pH-értéken, 2.0; 7.0 és 11.0, regisztráltam. Az így kapott ultraibolya abszorpciós spektrumok gyakorlatilag megegyeztek a megfelelő nukleozidok azonos körülmények közt felvett spektrumával⁵⁰, ami a kromofór szubsztituálatlanságára utal.

A 4, 5, 6 vegyületek ^{13}C NMR-spektrumainak elemzése teljes egészében alátámasztotta a molekulák feltelezett szerkezetét.

A tömeg-, az ultraibolya- és ^{13}C NMR spektrumok jellemző adatait a Kísérleti részben található 9; 10; illetve 11. táblázat tartalmazza.

Kémiai lebontások. A termékek, melyek ioncserés viselkedésük alapján bizonyíthatóan szabad ionos disszociációval nem rendelkeztek, 1.0 N HCl hatására negatív töltésű vegyületekké alakultak, amelyeket vékonyréteg-kromatográfiásan a megfelelő nukleozid 5'-foszfátjaként (26a-e) azonosítottam. 3a-e termékek esetében ammónia keletkezését is kimutattam Nessler-reagens segítségével. 4, 5, 6 vegyületek hidrolizátumában a Nessler-reagens hatására fehér csapadék keletkezett. A savas behatással kapott anyagokat Escherichia coli alkálikus foszfatazzal kezelttem. Az enzimes emésztés eredményeképpen minden esetben a megfelelő kiindulási nukleozidot (1a-e) kaptam vissza.

2.2. Mellékreakciók, melléktermékek

A nukleozid-5'-foszfodiamidátok reakcióelegyében a főtermék és az elreagálatlan nukleozid mellett mindig megtalálhatók voltak bizonyos melléktermékek. Az adenozin-5'-foszfodiamidát (3a) kapcsán elvégeztem a reakcióelegy teljes analizisét. Az oszlopkromatográfiás



elválasztás után vékonyréteg-kromatográfiával és lebontásokkal azonosítottam az egyes vegyületeket, mennyiségi megoszlásukat pedig UV abszorpciómérés alapján határoztam meg, és így a következő mennyiségi megoszlást kaptam:

1/ Adenozin-5'-foszfodiamidát (<u>3a</u>)	86.0 %
2/ Adenozin (<u>1a</u>)	2.9 %
3/ Adenozin-5'-foszfodiamidát-2',3'-ciklofoszfát (<u>13a</u>)	0.4 %
4/ Adenozin-2'3'-ciklofoszfát (<u>14a</u>)	2.3 %
5/ Adenozin-2'(3')-foszfát (<u>16a</u>)	2.0 %
6/ 1-Metil-adenozin-5'-foszfodiamidát (<u>22</u>)	0.5 %
7/ Adenozin-5'-foszfamidát (<u>25a</u>)	5.2 %
8/ Adenozin-5'-foszfát (<u>26a</u>)	0.7 %

Más nukleozidokból kapott reakcióelegyekben a melléktermékek aránya más és más, de típus szerint megtalálható volt benne minden egyes, itt felsorolt vegyület. Az egyes anyagok eredetének vizsgálata közben bebizonyosodott, hogy a melléktermékek három különböző típusu mellékreakció, aszelektív foszforilezés, bázismetilezés és hidrolízis, eredményeképpen jöttek létre.

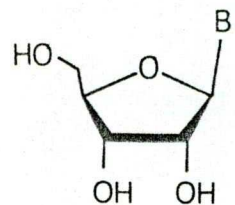
2.2.1. A foszforilezés aszelektivitása

A felsorolásban szereplő első három melléktermék (13a, 14a, 16a) közös szerkezeti vonása a 2',3' helyzet-

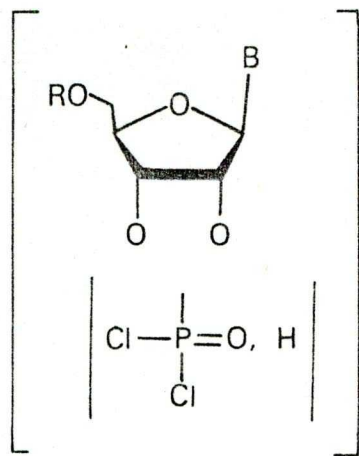
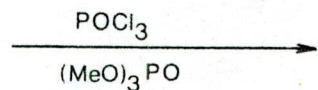
ben lévő foszfát- vagy ciklofoszfát-csoport. Ezek a származékok tehát csakis a foszforilezés aszelektivitásából származhattak, ami a módszer eredeti leírásának²⁵ ismeretében várható is volt. A 3a vegyület előállításánál az aszelektív foszforilezés aránya 4.7 %-nak adódott.

A 13, 14, 16 melléktermékek keletkezéséhez vezető utat a következő átalakulási séma szemlélteti. A ribonukleozidok szekunder hidroxilcsoportjának foszforilezésekor 2',3'-klórciklofoszfátok (9, 10) keletkeznek, mert az első lépésben létrejövő diklórfoszfát (7,8) azonnal továbbalakul a vicinális helyzetű hidroxilcsoport hatására végbemenő intramolekuláris szubsztitúcióban⁵¹. A klórciklofoszfát származék (9,10) ammonolízise átmenetileg 2',3' ciklofoszfamidátot (11,12) eredményez, de a szubsztituálatlan amido-csoportot tartalmazó öttagu foszfodiészter-gyűrűk vizes közegben instabilak^{1,52}. Ezért 11, 12 vegyületek helyett csak annak hidrolíziséből származó 2,3'-ciklofoszfát-származékokat (13,14) lehetett izolálni. A 13 és 14 vegyületekben a foszfodiészter-gyűrű felnyílhat, ezért jelent meg a melléktermékek közt az adenozin-2'-, illetve 3'-foszfát is (16a).

Némiképp módosult a helyzet, amikor metilamint, dimetilamint vagy morfolint használtam az aminolízishez. Az N-szubsztituált ciklofoszfamidok ugyanis jóval stabilabbak⁵³ a szubsztituálatlanoknál, ezért ezekben az

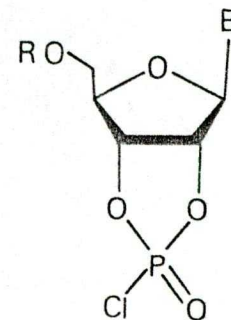


1



7 R = P(O)Cl₂

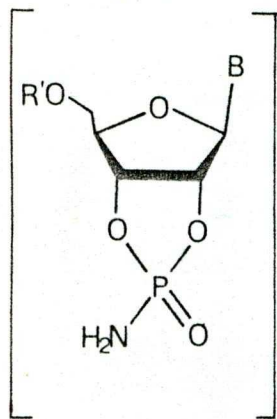
8 R = H



9 R = P(O)Cl₂

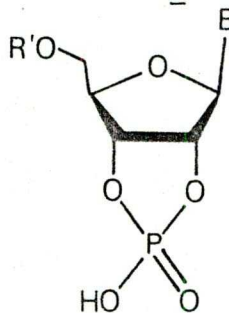
10 R = H

1
38
1



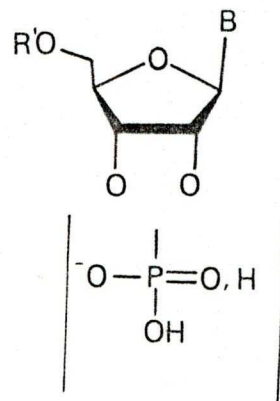
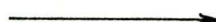
11 R' = P(O)(NH₂)₂

12 R' = H



13 R' = P(O)(NH₂)₂

14 R' = H



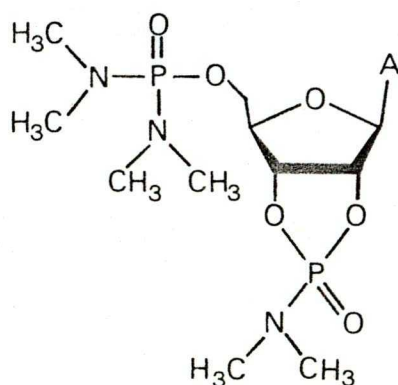
15 R' = P(O)(NH₂)₂*

16 R' = H

a/ adeninil-9
b/ citozinil-1
c/ guaninil-9
d/ uracilil-1

*Nem volt jelen kimutatható mennyiségben.

esetekben nem 13-16 vegyületekkel analóg szerkezetű melléktermékek, hanem N-szubsztituált ciklofoszfamidok létrejöttére kell számítani. Dimetilaminnal végrehajtott aminolízis után például 5 főtermék mellett adenzin-5'-(N,N,N',N'-tetrametil)-foszfodiamidát-2',3'-(N,N-dimetil)-ciklofoszfamidát (17) keletkezése várható, ezt a vegyületet azonban nem izoláltam.



17

A = adeninil-9

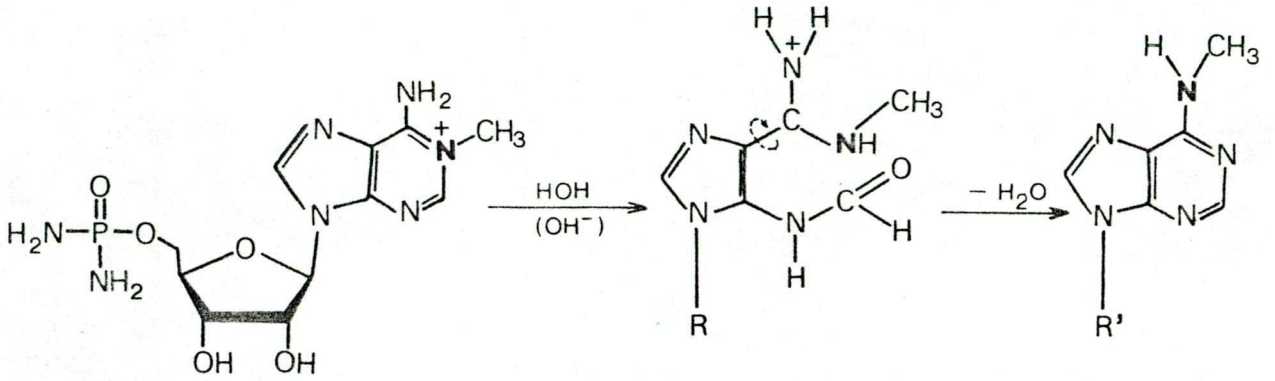
A szelektív foszforilezés kidolgozói módszerüket elsősorban a ribonukleozidok körében alkalmazták. A dezoxiribonukleozidok foszforilezésének szelektivitásáról az 5' és a 3' izomer rossz elválaszthatósága miatt csak a ^{31}P NMR technika segítségével sikerült pontos választ kapni⁵⁴. Ezek szerint a 2' hidroxilcsoport hiánya miatt a reakció irányítottsága gyengébb, a Yoshikawa-foszforilezés²⁵ azonban a védett nukleozidok használatával szemben - termelés és egyszerűség

ban kationos természetű. A vegyület UV-spektruma (10. táblázat) erősen eltért az adenzinétől, viszont igen jó egyezést mutatott az l-metil-adenozinével⁵⁰. Az illető anyag mennyisége 0.4-1.0 % között volt az egyes kísérletekben. A nukleozid-5'-foszfodiamidátoknál használt savas és enzimatis lebonatást alkalmazva erre a vegyületre, olyan anyagot kaptam, amely minden tekintetben megegyezett az l-metil-adenozinnal. Mindezek alapján arra következtettem, hogy a szóbanforgó melléktermék l-metil-adenozin-5'-foszfodiamidát (22). Ez összhangban van Jones és munkatársai eredményeivel⁵⁶, akik azt találták, hogy a nukleozidok metileződése először mindig a legnagyobb elektronsűrűségű nitrogénatomon következik be, és ez az adenzinnál az l-es helyzetben lévő.

Az endociklusos nitrogénen szubsztituált amino-N-heterociklusok átrendezőési készsége Dimroth-átrendezőés⁵⁷ néven ismeretes, melynek során az exociklusos amino-csoporton szubsztituált N-heterociklusok keletkeznek. Lug hatására ez az átrendezőés az l-metil-adenozin esetében is végbemegy, N⁶-metil-adenozin (23), keletkezik⁵⁸.

A (3a) származék előállításá során kapott vegyületben (22) hig lugos közeg hatására a foszfodiamidát-csoport távozásával párhuzamosan ugyancsak létrejött ez az átrendezőés. N⁶-metil-adenozin (23) keletkezett. Az átrendezőés, amint azt kinetikai mérések⁵⁹ és ¹⁵N jelölés⁶⁰ segítségével bizonyították,

gyűrűfelnyílást követő rotáción és ismételt gyűrűzáráson keresztül játszódik le az alábbi mechanizmus szerint.



22

23

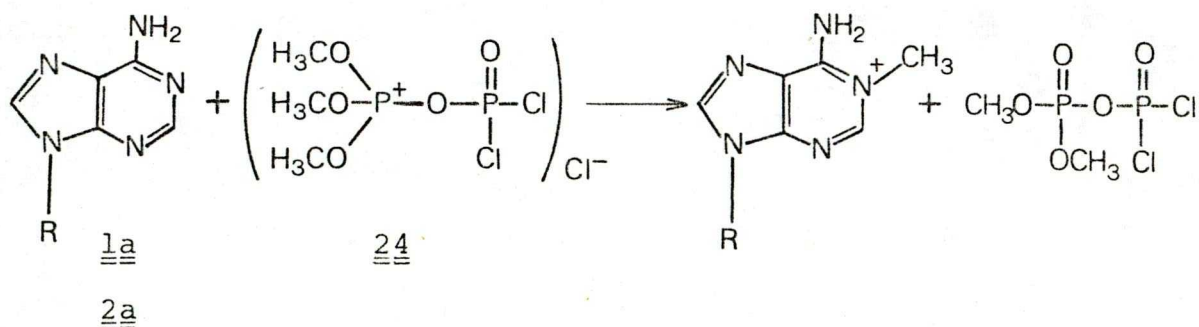
R = (5'-diamidofoszforil)-ribozil-1'
vagy ribozil-1'

R' = ribozil-1'

A vékonyréteg-kromatogramok tanúsága szerint a metilezés minden egyes felhasznált nukleozid esetében előfordult. Legnagyobb mértékben a citidin, legkisebb mértékben pedig az uridin esetében, ami megfelel a nukleozidok ismert metileződési hajlamának. A metilezés az uridinnál és a citidinnél a 3-as, a guanozinnál a 7-es nitrogénatomon várható⁶¹.

Yamauchi és munkatársai részletesen megvizsgálták a trimetil-foszfátnak a nukleozidokra kifejtett hatását⁶¹⁻⁶³. A 12 órás, 37°C-on, vizes oldatban végrehajtott reakcióban pH 7-en 9 %, pH 9.8-on pedig 8 % 1-metil-adenozin keletkezett a trimetil-foszfát hatására adenozinból. Ez tehát a metilezett melléktermékek keletkezésének egyik lehet-

séges magyarázata. Feltételezésem azonban az volt, hogy az észlelt mértékű metilezést az adott körülmények között (1 óra, 0°C) nem okozhatta csupán a trimetil-foszfát. A Yoshikawa-foszforilezés²⁵ során foszforil-kloridból és trimetil-foszfátból (X) reakció-szerint létrejövő komplex (24), nemcsak a foszforilcsoport lehasadásával, hanem a metilcsoport lelépésével is tud stabilizálódni. Feltételeztem, hogy ennek a szerkezetnek a metilezési készsége nagyobb, mint a trimetil-foszfáté.



R = (5'-diklórfoszforil)-ribozil-1' vagy ribozil-1'

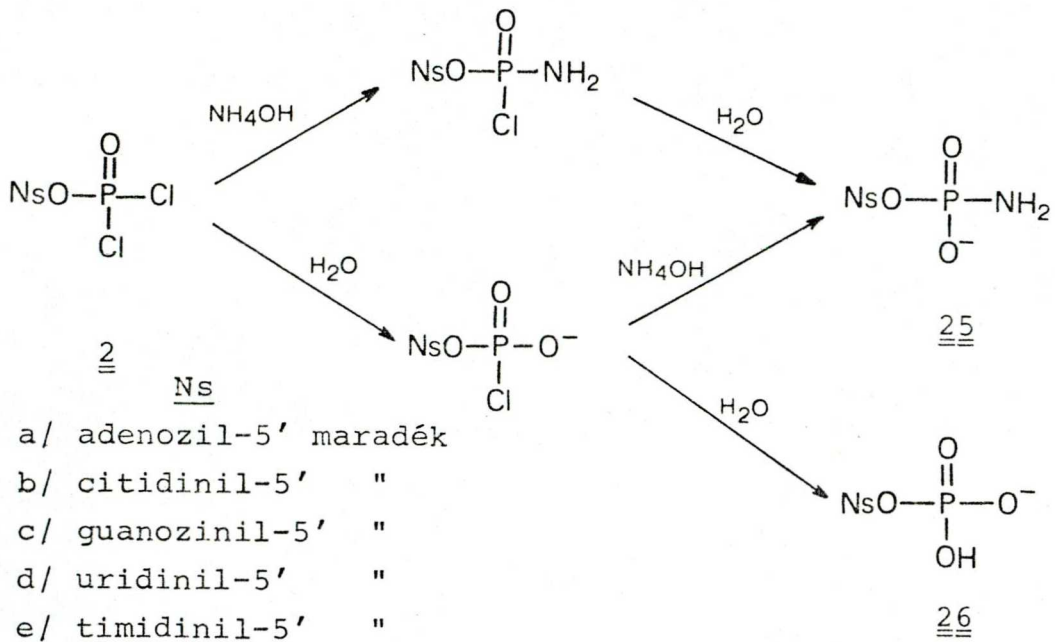
Annak eldöntésére, hogy a metilezés csak az első, vagy mindkét uton lehetséges, ellenőrző kísérletet végeztem. Az adenzin-5'-foszfodiamidát (3a) szintézisének lépéseit úgy hajtottam végre, hogy POCl₃-t nem adtam a reakcióelegybe. Feltételezve, hogy ez a bázison lezajló változásokat nem befolyásolja, adenzin (1a) helyett a trimetil-foszfátban jól oldódó 2',3'-O-izopropilidén-adenzint használtam. Az ily módon keletkezett metilezett

anyagot ioncserés kromatográfia segítségével elválasztottam, spektrálisan azonosítottam, mennyiségét abszorpciómérés alapján meghatároztam.

Ez a kísérlet mindössze 0.055 % l-metil-származékot eredményezett, szemben a szokásos 0.4-1.0 %-kal. Ezáltal beigazolódott, hogy a nukleozid-5'-foszfodiamidátok előállításánál létrejövő metilezett melléktermékek legnagyobb hányada a foszforil-klorid és a trimetil-foszfát együttesének hatására jön létre, és hogy ez a foszforilező elegy erélyesebb metilező képességgel rendelkezik, mint a trimetil-foszfát egymaga.

2.2.3. Aminolízis helyett hidrolízis

A vizes közegben kivitelezett ammono-, ill. aminolízis szükségszerű kompetitív reakciója a hidrolízis. Ezért a melléktermékek harmadik csoportjába ezek a vegyületek tartoznak, amelyek a nukleozid-5'-diklórfoszfátok (2) hidrolíziséből származnak. A két P-Cl kötés egyikének hidrolitikus hasadásakor nukleozid-5'-foszfamidátok (25), mindkettő hidrolitikus hasadásakor pedig nukleozid-5'-foszfátok (26) keletkeznek.



Az erősebben nukleofil aminok a hidrolitikus mellékreakciókat háttérbe szorítják, ezért az N-szubsztituált foszfodiamidátok (4, 5, 6) mellett az ilyen típusú melléktermékek jóval kisebb mennyiségben fordulnak elő.

2.3. A termékek izolálása

A diklórfoszfát-észtereknek közvetlenül a reakcióelegyben végrehajtott aminolizise a reakció kivitelezésében komoly egyszerűsítést tesz lehetővé, viszont valamivel nagyobb elválasztástechnikai problémát jelent a főtermék izolálása során. A nehézséget elsősorban a foszforil-klorid feleslegének aminoliziséből származó foszforil-triamid, diamido-foszfát, amido-foszfát, pirofoszfát-származékok, foszfát és klorid jelenléte okozza.

A nukleozid-5'-foszfodiamidátok tisztítására oszlopkromatográfiás eljárásokat találtam célravezetőnek. Az előállított vegyületek között igen komoly oldékonyságbeli és polaritásbeli különbségek vannak. A purin-származékok (3a, c) még vízben is rosszul oldódnak, míg az N-szubsztituált foszfodiamidátok (4, 5, 6) vízben, etanolban, sőt acetonban is jó oldékonyságot mutatnak. Ezért az összes anyagra érvényes kromatográfiás módszert nem sikerült kidolgozni. Az elválasztásokat három különböző rendszerben tudtam megvalósítani.

Az ammóniából származó nukleozid-5'-foszfodiamidátok közül a pirimidin-bázissal rendelkezők (3b, d, e) megtisztítására szilikagélen végrehajtott adszorpciós oszlopkromatográfia volt alkalmas. Az eluciós sorban a metilezett melléktermék, és az elreagálatlan nukleozid együtt jelent meg, majd ezt követte a főtermék. A nukleozidok aszelektív foszforilezéséből és a foszfodikloridátok (2b, d, e) hidrolíziséből származó vegyületek (13, 14, 16 b,d) és (25, 26, b,d,e) nagy polaritásuk miatt igen erősen kötődtek a szilikagélhez. A timidin (1e) aszelektív foszforilezése folytán keletkező 3'-foszfodiamidát-származékok (20, 21) a főtermékkel együtt eluálódtak az oszlopról. A végső kristályosítás során azonban ezeket a szennyező anyagokat is sikerült eltávolítani.

Az N-szubsztituált adenzin-5'-foszfodiamidátok (4, 5, 6) oldhatósága lehetővé tette volna a szilika-

gelen végzett adszorpciós kromatográfiát, de a főtermék és a POCl_3 -ből keletkező szubsztituált amido-foszfátok rossz elválása ezt a próbálkozást megghiúsította. Ehelyett a C. A. Dekker által kidolgozott módszer⁶⁴ vezetett eredményre. Az elválasztás hidroxil formában lévő erős anioncserélő gyantán történt. Ebben a rendszerben a gyanta és a nukleozid-származékok szabad hidroxilcsoportjai között kialakuló erős hidrogénhidás és ionos kölcsönhatás tartja vissza az egyes anyagokat az oszlopon, következésképpen a több hidroxilcsoportot tartalmazó molekulák később eluálódnak. Az effluensben elsőként a pozitív töltésű metilezett származék és az aszelektív foszforilezés terméke jelent meg. Ezt követte a két szekunder hidroxilcsoportot tartalmazó főtermék, majd ezután következett a nukleozid (1a), amelyet megnövelt metanol-koncentráció mellett lehetett eluálni. A hidrolizisből származó anyagok anionos természetűek, ezért ezeket az oszlop igen erősen megkötötte.

A purinvázis foszfodiamidátok (3a,c) izolálására az adszorpciós kromatográfia rossz oldhatóságuk miatt, a Dekker-féle elválasztás⁶⁴ pedig lugos közegben mutatott instabilitásuk miatt volt alkalmatlan. Ebben az esetben egy módosított Dekker-elució bizonyult megfelelőnek. A formiát-ciklusú erős anioncserélő gyanta és a purinvázis nukleozidszármazékok között fellépő másodlagos kötőerők

elegendőek voltak ahhoz, hogy jó elválást hozzanak létre. Az eluciós sorrend az előzőhöz hasonlóan alakult: metilezett melléktermék, főtermék, nukleozid. Az összes többi melléktermék anionos, ezeket csak sógradiens segítségével lehetett eluálni.

A termékeket a vékonyréteg-kromatográfiás ellenőrzések szerint tisztán tudtam kinyerni. Az izolálást kristályosítással fejeztem be.



3. A NUKLEOZID-5'-FOSZFODIAMIDÁTOK TULAJDONSÁGAI

3.1. Az adenzin-sorozat oldhatósága

A nukleozid-származékok oldhatósági viszonyait nagy mértékben bázisuk minősége szabja meg. Ezért okozott meglepetést az adenzinből előállított 5'-foszfodiamidátok sorozata (1a, 4, 5, 6), amelyben a vizoldékonyságot tekintve igen komoly különbségek adódtak (3. táblázat).

3. táblázat

Adenzin-5'-foszfodiamidátok vizoldékonysága 25°C-on

Vegyület	<u>1a</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
Vizoldékonyság mg/ 1 ml víz	6-8	900-950	1400-1500	1400-1500

A megszokottól eltérően - az alkilcsoportok számának és méretének növekedésével a vizoldékonyság ugrásszerűen megnőtt. Az "anomális" oldhatóságot valószínűleg a ribóz vagy a ribóz és a bázis egymáshoz viszonyított konformációjának megváltozása okozza, amelyet az alkil-szubsztitúció hozott létre. Ennek kiderítése azonban külön vizsgálat feladata⁶⁵.

3.2. A nukleozid-5'-foszfodiamidátok kémiai stabilitása

3.2.1. Szubsztituálatlan és szubsztituált származékok savkatalizált hidrolizise

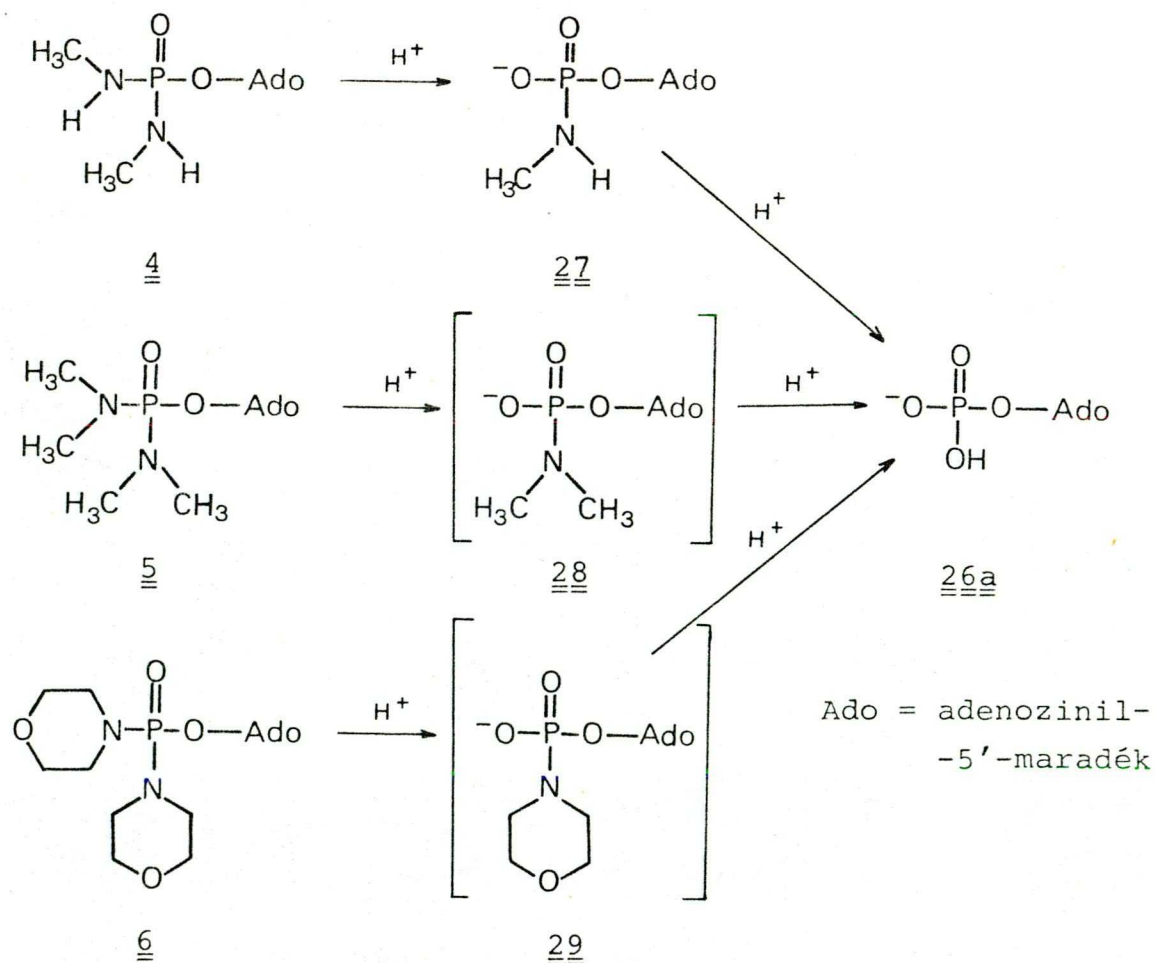
A diamidofoszfát-észterek kémiai tulajdonságairól rendelkezésre álló adatok azt mutatják, hogy a P-N és a P-O kötések stabilitását a N-atóm szubsztitúciója és az alkoholkomponens igen nagy mértékben befolyásolja. Abban a reményben, hogy e tekintetben hasznos információkhoz juthatok, hidrolitikus vizsgálatokat végeztem. Munkám során kialakult a különböző nukleozidokat tartalmazó, szubsztituálatlan (3a-e), valamint a különböző alkil-szubsztituenst hordozó adenzin sorbeli nukleozid-5'-foszfodiamidátok sorozata. A két homológ sorozaton belül jó összehasonlítási lehetőség adódott.

A szubsztituálatlan származékok (3a-e) hidrolizisét 0.1 N sósavban hajtottam végre. A kísérleteket Merck-késrételen végzett vékonyréteg-kromatográfia segítségével értékeltem ki. Autentikus kontrollanyagokkal való összehasonlítás útján azonosítottam a termékeket, és a feltintenzitások alapján becsültem a hidrolizált minta százalékos összetételét. Az így nyert adatok természetesen csak kvalitatív kiértékelést tettek lehetővé.

A különböző nukleozidot tartalmazó vegyületek (3a-e) hidroliziskészségében az általam használt módszerrel különbséget kimutatni nem tudtam. Mindegyik vegyület a (XII) egyenletnek megfelelően két lépésben hidrolizált. Az irodalmi adattal¹ egyezően 0.1 N sósavban, 5 perc alatt az el-

ső amido-csoport szinte teljes mértékben lehasadt, sőt 5-10 %-ban a második amido-csoport lehasadása is bekövetkezett. Igen szembeötlő volt a két P-N kötés stabilitásbeli különbsége, mert egy óra elteltével a foszfát-származék (26a-e) mennyisége csak 20 %-nak adódott.

Az adenzin-sorozat (3a, 4, 5, 6) tagjait hasonló módszerrel vizsgáltam. A hidrolízis végső terméke minden esetben az adenzin-5'-foszfát (19) volt. A szubsztituált foszfodiamidátok (4, 5, 6) hidrolízisének azonban ugyanugy két lépésben kell lejátszódnia, mint ahogy a szubsztituálatlanok esetében történt.



4 vegyület hidrolizise során sikerült is megtalálni az elsődleges terméket, az adenzin-5'-(N-metil)-foszfamidátot (27), az analóg 28 és 29 származékot azonban még nyomnyi mennyiségben sem tudtam kimutatni.

Mivel az adenzin-sorozat (3a, 4, 5, 6) egyes tagjainak hidroliziskészségében igen komoly eltéréseket tapasztaltam, ezért a kísérletek során változtattam a savkoncentrációt, a hőmérsékletet és a reakcióidőt. Az eredményeket a 4. táblázat tartalmazza.

A táblázatból két érdekes tendencia tűnik ki:

- 1/ Az alkilszubsztituensek számának és méretének növekedésével a foszfodiamidátok savval szembeni stabilitása igen erősen megnövekedett.
- 2/ Az alkilszubsztituensek hatására az egyik amidocsoport szelektív hidrolizálhatósága lecsökkent, ill. teljesen megszűnt.

Az első hatásért részben a N-atomok zsufoltsága következtében fellépő sztérikus gátlás lehet a felelős.

A szubsztituálatlan, vagy az amido-nitrogéneken legalább egy hidrogénatomot tartalmazó foszfodiamidátok (3a, 4) első amido-csoportjának nagyfoku savérzékenységét viszont egy más mechanizmussal lezajló folyamat okozhatja.

A közti termékek, a foszfamidátok szintjén, egyértelműen érvényes az az összefüggés, minél bázikusabb tulajdonságu az aminkomponens, annál könnyebben protonálódik

4. táblázat

A 3a, 4, 5, 6 adenzin-5'-foszfodiamidát 25°C-on végzett savkatalizált hidrolizisének termékei és azok százalékos megoszlása^a

HCl koncentráció (N)	Reakció-idő (óra)	<u>3a</u>		<u>4</u>		<u>5</u>		<u>6</u>	
		Termék	%	Termék	%	Termék	%	Termék	%
0.1	5 perc	<u>25a</u>	90	- ^{b/}		-		-	
		<u>26a</u>	5						
0.1	1	<u>25a</u>	80	<u>27</u>	15	-		-	
		<u>26a</u>	20	<u>26a</u>	15				
0.1	3	<u>25a</u>	70	<u>27</u>	30	-		-	
		<u>26a</u>	30	<u>26a</u>	30				
0.1	7	<u>25a</u>	60	<u>27</u>	40	<u>26a</u>	10	-	
		<u>26a</u>	40	<u>26a</u>	40				
0.1	27	<u>26a</u>	100	<u>26a</u>	100	<u>26a</u>	70	<u>26a</u>	5
0.5	27	<u>26a</u>	100	<u>26a</u>	100	<u>26a</u>	90	<u>26a</u>	10
0.5	72	<u>26a</u>	100	<u>26a</u>	100	<u>26a</u>	100	<u>26a</u>	70
1	24	<u>26a</u>	100	<u>26a</u>	100	<u>26a</u>	100	<u>26a</u>	60
1	1 ^c	Ade- nin	100	Ade- nin	100	Ade- nin	100	Ade- nin	100

a/ Az összes UV abszorbeáló anyag %-ában

b/ - = semmi változás nem észlelhető

c/ 80°C-on

a belőle származó amido-csoport (XIII), következésképp annál nagyobb sebességgel hidrolizál³². Ennek megfelelően az alkilszubsztitúció csökkenti a közti termékek stabilitását 28 és 29 intermedierek már 0.1 N HCl hatására is gyorsan elhidrolizáltak, ezért nem volt lehetséges ezek kimutatása 5 és 6 hidrolizisében.

3.2.2. Nukleozid-5'-foszfamidátok előállítása fluoridion katalízis segítségével

A nukleozid-foszfamidátok a pirofoszfátszintézisek fontos intermedierei⁴⁴. Előállításukra a nukleozid-5'-foszfodiamidátok savas hidrolízisén keresztül igen egyszerű mód adódott¹. Ebben a hidrolízisben azonban elkerülhetetlen 5-10 % foszfát-származék (26) keletkezése is.

A szubsztituálatlan nukleozid-5'-foszfodiamidátokkal végzett korábbi vizsgálatok az mutatták, hogy az egyik amidocsoport szelektív hidrolízisét a fluoridionok erősen katalizálják⁶⁶. Célszerűnek láttam a fluoridionok hatását behatóbban megvizsgálni, mert ez alapját képezhette egy nagyobb szelektivitású, enyhébb körülmények között végrehajtható nukleozid-5'-foszfamidát szintézisnek.

Jencks és Gilchrist vizsgálatai alapján tudjuk, hogy a foszfamidátok fluoridionok jelenlétében fluorofoszfátokat képeznek⁶⁷. Ezért a fluorid-katalizált hidrolízis melléktermékeként nukleozid-5'-fluorofoszfát (30) keletkezését vártam.

5. táblázat

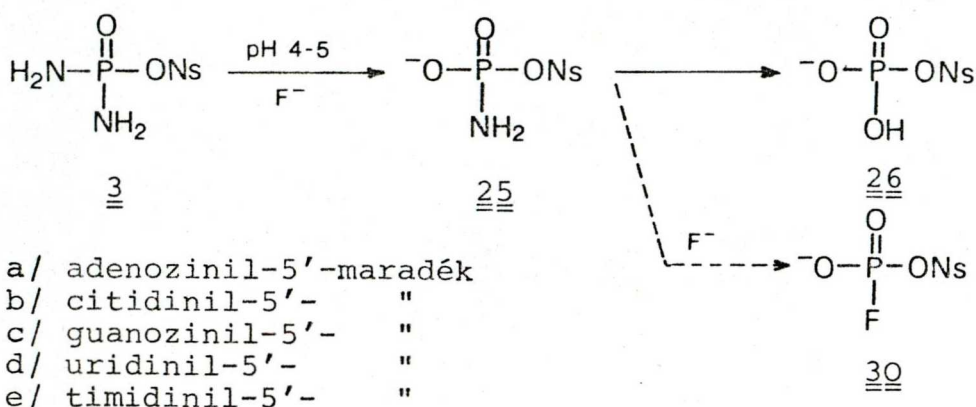
A fluoridion hatása az adenzin-5'-foszfodiamidát hidrolizisére (25°C-on, 0.1 M acetát-pufferben, pH 5.0)

Fluoridion- koncentráció (M)	Reakcióidő (óra)	Termék	Mennyisége (%) ^a
0	1	<u>25a</u>	< 5
0.1	1	<u>25a</u>	40
0	3	<u>25a</u>	< 5
0.1	3	<u>25a</u>	70
0	5	<u>25a</u>	< 5
0.1	5	<u>25a</u>	85
		<u>30a</u>	< 5
0	7	<u>25a</u>	5
0.1	7	<u>25a</u>	90
		<u>30a</u>	5
0.01	2	<u>25a</u>	10
0.01 ^{b/}	2	<u>25a</u>	70
0.01	4	<u>25a</u>	15
0.01 ^{b/}	4	<u>25a</u>	85
0.01	6	<u>25a</u>	20
0.01 ^{b/}	6	<u>25a</u>	< 95

a/ az összes UV-abszorpció %-ában

b/ 1 M acetát-puffer, pH 4.0

A reakcióban a nettó töltéssel nem rendelkező foszfamidát forma átalakulása a monoanion formában lévőnél gyorsabb⁶⁷, tehát e mellékreakció visszaszorítása érdekében minél kisebb fluorid-koncentráció és minél magasabb pH alkalmazására kellett törekednem.



Az optimális fluoridion-koncentráció, pH és reakcióidő meghatározására 3a vegyülettel végeztem kísérleteket, melyek eredménye az 5. táblázatban látható.

A fluoridion segítségével 3-4 nagyságrenddel kisebb hidrogénion-koncentráció mellett tudtam elvégezni az átalakítást, mint egyébként. A 3b-e foszfodiamidát-származékok esetében az eredmény az előzővel azonos volt. Minden vegyületnél 6 óra alatt 0.01 M NaF jelenlétében pH 4-en szinte kvantitatív konverziót tudtam elérni. A foszfamidát→foszfát átmenet ezen a pH-n igen lassu, és a fluorid ezt egyáltalán nem, vagy csak igen csekély mértékben segíti elő, a vékonyrétegeken a foszfát-származék 26a-e foltja még nyomokban sem tűnt fel. 30 melléktermék 0.1 M NaF koncentrációnál megjelent ugyan, de



ennek mennyiségét 0.01 M-os oldat használta a kimutat-
hatósági szint alá csökkentette.

Megvizsgáltam a szubsztituált foszfodiamidátok
(4, 5, 6) katalizált hidrolizisét is. Ennek eredményét
a 6. táblázatban tüntettem fel.

6. Táblázat

Szubsztituált nukleozid-5'-foszfodiamidátok hidrolizise
acetát-pufferben, pH 4, 50°C-on 7 órás reakcióidővel.

Puffer koncent- ráció (M)	[F ⁻] (M)	<u>4</u>		<u>5</u>		<u>6</u>	
		Ter- mék	% ^{a/}	Ter- mék	% ^{a/}	Ter- mék	% ^{a/}
0.1	0	<u>26a</u>	<5%	-	-	b/ -	-
0.1	0.01	<u>27</u>	5	<u>28</u>	5	-	-
		<u>26a</u>	5				
1	0.1	<u>27</u>	50	<u>28</u>	40	-	-
		<u>26a</u>	10	<u>26a</u>	0		
		<u>30a</u>	5	<u>30a</u>	10		

a/ az összes UV abszorbeáló anyag %-ában

b/ - = semmilyen átalakulás nem mutatható ki.

Az adenzin-5'-foszfodimorfolidát (6) stabilitását
a F⁻ egyáltalán nem befolyásolta, viszont 4 és 5 szár-
mazék esetében lehetővé tette az 5'-foszfamidáttá
(27, 28) történő bomlást, ami egyébként csak alig

vagy egyáltalán nem kivitelezhető, mert ezek a termékek csak ilyen enyhe körülmények között (pH 4) létképesek.

A fluorid-katalízis segítségével tehát nagy szelektivitású (közel 100%) foszfodiamidát → foszfamidát átalakulás érhető el. Egyes szubsztituált foszfodiamidátok esetében F^- hatására ugyancsak járhatóvá válik ez az út.

3.2.3. A nukleozid-5'-foszfodiamidátok viselkedése lúgos közegben

Az adenzin-sorozat lúgos közegben mutatott stabilitását az előzőekhez hasonló módszerrel vizsgáltam. Ezek eredménye a 7. táblázatban található.

7. Táblázat

Az adenzin-sorozat lúgos hidrolízise

NaOH koncentráció (N)	Hőmérséklet (°C)	Reakcióidő (óra)	Termék	<u>3</u> % ^{a/}	Termék	<u>4</u> % ^{a/}	Termék	<u>5</u> Termék	<u>6</u> Termék
0.1	25	5 perc	<u>1a</u>	80	- ^{b/}		-	-	
0.1	25	10 perc	<u>1a</u>	100	-		-	-	
0.5	25	72	<u>1a</u>	100	<u>1a</u>	20	-	-	
1	25	24	<u>1a</u>	100	<u>1a</u>	25	-	-	
1	80	1	<u>1a</u>	100	<u>1a</u>	5	-	-	
14 (NH ₄ OH)	50	5	<u>1a</u>	100		-	-	-	

^{a/} az összes UV-abszorpció %-ában

Az adenzin-5'-foszfodiamidát (3a) 0.1 N lug hatására nagy sebességgel adenzinná bomlott. A többi szubsztituálatlan foszfodiamidát (3b-e) 0.1 NaOH-ban 25°C-on, 10 perc alatt teljes egészében szintén a kiindulási nukleoziddá alakult át. Nagyobb lugkoncentráció mellett az adenzin-5'-(N,N-dimetil)-foszfodiamidát is adenzinná alakult át. A teljesen szubsztituált foszfodiamidát-származékokat (5, 6) azonban még 1 N NaOH-ban 80°C-on sem lehetett reakcióra készíteni.

Ezek a tapasztalatok jól egybevágnek azzal a feltételezéssel, hogy a szubsztituálatlan foszfodiamidátok egy monomer metafoszfát-szerkezeten keresztül eliminációs-addíciós mechanizmussal hidrolizálnak a (XIV) reakcióegyenlet szerint³⁸. Ennek a mechanizmusnak feltétele legalább egy amido-nitrogénhez kapcsolódó proton, ami az első lépésben disszociál. Ez 3a és 4 vegyületek esetében adott, az 5 és a 6 származéknál azonban hiányzik. Ezért a teljesen szubsztituált foszfodiamidát-származékok csak egyéb disszociatív vagy bimolekulás mechanizmussal tudnának hidrolizálni, ami ebben az esetben nem kedvezményezett. Ez okozza 5 és 6 származék luggal szembeni nagyfoku stabilitását.

4. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám lényege a következőkben foglalható össze:

- a/ A Yoshikawa-féle szelektív foszforilezés és in situ végrehajtott ammonolizis összekapcsolása útján egyszerű, "egy fazék" módszert dolgoztam ki a nukleozid-5'-foszfodiamidátok nukleozidból kiinduló szintézisére. Előállítottam a négy fő ribonukleozid és a timidin 5'-foszfodiamidát-származékát.
- b/ Vizsgáltam a módszer alkalmazhatóságának körét, és ennek során három N(P)-szubsztituált adenzin-5'-foszfodiamidátot szintetizáltam.
- c/ Részletesen megvizsgáltam a szintézis során fellépő melléktermékeket, és megállapítottam, hogy azok három különböző mellékreakcióban - aszelektív foszforilezés, metilezés és hidrolizis - jöttek létre.
- d/ Tanulmányoztam a nukleozid-5'-foszfodiamidátok savas és lúgos hidrolizisét. Fluoridion - katalizis segítségével enyhén savas közegben kivitelezhető eljárást dolgoztam ki a nukleozid-5'-foszfamidátok előállítására.

5. KISÉRLETI RÉSZ

Anyagok

A nukleozidokat (Sigma) felhasználás előtt 130 Pa nyomáson 110°C-on 8 órán keresztül szárítottam. A foszforil-kloridot, a trimetil-foszfátot és a morfolint a felhasználást megelőzően 130 Pa nyomáson ledesztilláltam. A 7.0 N metilamin- és dimetilamin-oldatot a kereskedelmi 40 %-os vizes oldatból készítettem. A kromatográfiás kontrollanyagok (Sigma), a kromatográfiás oszloptöltetek (Serva) és az Escherichia coli alkálikus foszfatáz (Sigma) kereskedelmi termékek voltak. 13a vegyületet adenozinból kiindulva, $P_2O_3Cl_4$ -dal foszforilezve és ezt követően ammonolizálva készítettem az analóg guanozin-származék előállításának¹ megfelelően (IXb).

Módszerek

Az oldatok bepárlását 130-260 Pa nyomáson, 30°C-os vízfürdőből rotációs gyorbepárló (Rotavapor, Büchi) segítségével végeztem.

A termékek olvadáspontját Koffler-blokkon mértem (9.táblázat), a megadott értékek korrigálatlanok.

A vékonyréteg-kromatográfiás elválasztásokat HPTLC készrétegeken (Silica Gel 60 F₂₅₄, Merck) az S₁ [1-propanol-ccNH₄OH-H₂O-11:7:2], az S₂ [kloroform-metanol-7:3], az S₃ [kloroform-metanol-4:6] futtató-elegyekben,

PEI-cellulóz anioncserélő készrétegeken (Polygram Cel 300 PEI/UV₂₅₄, Macherey, Nagel+Co) az S₄ [0.1 M NaCl] elegyben és saját készítésű (cellulóz-szilikagél-8:2) rétegeken az S₅ [1-butanol-etanol-H₂O-16:2:5] futtatószerben kifejlesztve hajtottam végre. A rétegeken az anyagokat UV-fényelnyelésük alapján 254 nm hullámhosszú fényben (Desaga UVIS) detektáltam. Az R_f-értékeket a 12. táblázat foglalja össze.

Az oszlopkromatográfiás elválasztásokat 254 nm-en történő folyamatos abszorpciómérés alapján követtem (ISCO UA-5 monitor). Az oszlopkromatográfiás rendszerek jellemzőit a 8. táblázat tartalmazza. A termékek és melléktermékek mennyiségi meghatározása az UV-fényelnyelés maximumának megfelelő hullámhosszon mért extinkció (Spektromom 203) és az illető anyag ϵ_{\max} értéke alapján történt.

Az UV-abszorpciós spektrumokat Unicam SP 1800 spektrofotométeren három pH-értéken (1.0; 7.0; 11.0) regisztráltam (10. táblázat). A ¹³C NMR spektrumok felvétele D₂O-ban, Varian XL-100/15 NMR spektrométer segítségével történt. A belső referenciavegyület dioxán volt, de a megadott értékek TMS-re vonatkoznak ($\delta_{\text{C(dioxán)}} = 67.71$ ppm) (11. táblázat). A tömegspektrometriás méréseket egy AEI MS-902 kettős fókuszolású készüléken, 3 ppm pontossággal, 10 000-es feloldóképességgel, 70 eV-on, 200 °C-on végezték (9. táblázat). A vizsgálandó anyagok szililezése Miller és munkatársai eljárása⁶⁸ alapján történt.

A savas lebontásokat az anyag 0.025 M-os oldatával (100 μ l) 1 N sósavban 25^oC-on végeztem 3a-e, 4 és 13a esetében 4, 5 és 6 esetében 72 órán keresztül. A felszabaduló ammóniát Nessler-reagenssel mutattam ki. A szubsztituált aminok a Nessler-reagenssel fehér-csapadékot adtak. Az Escherichia coli alkálikus foszfatázos emésztéseket 1.0 abszorpciós egységnyi (260 nm) vizsgálható, anyaggal 0.3 egység enzim segítségével 1 óra hosszat 37^oC-on 10 μ l 0.1 M NaHCO₃-Na₂CO₃ pufferben (pH 10.6) hajtottam végre.

Adenozin-(3a), citidin-(3b), guanozin-(3c), uridin-(3d) és timidin-5'-foszfodiamidát (3e) előállítása

A P-O-C kötés kiépítése

1 mmol nukleozidot (1a-e) 2.5 ml (22 mmol) (CH₃O)₃PO-ban szuszpendáltam. 10 perces keverés és jeges hűtés után 2.2 mmol (200 μ l) POCl₃-t csepegtettem hozzá. A légnedvességtől elzárva jég-hűtés közben kevertettem. A reakcióidők: 1a és 1b 1 óra, 1c 2 óra, 1d és 1e 7 óra.

A P-N kötések létrehozása

A foszforilezés során kapott oldatot kb. 2 perc alatt intenzív keverés közben 7.0 N NH₄OH oldatába csepegtettem, amelyet előzőleg jéggel 2^oC-ra hűtöttem le. 5 perc elteltével az elreagálatlan ammóniát vizsugár-szivattyú segít-



ségével leszivattam. Az oldatot folytatólagosan bepároltam, hogy a trimetil-foszfát eltávozzék. 3c esetében a bepárlást csak a kezdődő kristályosodásig végeztem.

Adenozin-5'-(N,N'-dimetil)-foszfodiamidát (4), adenozin-5'-(N,N,N',N'-tetrametil)-foszfodiamidát (5), adenozin-5'-foszfodimorfolidát (6) előállítása

Az eljárás azonos az előzőekkel, kivéve az ammonolizist, amely során 7.0 NH₄OH helyett 4 esetében 7.0 N metilamin, 5 esetében 7.0 N dimetilamin és 6 esetében 7.0 N morfolin vizes oldatát alkalmaztam.

A termékek izolálása

3b, 3d és 3e esetében a bepárlási maradékot kevés etanol együttes bepárlásával vízmentesítettem. 3e esetében a vízmentes maradékot 10 ml metanolban oldottam (25°C), az oldhatatlan sókat kiszűrtem és 2 ml metanollal átmostam. A metanolos oldatot ~2 ml térfogatra bepároltam. A bepárolt anyagot 5 ml metanolban 25°C-on (3b, 3d), 7 ml vízben 40°C-on (3a), 80 ml vízben 40-50°C-on (3c) és 5ml 30% metanol-viz elegyben 25°C-on (4, 5, 6) oldottam fel. Az így kapott oldatokat kromatográfiás oszlopra vittem. Az oszlopkromatográfia módját és eredményeit a 8. táblázat tartalmazza.

8. Táblázat

A termékek oszlopkromatográfiás izolálása

Vegyület	Oszlop		Eluens	Eluciós sebesség (ml/h)	Frakció- térfogat (ml)	Termék helye ^{a/}
	töltet	méret (cm)				
<u>3a</u>	Dowex 1x8 AG					15-25
	200-400 mesh (HCOO ⁻)	64x2.0	deszt.viz	32	8	28-41
<u>3b</u>			CHCl ₃ -MeOH 8:2 (450 ml) 6:4 (1065 ml)			46-66
<u>3d</u>	Szilikagél					
	100-200 μm I. aktivitás ⁶⁹	32x1.4	9:1 (315 ml) 8:2 (360 ml)	120	15	24-46
<u>3e</u>			8:2 (300 ml) 6:4 (520 ml)			40-50
	<u>4</u>	Dowex 1x2 AG				23-45
<u>5</u>	200-400 mesh	53x1.6	H ₂ O-MeOH 7:3	32	16	20-33
<u>6</u>	(OH ⁻)					23-46

a/ frakciószámában kifejezve

A megfelelő frakciókat bepároltam. A szervesetlen sók eltávolítása végett az anyagokat deszt. vízben oldva 32x1.4 cm-es DEAE-cellulóz (HCO_3^-) (Whatman DE-32) anioncserélő oszlopon engedtem át 10 ml/h sebességgel, majd az effluenst bepároltam. Ismételt feloldással és bepárlással a hidrogénkarbonátokat is eltávolítottam. 3a és 3c vegyületeket 5, illetve 25 ml deszt. vízből, 3e terméket 3 ml metanolból kristályosítottam át, míg a többi származék 60 ml éter hatására kristályosodott.

Foszforilezés viz hozzáadásával

1 mmol adenzint (1a) vagy timidint (1e) 25 ml $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{PO}$ -ban szuszpendáltam. Jéggel behütöttem, és keverés közben 730 μl POCl_3 (8 mmol) és 54 μl H_2O (3 mmol) előre elkészített, behütött elegyét csepegtettem a szuszpenzióba. A reakcióelegyet a levegő sebességének kizárásával 1a esetében 6, 1e esetében pedig 7 óra hosszat kevertettem. A további feldolgozás azonos 3a, illetve 3e előállítására kapcsán leirtakkal.

A 3a vegyület szintézise során keletkező melléktermékek azonosítása

A 3a vegyület oszlopkromatográfiás tisztítása során kapott első csucst tartalmazó frakciókat (11-14) összegyűjtve bepároltam. Az anyag 10 abszorpciós egységét (260 nm) az ismertetett módon savas, majd ezt követően

alkálikus foszfatázos emésztésnek vetettem alá. A savas hidrolízis után Nessler-reagens segítségével ammónia keletkezését mutattam ki. A lebontások eredményeképpen egyetlen termékként 1-metil-adenozint kaptam, amelyet vékonyréteg-kromatográfiával azonosítottam. A 11-14 frakcióból nyert anyagot 0.1 N NaOH hatásának vettem alá 1 órán keresztül, ilyen módon N⁶-metil adenozin (23) keletkezett.

A 3a reakcióelegyét egy 32x1.4 cm-es DEAE-cellulóz (HCO₃⁻) (DE-32 Whatman) oszlopra vittem és trietilammónium-hidrogénkarbonát 0-0.3 M lineáris gradiensevel 10 ml/h sebességgel eluáltam. Az így izolált anyagokat 13a, 14a, 16a, 25a, 26a vékonyréteg-kromatográfiával, autentikus kontrollanyagokkal való összehasonlítás útján azonosítottam. 13a vegyület savas lebontása során adenozin-2'(3'), 5'-difoszfát és ammónia keletkezett.

A hidrolitikus vizsgálatokat a vizsgálandó anyag 0.025 M-os oldatában, a 4-7 táblázatokban megadott körülmények között végeztem.

A metilezés módjának megállapítását célzó kísérletet 0.5 mol 2',3'-O-izopropilidén-adenozinból kiindulva 3a vegyület előállításával azonos módon végeztem, de elhagytam a POCl₃ adagolását. Az izolálás 32x1.4 cm CM-cellulóz (NH₄⁺) (CM-32, Whatman) oszlopon történt. Az eluens 600-600 ml 0.01-0.2 M NH₄Cl (pH 5) lineáris gradiense volt. Eluciós sebesség 40 ml/h, frakciótérfogat 20 ml.

9. táblázat

A nukleozid-5'-foszfodiamidátok kitermelése, olvadáspontja és trimetilszilil-származékuk tömegspektrometriás adatai

Vegyület	Kitermelés (%)	Olvadáspont (°C)	A TMS-származékok összegképlete	Molekulasúly	
				számított	talált
<u>3a</u>	85	186-9	C ₂₅ H ₅₆ N ₇ O ₅ Si ₅ P	705.2927	705.295
<u>3b</u>	42	115-7	C ₂₄ H ₅₆ N ₅ O ₆ Si ₅ P	681.2815	681.279
<u>3c</u>	68	250 ^a	C ₂₈ H ₅₈ N ₇ O ₆ Si ₆ P	793.3272	793.325
<u>3d</u>	38	94-7	C ₂₄ H ₅₅ N ₄ O ₇ Si ₅ P	682.2655	682.267
<u>3e</u>	63	100-3	C ₂₂ H ₄₉ N ₄ O ₆ Si ₄ P	608.2467	608.245
<u>4</u>	73	99-102	C ₂₇ H ₆₀ N ₇ O ₅ Si ₅ P	733.3240	733.325
<u>5</u>	89	78-9	C ₂₃ H ₄₈ N ₇ O ₅ Si ₃ P	617.2763	617.278
<u>6</u>	91	105-7	C ₂₇ H ₅₂ N ₇ O ₇ Si ₃ P	701.2974	701.294

a/ elbomlik

10. táblázat

A nukleozid-5'-foszfodiamidátok UV-spektrumának jellemző adatai

Vegyület	pH	λ_{\max} (nm)	λ_{\min} (nm)	$\frac{E_{230}}{E_{260}}$	$\frac{E_{240}}{E_{260}}$	$\frac{E_{250}}{E_{260}}$	$\frac{E_{270}}{E_{260}}$	$\frac{E_{280}}{E_{260}}$	$\frac{E_{290}}{E_{260}}$
<u>1a</u>	2	257.5	228.5	0.24	0.47	0.84	0.66	0.18	0.06
	7	260	226	0.21	0.43	0.79	0.64	0.12	0.01
	11	260	226	0.21	0.43	0.78	0.64	0.12	0.01
<u>4</u>	2	257	229	0.23	0.45	0.86	0.67	0.26	0.03
	7	260	226	0.17	0.40	0.78	0.66	0.16	0.01
	11	260	227	0.18	0.40	0.78	0.65	0.15	0.01
<u>5</u>	2	257	229	0.22	0.45	0.86	0.67	0.20	0.03
	7	260	227	0.17	0.39	0.78	0.68	0.17	0.01
	11	260	227	0.18	0.40	0.78	0.66	0.16	0.01
<u>6</u>	2	257	228	0.23	0.48	0.85	0.68	0.21	0.01
	7	260	227	0.17	0.39	0.77	0.67	0.18	0.01
	11	260	227	0.18	0.39	0.77	0.66	0.18	0.01
<u>22</u>	2	258	233	0.35	0.42	0.79	0.72	0.27	0.07
	7	258	232.5	0.32	0.42	0.80	0.68	0.24	0.05
	11	258.5	232	0.31	0.39	0.76	0.71	0.34	0.28
<u>1b</u>	2	280	241	0.59	0.28	0.46	1.69	1.99	1.46
	7	271	226.5; 250	1.04	0.92	0.84	1.21	0.95	0.33
	11	271	226.5; 250	1.09	0.94	0.86	1.16	0.88	0.28
<u>1c</u>	1	255-6	227	0.27	0.63	0.95	0.76	0.69	0.44
	7	253	223	0.37	0.78	1.13	0.81	0.64	0.25
	11	254-67	231	0.37	0.54	0.87	0.97	0.59	0.10
<u>1d</u>	2	262	230	0.23	0.42	0.78	0.82	0.34	0.05
	7	262	230	0.24	0.43	0.78	0.81	0.33	0.04
	11	261.5	241	0.85	0.71	0.84	0.79	0.28	0.04
<u>1e</u>	2	266.5	234	0.30	0.33	0.64	1.05	0.68	0.20
	7	267	234.5	0.30	0.33	0.65	1.04	0.68	0.20
	11	267	244	1.08	0.72	0.74	1.04	0.63	0.22

11. táblázat

Az N-szubsztituált adenzin-5'-foszfodiamidátok ^{13}C NMR
 kémiai eltolódásai (ppm) és kapcsolási állandói (Hz)

	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
C-2	153.69	153.80	153.84
C-4	149.61	149.68	149.71
C-5	119.45	119.56	119.52
C-6	156.23	156.35	156.37
C-8	140.47	140.49	140.63
C-1'	88.77	89.03	89.09
C-2'	75.00	74.77	74.29
C-3'	70.89	70.65	70.46
C-4'	83.83	83.49	82.99
C-5'	65.14	64.84	64.99
P-N- <u>CH</u> ₃	27.15	36.75 36.59	-
P-N- <u>CH</u> ₂	-	-	44.95 44.85
P-N-CH ₂ - <u>CH</u> ₂ -O	-	-	67.55 67.48
$^3\text{J}_{\text{PC-4}'}$	8.21	8.67	8.48
$^2\text{J}_{\text{PC-5}'}$	5.02	4.74	4.67
$^2\text{J}_{\text{PNC}}$	<0.3	0.82	1.57
$^3\text{J}_{\text{PNCC}}$	-	-	3.75

12. táblázat

Vékonyréteg-kromatográfiás R_f -értékek

Vegyület		Szolvens			
Neve	Száma	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
Adenozin-5'-foszfodiamidát	<u>3a</u>	0.64	0.09	0.30	0.59
Adenozin	<u>1a</u>	0.72	0.57	0.65	0.57
Adenozin-5'-foszfodiamidát-2',3'- -ciklofoszfát	<u>13a</u>	0.59		0.07	0.32
Adenozin-2'(3'),5'- difoszfát		0.19			0.05
Adenozin-2',3' ciklofoszfát	<u>14a</u>	0.58		0.45	0.35
Adenozin-2'(3')- -foszfát	<u>16a</u>	0.49			0.10
1-Metil-adenozin- -5'-foszfodiamidát	<u>22</u>	0.58			0.92
1-Metil-adenozin		0.65	0.12	0.17	0.95
Adenozin-5'-foszfamidát	<u>25a</u>	0.52		0.15	0.40
Adenozin-5'-foszfát	<u>26a</u>	0.45			0.11
Adenozin-5'-(N,N'- -dimetil)-foszfodi- amidát	<u>4</u>	0.69	0.36	0.54	0.77
Adenozin-5'-(N-metil)- -foszfamidát	<u>27</u>	0.63	0.05		0.41
Adenozin-5'- (N,N,N',N'-tetrametil) -foszfodiamidát	<u>5</u>	0.73	0.56	0.68	0.83
Adenozin-5'-(N,N- -dimetil)-foszfamidát	<u>28</u>	0.68	0.07		
Adenozin-5'-foszfo- dimorfolidát	<u>6</u>	0.68	0.47	0.61	0.84
Citidin-5'-foszfo- diamidát	<u>3b</u>	0.47		0.26	0.80
Citidin	<u>1b</u>	0.59	0.26	0.60	0.75
Citidin-5'-foszfa- midát	<u>25b</u>	0.46		0.12	0.53
Citidin-5'-foszfát	<u>26b</u>	0.31			0.18

Vegyület		Szolvens				
Neve	Száma	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
Guanozin-5'-foszfo- diamidát	<u>3c</u>	0.47			0.52	
Guanozin	<u>1c</u>	0.62			0.52	
Guanozin-5'-foszfa- midát	<u>25c</u>	0.32			0.25	
Guanozin-5'-foszfát	<u>26c</u>	0.27			0.08	
Uridin-5'-foszfo- diamidát	<u>3d</u>	0.44	0.20	0.51	0.87	
Uridin	<u>1d</u>	0.51	0.64	0.80	0.81	
Uridin-5'-foszfami- dát	<u>25d</u>	0.41			0.57	
Uridin-5'-foszfát	<u>26d</u>	0.48			0.15	
Timidin-5'-foszfo- diamidát	<u>3e</u>	0.64	0.18	0.58	0.85	0.28
Timidin	<u>1e</u>	0.72	0.83	0.89	0.95	
Timidin-3',5'-difosz- fotetramidát	<u>20</u>					0.12
Timidin-3'-foszfo- diamidát	<u>21</u>					0.35
Timidin-5'-foszfami- dát	<u>25e</u>	0.58			0.64	
Timidin-5'-foszfát	<u>26e</u>	0.44			0.19	

IRODALOM

- 1, A. Simoncsits és J. Tomasz, Nucleic Acids Res. 2, 1223 (1975).
- 2, A. Michaelis, Ann. 326, 196 (1903).
- 3, K. Sasse, "Organische Phosphorverbindungen, Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl)", szerk. E. Müller, 4. kiad., G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1964, 12/2, p. 453.
- 4, H.G. Khorana, "Some Recent Developments in the Chemistry of Phosphate Esters of Biological Interest", Wiley, New York, 1961, p. 14.
- 5, A. Michaelis és G. Schulze, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 27, 2572 (1894).
- 6, P. Rudert, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 26, 565 (1893).
- 7, P. Otto, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 28, 616 (1895).
- 8, J. Cheymol, P. Chabrier, M. Selim és T.N. Tanh, Compt. Rend. 249, 1240 (1959) és 251, 550 (1960)
- 9, A. Michaelis és J. Hochhut, Ann. 407, 290 (1915).
- 10, J.E. Gardiner és B.A. Kilby, J. Chem. Soc. 1769 (1950).
- 11, F. Zetzsche és N. Büttiker, Chem. Ber. 73B, 47 (1940).
- 12, H.A.C. Montgomery és J.H. Turnbull, J. Chem. Soc. 1963 (1958).
- 13, L.F. Audrieth és A.D. Toy, J. Am. Chem. Soc. 64, 1337 (1942).
- 14, B. Loew és J.F. Massengale, J. Org. Chem. 22, 1186 (1957).
- 15, R.L. Arceneaux, J.G. Frick, Jr., E.K. Leonard és D. Reid, J. Org. Chem. 24, 1419 (1959).



- 16, M. Goehring és K. Niedenzu, Chem. Ber. 89, 1768 (1956).
- 17, R.M. Caven, J. Chem. Soc. 81, 1362 (1902).
- 18, G. Sturtz, J. P. Paugam és B. Corbel, Synthesis 730 (1974).
- 19, N.K. Kochetkov, E.I. Budowsky, V.N. Shibaev, G.I. Yeliseeva, M.A. Grachev és V.P. Demushkin, Tetrahedron 19, 1207 (1963).
- 20, W.S. Zieliński és J. Smrt, Collection Czechoslov. Chem. Commun. 39, 2483 (1974).
- 21, E. Ohtsuka, T. Tanaka, S. Tanaka és M. Ikehara, J. Am. Chem. Soc. 100, 4580 (1978).
- 22, E. Ohtsuka, S. Tanaka és M. Ikehara, J. Am. Chem. Soc. 100, 8210 (1978).
- 23, W.S. Zieliński, J. Smrt és J. Beránek, Collection Czechoslov. Chem. Commun. 39, 3560 (1974).
- 24, F. Cramer, H. Schaller és H. Staab, Chem. Ber. 94, 1612 (1961).
- 25, M. Yoshikawa, T. Kato és T. Takenishi, Bull. Chem. Soc. Japan 42, 3505 (1969).
- 26, T. Sowa és S. Ouchi, Bull. Chem. Soc. Japan 48, 2084 (1975).
- 27, S. Kim és A. Rosowsky, J. Carbohydrates, Nucleosides, Nucleotides 6, 229 (1979).
- 28, T. Mukaiyama, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 15, 94 (1976).
- 29, M. Hashimoto és T. Mukaiyama, Chem. Lett. 513 (1973).

- 30, A.J. Kirby és J.G. Warren, "The Organic Chemistry of Phosphorus", Elsevier, Amsterdam, 1967, p. 274.
- 31, T. Koizumi és P. Haake, J. Am. Chem. Soc. 95, 8073 (1973) és az itt található idézetek.
- 32, J.G. Mofatt és H.G. Khorana, J. Am. Chem. Soc. 83, 649 (1961).
- 33, M. Halmann, A. Lapidot és D. Samuel, J. Chem. Soc. 1299 (1963).
- 34, M. Halmann, A. Lapidot és D. Samuel, J. Chem. Soc. 3158 (1961).
- 35, A.W. Garrison és C.E. Boozer, J. Am. Chem. Soc. 90, 3486 (1968).
- 36, T.A. Modro, M.A. Lawry és E. Murphy, J. Org. Chem. 43, 5000 (1978).
- 37, D.F. Heath, J. Chem. Soc. 3796 (1956).
- 38, F.H. Westheimer, Spec. Publ. No. 8, Chem. Soc. London, 1957, p. 181.
- 39, P.S. Traylor és F.H. Westheimer, J. Am. Chem. Soc. 87, 553 (1965).
- 40, J. Rébék, Jr., F. Gavina és C. Navarro, J. Am. Chem. Soc. 100, 8113 (1978).
- 41, H.K. Hall, Jr., J. Org. Chem. 21, 248 (1956).
- 42, E.W. Crunden és P.F. Hudson, J. Chem. Soc. 3591 (1962).
- 43, T.H. Bevan et al., J. Chem. Soc. 127 (1953).
- 44, A.M. Michelson, "The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides", Academic Press, London, 1963, p. 214.

- 45, J. Tomasz, A. Simoncsits, M. Kajtár, R.M. Krug és A.J. Shatkin, Nucleic Acids Res. 5, 2945 (1978).
- 46, F. Cramer és H. Schaller, Chem. Ber. 94, 1634 (1961).
- 47, J.W. Kozarich, A.C. Chinault és S.M. Hecht, Biochem. 12, 4485 (1973).
- 48, A. Simoncsits és J. Tomasz, Tetrahedron Lett. 3995 (1976).
- 49, Ludwig J., Diplomadolgozat, JATE, Szeged, 1979.
- 50, "Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Nucleic Acids", szerk. G.D. Fasman, 3. kiad., CRC Press, Cleveland, 1975, 1. köt.
- 51, A. Simoncsits és J. Tomasz, Biochim. Biophys. Acta, 395, 74 (1975).
- 52, Z.A. Shabarova, Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 10, 145 (1970).
- 53, R.B. Meyer, Jr., D. A. Shuman és R.K. Robins, Tetrahedron Lett. 269 (1973).
- 54, W.H. Dawson, R.L. Cargill és R.B. Dunlop, J. Carbohydrates, Nucleosides and Nucleotides, 4, 363 (1977).
- 55, J. Ludwig és J. Tomasz, Synthesis, közlésre beküldve.
- 56, J. W. Jones és R.K. Robins, J. Chem. Soc. 193 (1963).
- 57, O. Dimroth, Ann. 364, 183 (1909).
- 58, P. Brookes és P.D. Lowley, J. Chem. Soc. 539 (1960).
- 59, T. Itaya, F. Tanaka és T. Fujii, Tetrahedron 28, 535 (1972).
- 60, J.D. Engel, Biochem. Biophys. Res. Comm. 64, 581 (1975).

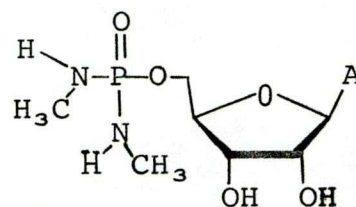
- 61, K. Yamauchi és M. Kinoshita, J. Chem. Soc. Perkin I 762 (1978).
- 62, T. Tanabe, K. Yamauchi és M. Kinoshita, Bull. Chem. Soc. Japan 52, 3121 (1979).
- 63, M. Hayashi, K. Yamauchi és M. Kinoshita, Bull. Chem. Soc. Japan 53, 277 (1980).
- 64, C.A. Dekker, J. Am. Chem. Soc. 87, 4027 (1965).
- 65, J. Tomasz, K. Barabás, S. Bottka, J. Kajtár, M. Kajtár, M. Kajtár-Peredy és L. Radics, Nucleic Acids Res. Spec. Publ. 9 (1981) előkészületben.
- 66, Tomasz Jenő, publikálatlan eredmény.
- 67, W.P. Jencks, M. Gilchrist, J. Am. Chem. Soc. 87, 3199 (1965).
- 68, V. Miller, V. Pacakova és E. Smolkova, J. Chromatogr. 119, 335 (1976).
- 69, R. Hernandez, R. Hernandez, Jr. és L. R. Axelrod, Anal. Chem. 33, 370 (1961).

Szám

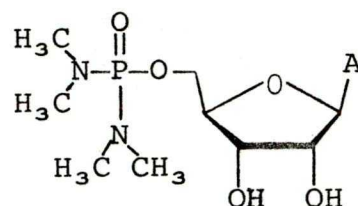
Név

Képlet

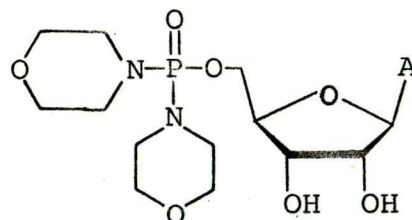
4 Adenozin-5'-(N,N'-dimetil)-foszfodiamidát



5 Adenozin-5'-(N,N,N',N'-tetrametil)-foszfodiamidát



6 Adenozin-5'-foszfodimorfolidát

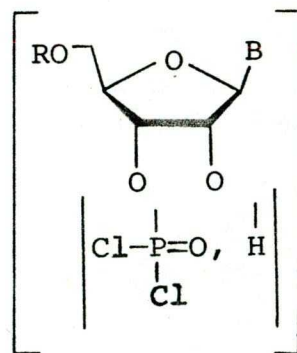


7 Ribonukleozid-2'(3'), 5'-bisz-(diklórfoszfát)

/B = A, C, G, U; R = P(O)Cl₂/

8 Ribonukleozid-2' 3' -diklórfoszfát

/B = A, C, G, U; R = H/

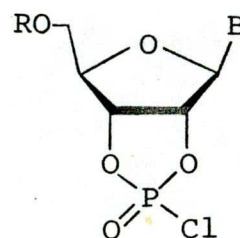


9 Ribonukleozid-5'-diklórfoszfát-2',3'-klórciklofoszfát

/B = A, C, G, U; R = P(O)Cl₂/

10 Ribonukleozid-2',3'-klórciklofoszfát

/B = A, C, G, U; R = H/



K É P L E T M U T A T Ó

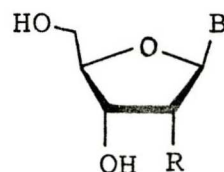
Rövidítések: A = adenilil-9
 C = citozinil-1
 G = guanilil-9
 U = uracilil-1
 T = timinil-1

Szám

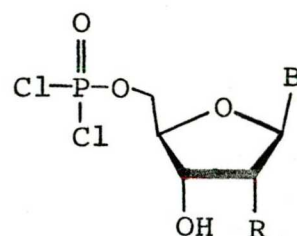
Név

Képlet

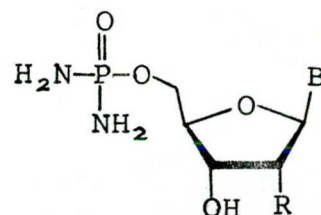
<u>1a</u>	Adenozin	B = A, R = OH
<u>1b</u>	Citidin	B = C, R = OH
<u>1c</u>	Guanozin	B = G, R = OH
<u>1d</u>	Uridin	B = U, R = OH
<u>1e</u>	Timidin	B = T, R = H



<u>2a</u>	Adenozin-5'-diklórfoszfát	B = A, R = OH
<u>2b</u>	Citidin-5'-diklórfoszfát	B = C, R = OH
<u>2c</u>	Guanozin-5'-diklórfoszfát	B = G, R = OH
<u>2d</u>	Uridin-5'-diklórfoszfát	B = U, R = OH
<u>2e</u>	Timidin-5'-diklórfoszfát	B = T, R = H



<u>3a</u>	Adenozin-5'-foszfodiamidát	B = A, R = OH
<u>3b</u>	Citidin-5'-foszfodiamidát	B = C, R = OH
<u>3c</u>	Guanozin-5'-foszfodiamidát	B = G, R = OH
<u>3d</u>	Uridin-5'-foszfodiamidát	B = U, R = OH
<u>3e</u>	Timidin-5'-foszfodiamidát	B = T, R = H



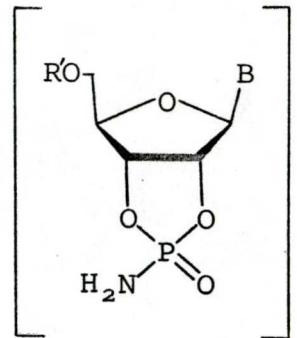
Szám

Név

Képlet

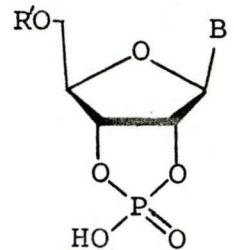
11 Ribonukleozid-5'-foszfodiamidát-2',3'-
-ciklofoszfamidát
/ B = A, C, G, U; R' = P(O)(NH₂)₂/

12 Ribonukleozid-2',3'-ciklofoszfamidát
/B = A, C, G, U; R' = H/



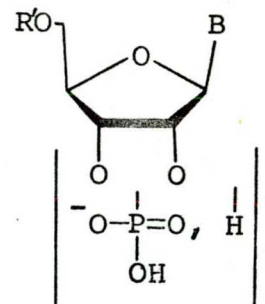
13 Ribonukleozid-5'-foszfodiamidát-2'3'-
-ciklofoszfát
/B = A, C, G, U; R' = P(O)(NH₂)₂/

14 Ribonukleozid-2',3'-ciklofoszfát
/B = A, C, G, U; R' = H/

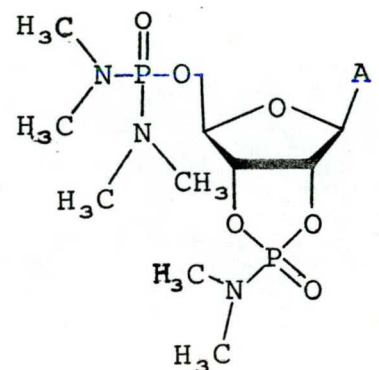


15 Ribonukleozid-5'-foszfodiamidát-2'(3')-
-foszfát
/R = A, C, G, U; R' = P(O)(NH₂)₂/

16 Ribonukleozid-2'(3')-foszfát
/B = A, C, G, U; R' = H/



17 Adenozin-5'-(N,N,N',N'-tetrametil)-
-foszfodiamidát-2',3'-(N,N' dimetil)-
-ciklofoszfamidát

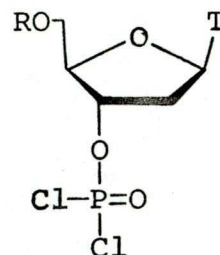


Szám

Név

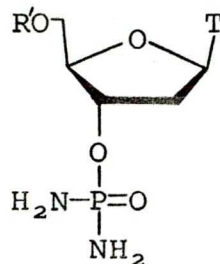
Képlet

18 Timidin-3',5'-bisz(diklórfoszfát)
/R = P(O)Cl₂/



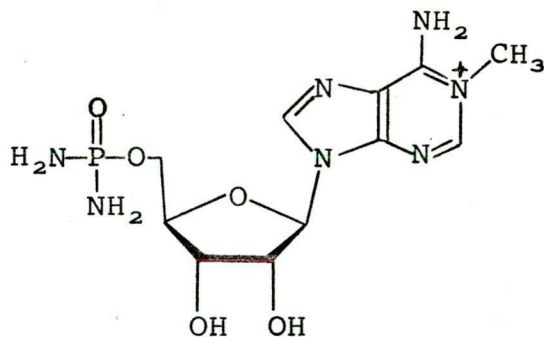
19 Timidin-3'-diklórfoszfát
/R = H/

20 Timidin-3',5'-di(foszfodiamidát)
/R' = P(O)(NH₂)₂/

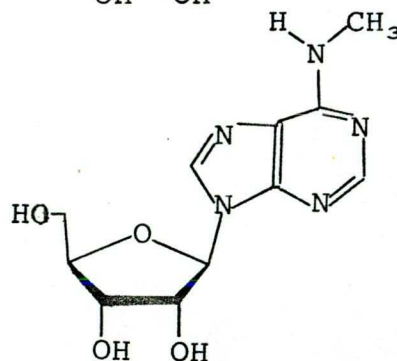


21 Timidin-3'-foszfodiamidát
/R' = H/

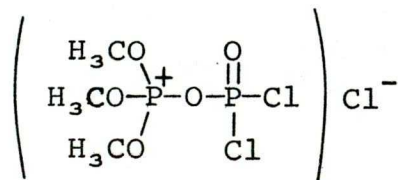
22 1-Metil-adenozin-5'-foszfodiamidát

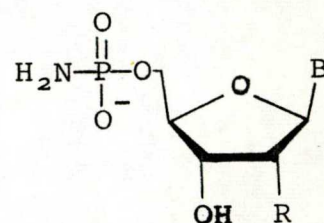
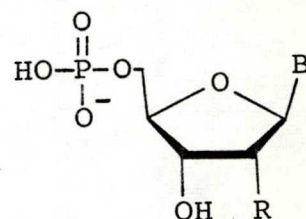
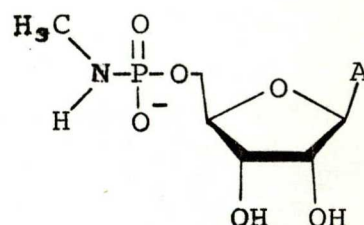
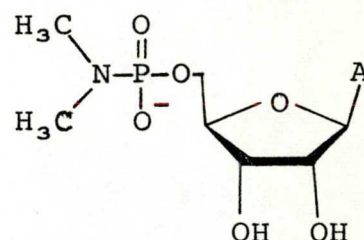
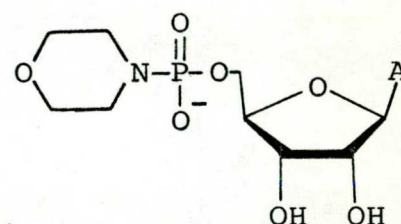
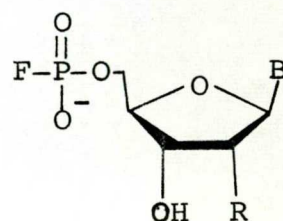


23 N⁶-Metil-adenozin



24 Diklórfoszforiloxi-trimetoxifoszfónium klorid



SzámNévKéplet25a Adenozin-5'-foszfamidát /B = A, R = OH/25b Citidin-5'-foszfamidát /B = C, R = OH/25c Guanozin-5'-foszfamidát /B = G, R = OH/25d Uridin-5'-foszfamidát /B = U, R = OH/25e Timidin-5'-foszfamidát /B = T, R = H/26a Adenozin-5'-foszfát /B = A, R = OH/26b Citidin-5'-foszfát /B = C, R = OH/26c Guanozin-5'-foszfát /B = G, R = OH/26d Uridin-5'-foszfát /B = U, R = OH/26e Timidin-5'-foszfát /B = T, R = H/27 Adenozin-5'-(N-metil)-foszfamidát28 Adenozin-5'-(N,N-dimetil)-foszfamidát29 Adenozin-5'-foszfomorfolidát30a Adenozin-5'-fluorfoszfát /B = A, R = OH/30b Citidin-5'-fluorfoszfát /B = C, R = OH/30c Guanozin-5'-fluorfoszfát /B = G, R = OH/30d Uridin-5'-fluorfoszfát /B = U, R = OH/30e Timidin-5'-fluorfoszfát /B = T, R = H/

NUCLEOSIDE 5'-PHOSPHORDIAMIDATES

S. BOTTKA and J. TOMASZ*

Institute of Biophysics, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences,
 H-6701 Szeged, Hungary

(Received in UK 4 May 1979)

Abstract—A one-flask method is reported for the preparation of the 5'-phosphordiamidate of adenosine (**3a**), cytidine (**3b**), guanosine (**3c**), uridine (**3d**) and thymidine (**3e**), and also for that of adenosine 5'-(N,N'-dimethyl) phosphordiamidate (**4a**), adenosine 5'-(N,N,N',N'-tetramethyl) phosphordiamidate (**5a**) and adenosine 5'-phosphordimorpholidate (**6a**). The method is based on the aminolysis of nucleoside 5'-phosphordichloridates performed *in situ* by NH₄OH, or aqueous amine solutions, respectively.

Nucleoside 5'-phosphordiamidates derived from ammonia (**3**) are useful synthetic intermediates. The selective substitution of one of their two amide groups under mild conditions rendered possible the elaboration of the synthesis of nucleoside 5'-phosphoramidates from nucleosides¹ and the preparation of P¹-(nucleoside 5'-)P¹-amino-triphosphates.² The synthesis of 5'-pyrophosphate and 5'-triphosphate derivatives of purine diribonucleoside monophosphates was accomplished also via phosphordiamidate intermediates.³

Hitherto, of the phosphordiamidates **3**, merely the synthesis of thymidine 5'-phosphordiamidate (**3e**) has been reported in detail.¹ This was performed according to the one-flask method summarised in Scheme 1. This method has now been improved and demonstrating its widespread applicability, been extended also to the preparation of some N(P)-alkylated adenosine 5'-phosphordiamidates. The present paper describes the synthesis of the 5'-phosphordiamidates of the four major ribonucleosides (**3a-3d**) and thymidine 5'-phosphordiamidate (**3e**) according to an improved procedure, as well as, that of adenosine 5'-(N,N'-dimethyl) phosphordiamidate (**4a**), adenosine 5'-(N,N,N',N'-tetramethyl) phosphordiamidate (**5a**) and adenosine 5'-phosphordimorpholidate (**6a**).

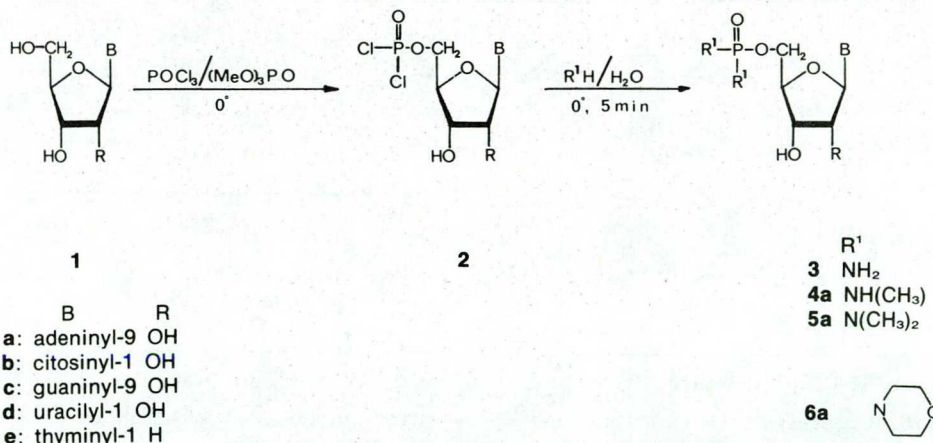
prepared from nucleosides (**1**) according to Yoshikawa's method⁴ and were transformed *in situ* into the phosphordiamidates with an excess of 7.0 N NH₄OH (for **3**), aqueous CH₃NH₂ (for **4a**), (CH₃)₂NH (for **5a**) and morpholine (for **6a**), respectively, at 0° for 5 min (Scheme 1).

Besides the main product, **3** and some unreacted starting material, **1**, the reaction mixtures always contained different by-products in small quantities (altogether <5%). For example, in the synthesis of the phosphordiamidate, **3a**, the following by-products were identified: adenosine 2',3'-(cyclic) phosphate (**7**), adenosine 2',3'-(cyclic) phosphate 5' phosphordiamidate (**8**), adenosine 5'-phosphoramidate (**9**), adenosine 5'-phosphate (**10**) and 1-methyladenosine 5'-phosphordiamidate (**11**) (Scheme 2).

The formation of by-products of similar types during the synthesis of the phosphordiamidates **3b**, **3c**, **3d**, **4a**, **5a** and **6a** might be suggested on the basis of a comparative tlc analysis of the appropriate peaks after column chromatographic separation of the mixtures. The formation of by-products may be ascribed partly to the non-selectivity of the Yoshikawa-reaction⁵ (**7** and **8**), partly to the hydrolytic fission of P-Cl bonds of compound **2** (**9** and **10**) and, finally to the methylating ability of (MeO)₃PO, the solvent of the Yoshikawa-reaction in alkali (**11**).⁶ To interpret the formation of the by-products **7** and **8**, the extreme lability of ribonucleoside 2'-(3')-phosphoramidates and ribonucleoside 2',3'-(cyclic)-phosphoramidates should also be taken into account. Instead of these derivatives 2',3'-(cyclic) phosphates could always be isolated.^{1,7}

RESULTS AND DISCUSSION

The one-flask method has been elaborated for the synthesis of the phosphordiamidates **3**, **4a**, **5a**, and **6a**, as follows. Nucleosides 5'-phosphordichloridates (**2**) were



Scheme 1.

Table 2. ^{13}C Chemical shifts (ppm) and coupling constants (Hz)^a of the phosphordiamidates **4a**, **5a** and **6a**

	<u>4a</u>	<u>5a</u>	<u>6a</u>
C-2	153.69	153.80	153.84
C-4	149.61	149.68	149.71
C-5	119.45	119.56	119.52
C-6	156.23	156.35	156.37
C-8	140.47	140.49	140.63
C-1'	88.77	89.03	89.09
C-2'	70.89	70.65	70.46
C-3'	75.00	74.77	74.29
C-4'	83.83	83.49	82.99
C-5'	65.14	64.84	64.99
P-N-CH ₃	27.15	36.75 36.59	-
P-N-CH ₂	-	-	44.95 44.85
P-N-CH ₂ -CH ₂ -O	-	-	67.55 67.48
³ J _{PC4'}	8.21	8.67	8.48
² J _{PC5'}	5.02	4.74	4.67
² J _{PNC}	<0.3	0.82	1.57
³ J _{PNC}	-	-	3.75

^aFor details see Experimental

hydrolysis of the phosphordiamidates **3** was accompanied by the release of NH₃ as demonstrated by Nessler reagent. The substituents attaching to the amide nitrogens of the phosphordiamidates **4a**, **5a** and **6a** were identified by ^{13}C NMR spectroscopy (Table 2). (5) The phosphordiamidates **3** and **4a**, but not **5a** and **6a** could be hydrolysed to nucleosides by 0.1 N and 1.0 N NaOH respectively, at room temperature. The rapid basic hydrolysis of those phosphordiamidates bearing at least one ionisable (P)N-H groups is well-known.¹¹

EXPERIMENTAL

Materials. Nucleosides (Sigma) were dried over P₂O₅ at 1 mmHg and 110° for 8 hr POCl₃, morpholine and (MeO)₃PO (at 1 mmHg) were freshly distilled. 7.0 N aqueous solns of CH₃NH₂ and (CH₃)₂NH were prepared from the commercial 40% ones. All other chemicals were of reagent grade. Compound **8** was prepared from adenosine by P₂O₅Cl₄ and subsequent aminolysis as reported in detail for the analogous guanosine derivatives.¹ The other adenosine derivatives used as control compounds, as well as *Escherichia coli* alkaline phosphatase were commercial products (Sigma).

Methods. M.ps are uncorrected and were determined on a Kofler apparatus. Evaporations were carried out using a rotary evaporator at 1 mmHg with a bath temp. of 30°. Absorption spectra were recorded on a Cary 15 spectrophotometer at pHs 1.0, 7.0 and 11.0. ^{13}C NMR spectra were obtained in D₂O at 25.16 MHz using a Varian XL-100/15 NMR spectrometer equipped with disk accessory. Dioxane was employed as internal reference, but the reported chemical shifts referred to TMS (dioxane 67.71 ppm). Mass spectral measurements were carried out with an accuracy of 3 ppm at a resolving power of 10,000 by an AEI MS-902 double focusing instrument operating at 70 eV and 200°. For the silylation of the phosphordiamidates the method of Miller *et al.* was applied.¹²

Column chromatography was performed in the following systems: Cl, column: Dowex 1×8 (AG, 200-400 mesh, Serva, HCOO⁻ form, 2.0×64 cm), eluent: deionized H₂O, elution rate:

32 ml/hr, fraction volume: 8 ml; C2 α , C2 β and C2 γ , column: silica gel (100-200 μm , Serva, activated at 300° for 3 hr, 1.4×32 cm), stepwise elution with the eluents: α , CHCl₃-MeOH (9:1, 315 ml, 8:2, 360 ml), β , CHCl₃-MeOH (8:2, 450 ml, 6:4, 1065 ml) and γ , CHCl₃-EtOH (8:2, 300 ml, 6:4, 520 ml), elution rate: 120 ml/hr, fraction volume: 15 ml; C3, column: Dowex 1×2 (AG, 200-400 mesh, Serva, OH-form, 1.6×53 cm), eluent: H₂O-MeOH (7:3), elution rate: 32 ml/hr, fraction volume: 16 ml; C4 α and C4 β , column: DEAE-cellulose (DE 32, Whatman, HCO₃⁻ form, 1.4×32 cm), eluents: α , deionised H₂O, elution rate: 10 ml/hr, fraction volume: 5 ml, β , deionised H₂O (90 ml) then a linear gradient of H₂O-0.3 M aqueous triethylammonium hydrogencarbonate, pH 7.5 (1000 ml), elution rate: 30 ml/hr, fraction volume: 10 ml.

Tlc was performed on precoated hptlc chromatoplates (Silica Gel 60 F₂₅₄, Merck) in the solvent systems: S1, 1-PrOH-conc NH₄OH-H₂O (11:7:2), S2, CHCl₃-MeOH (7:3); S3, CHCl₃-MeOH (4:6) and on precoated PEI-cellulose chromatoplates (Polygram Cel 300 PEI/UV₂₅₄, Macherey, Nagel + Co) in the soln S4, 0.1 M NaCl. Spots were detected by UV absorption, R_f values are listed in Table 3.

Hydrolytic degradations were performed at room temp. using 0.025 M solns of the phosphordiamidates in 1.0 N HCl, as well as, 0.1 N and 1.0 N NaOH, respectively. Enzymic hydrolysis was carried out with 1.0 A₂₆₀ unit of the substrate and 0.3 unit of *Escherichia coli* alkaline phosphatase in 10 μl of 0.1 M NaHCO₃ buffer, pH 10.6, at 37°, for 1 hr. Hydrolyses were followed by tlc.

General procedure for the synthesis of the phosphordiamidates **3, **4a**, **5a** and **6a**.** The whole procedure was performed at 0°. POCl₃ (200 μl , 2.2 mmol) was added to a well-stirred suspension of the nucleoside (1.0 mmol) in (MeO)₃PO (2.5 ml). Stirring was continued with the exclusion of atmospheric moisture for 1 hr (**1a** and **1b**), or 2 hr (**1c**), or 7 hr (**1d** and **1e**). The resulting soln was poured into 7.0 N NH₄OH (for **3**), or 7.0 N aqueous CH₃NH₂ (for **4a**), or (CH₃)₂NH (for **5a**), or morpholine (for **6a**) {10 ml in each case} with stirring. After standing 5 min, the soln was evaporated to dryness. The residue was dissolved in deionised H₂O at 40-50° (7 ml for **3a**, 16 ml for **3c**) or H₂O-MeOH (7:3) (5 ml for **4a**, **5a** and **6a**), or was suspended in MeOH (5 ml for **3b**, **3d** and **3e**). Then each mixture was subjected to column chromatographic

Table 3. R_f values of compounds

Compound	Rf values in the systems			
	S1	S2	S3	S4
<u>1a</u>	0.72	0.57	0.65	0.57
<u>3a</u>	0.64	0.09	0.30	0.59
<u>7</u>	0.58		0.45	0.35
<u>8</u>	0.59		0.07	0.32
<u>9</u>	0.57		0.15	0.41
<u>10</u>	0.45			0.11
<u>11</u>	0.58			0.92
1-Methyladenosine	0.65	0.12	0.17	0.95
<u>1b</u>	0.59	0.26	0.60	0.75
<u>3b</u>	0.47		0.26	0.80
Cytidine 5'-phosphate	0.31			0.18
<u>1c</u>	0.62			0.52
<u>3c</u>	0.47			0.52
Guanosine 5'-phosphate	0.27			0.08
<u>1d</u>	0.51	0.64	0.80	0.81
<u>3d</u>	0.44	0.20	0.51	0.87
Uridine 5'-phosphate	0.48			0.15
<u>1e</u>	0.72	0.83	0.89	0.95
<u>3e</u>	0.64	0.18	0.58	0.85
Thymidine 5'-phosphate	0.44			0.19
<u>4a</u>	0.69	0.36	0.54	0.77
<u>5a</u>	0.73	0.56	0.68	0.83
<u>6a</u>	0.68	0.47	0.61	0.84

separation. For details of separation see Table 1. Appropriate fractions containing the product were pooled and evaporated to dryness. The residue was dissolved in deionised H₂O (15 ml for **3a** and **3c**, 2 ml for the other compounds) and the soln was chromatographed in the system C4 α . Fractions containing the phosphordiamidate (8–12) were pooled and evaporated to dryness. Traces of hydrogencarbonates were removed by repeated co-evaporation with H₂O. The residues of the phosphordiamidates **3a** and **3c** were recrystallised from hot H₂O, while that of **3e** from MeOH. The phosphordiamidates **3b**, **3d**, **4a**, **5a** and **6a** crystallised upon standing under anhydrous ether. The acid hydrolysis of the phosphordiamidates—except that of **6a** was quantitative within 4 hr. For the quantitative hydrolysis of compound **6a** about 48 hr was necessary. The phosphordiamidates **3** were quantitatively hydrolyzed in 0.1 N NaOH for 5 min, but more than 3 days was required for the hydrolysis of phosphordiamidate **4a** in 1.0 N NaOH.

Identification of by-products formed during the synthesis of the phosphordiamidate 3a. The first peak obtained during the column chromatographic separation of the mixture of the phosphordiamidate **3a** in the system C1 was pooled and evaporated. The UV spectra of the compound at pHs 1.0, 7.0 and 11.0 closely resembled those of 1-methyladenosine.¹³ The compound was quantitatively converted to 1-methyladenosine by acid hydrolysis and subsequent incubation with *Escherichia coli* alkaline phosphatase as detected by tlc comparison with an authentic specimen.

An aliquot (about 20%) of the mixture was separated in the system C4 β . The first peak eluted by the gradient contained, **7**, **8** and **9**, while the second one the phosphate **10** as detected by tlc comparison with authentic specimens.

Acknowledgements—The mass spectrometric and ¹³C NMR measurements performed by Drs J. Tamas, L. Radics and M. Kajtar-Peredy (Central Research Institute of Chemistry, Budapest), as well as, the skillful technical assistance of Miss K. Laszlo and Mr. Gy. Weisz are gratefully acknowledged.

REFERENCES

- 1 A. Simoncsits and J. Tomasz, *Nucleic Acids Res.* **2**, 1223 (1975).
- 2 A. Simoncsits and J. Tomasz, *Tetrahedron Letters* 3995 (1976).
- 3 J. Tomasz, A. Simoncsits, M. Kajtar, R. M. Krug and A. J. Shatkin, *Nucleic Acids Res.* **5**, 2945 (1978).
- 4 M. Yoshikawa, T. Kato and T. Takenishi, *Bull. Chem. Soc. Japan* **42**, 3505 (1969).
- 5 W. H. Dawson, R. L. Cargill and R. B. Dunlap, *J. Carbohydrates-Nucleosides-Nucleotides* **4**, 363 (1977).
- 6 K. Yamauchi and M. Kinoshita, *J.C.S. Perkin I* 762 (1978).
- 7 Z. A. Shabarova, *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **10**, 145 (1970).
- 8 C. A. Dekker, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4027 (1965).
- 9 J. Tamas, manuscript in preparation.
- 10 A. J. Kirby and S. G. Warren, *The Organic Chemistry of Phosphorus*, p. 294. Elsevier, Amsterdam (1967).
- 11 J. Rebeck, Jr., F. Gavina and C. Navarro, *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 8113 (1978) and the refs cited.
- 12 V. Miller, V. Pacakova and E. Smolkova, *J. Chromatogr.* **119**, 335 (1976).
- 13 *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Nucleic Acids* (Edited by G. D. Fasman), 3rd Edn, Vol. 1, p. 98, 432. CRC Press, Cleveland (1975).