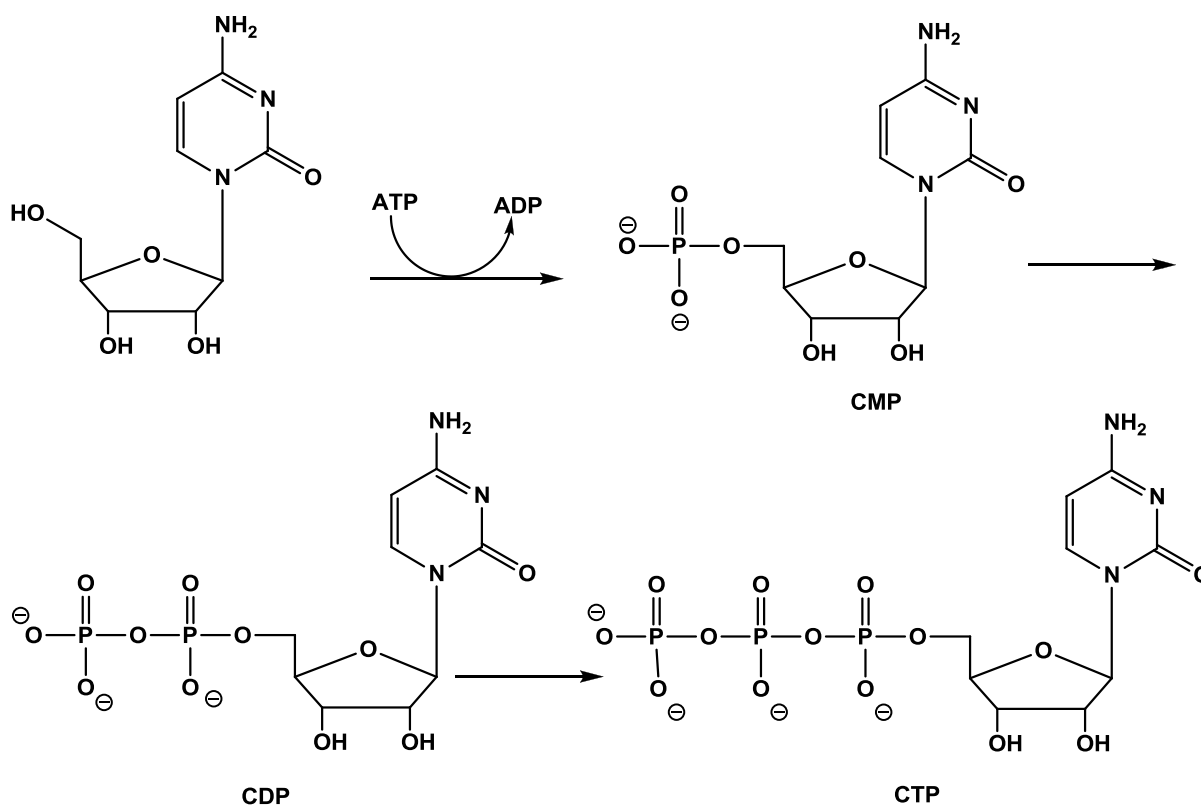




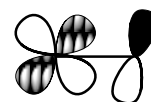
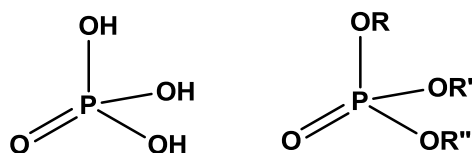
Metody fosforylacji

Fosforylacja jest procesem przenoszenia reszty fosforanowej do nukleofilowego atomu dowolnego związku chemicznego. Najczęściej fosforylację przeprowadza się na atomie tlenu grupy hydroksylowej lub atomie azotu grupy aminowej. W organizmach żywych proces fosforylacji zachodzi z udziałem donora reszty fosforanowej, najczęściej jest nim cząsteczka ATP, a rolę katalizatora pełnią kinazy, enzymy z grupy transferaz. Przenoszą one reszty fosforanowe na akceptory: białka, nukleozydy i nukleotydy, cukry, lipidy i itp. Synteza trifosforanów nukleozydów, elementów budulcowych w syntezie kwasów nukleinowych zachodzi w trzech etapach, w każdym etapie zostaje dobudowana jedna grupa fosforanowa (Schemat 1). Szczególnym przypadkiem fosforylacji są reakcje powstawania wysokoenergetycznych cząsteczek ATP, które mogą zachodzić na różnych drogach (np. fosforylacja oksydacyjna, fosforylacja substratowa lub fosforylacja fotosyntetyczna).

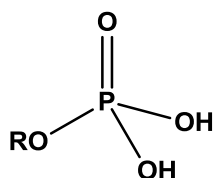


Schemat 1. Powstawanie trifosforanu nukleozydu

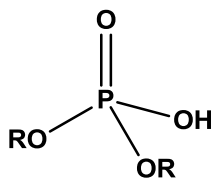
Ze względu na duże zapotrzebowanie na syntetyczne oligonukleotydy, koniecznym było opracowanie metod syntezy szeregu pochodnych fosforanów jak i ich analogów takich jak pochodne kwasu tiofosforowego i fosfonowego (Schemat 2).



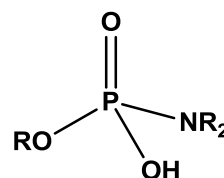
R, R', R'' - grupy alkilowe



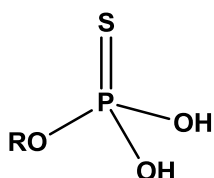
monofosforan



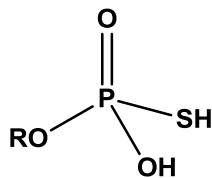
difosforan



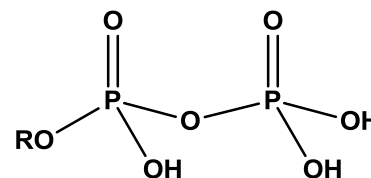
dialkiloamidomonofosforan



tiomonofosforan



tiolofosforan

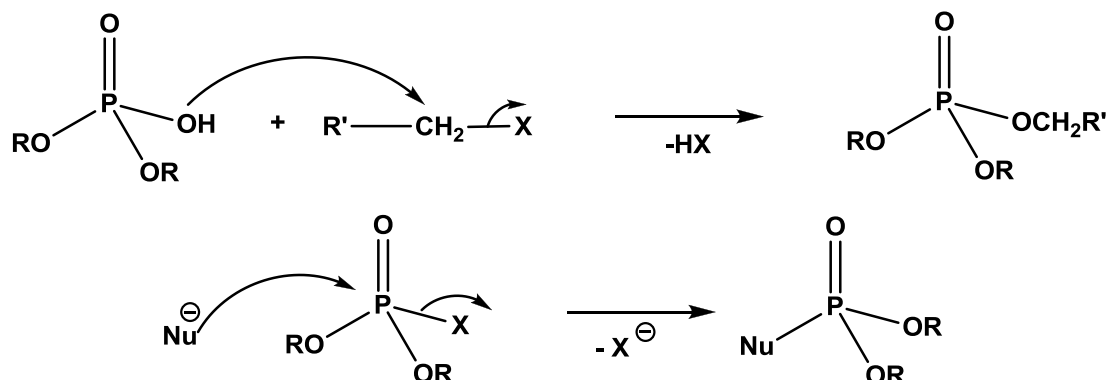


difosforan
pirofosforan

Schemat 2. Pochodne fosforanowe nukleozydów i ich analogi

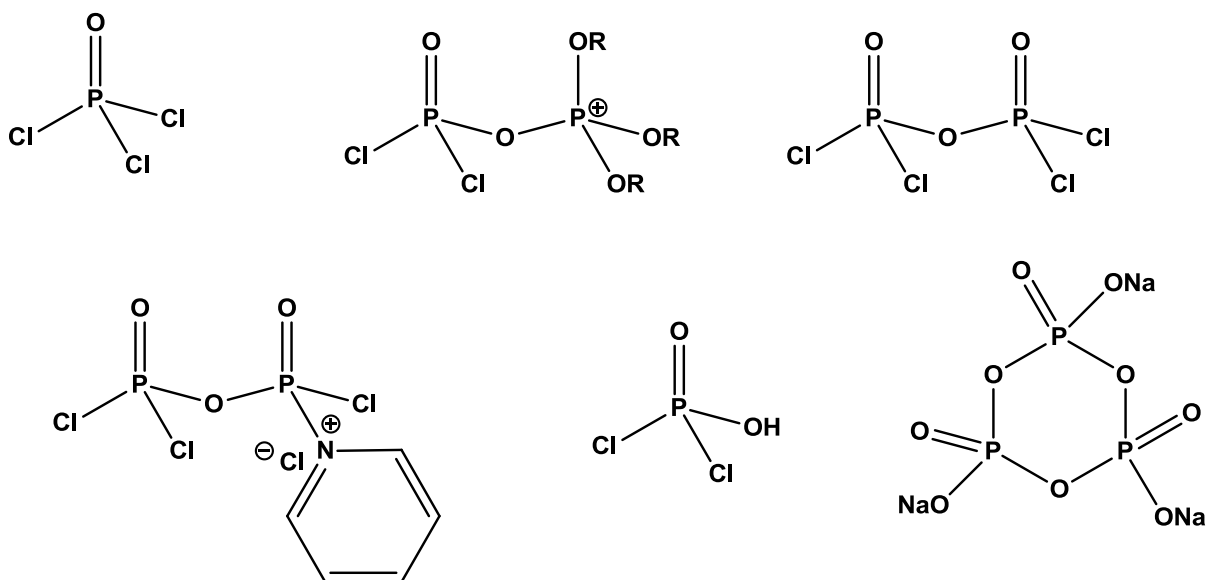
W połączeniach chemicznych fosfor może występować na +3 lub +5 stopniu utlenienia. W związkach pochodzenia naturalnego fosfor występuje głównie na +5 stopniu utlenienia. Pojedyncze wiązania P-O powstają w wyniku nakładania się orbitali typu sp^3 , ich długość to ok. 1.6 Å. Wiązanie podwójne P=O powstaje w wyniku nałożenia orbitali p tlenu i d fosforu ($p_\pi d_\pi$), jest ono krótsze i wynosi 1.46 Å. Kwas fosforowy jak może tworzyć trzy rodzaje estrów: mono-, di- i trifosforany. Trifosforany typu $O=P(OR)(OR')(OR'')$ są rozpuszczalne w większości rozpuszczalników organicznych. Atom fosforu w trifosforanach tego typu stanowi centrum stereogeniczne. Diestry $O=P(OR)(OR')(OH)$ są rozpuszczalne w wodzie. Ich roztwory wodne mają odczyn silnie kwaśny, a pK_a dla diestrów równa się 1.5. Monoestry typu $O=P(OR)(OH)_2$ są także rozpuszczalne w wodzie, a pK_a ma wartości odpowiednio 1.5 i 6.6. W pH fizjologicznym występują one jako mieszanina mono- i dianionów. Aniony di- i monoestrów są wyjątkowo odporne na hydrolizę. Atak nukleofilowy wymaga pokonania efektu odpychającego ładunków ujemnych obecnych w anionie. Natomiast triestry są łatwo podatne na atak nukleofilowy i łatwo ulegają hydrolizie. Wprowadzanie grupy fosforanowej, w przypadku nukleozydu mówimy o syntezie nukleotydu, może nastąpić zasadniczo na dwóch drogach: ataku nukleofilowego atomu tlenu na atom węgla połączony z grupą łatwo odchodzącą lub w wyniku ataku nukleofilowego na atom fosforu z odejściem grupy łatwo

odchodzącej (Schemat 3). Na chwilę obecna druga z możliwych dróg syntezy jest wykorzystywana w praktyce.



Schemat 3. Możliwe chemiczne drogi fosforylacji

Jako czynniki fosforylujące stosuje się zaktywowane pochodne (Schemat 4), w wielu wypadkach, synteza oligonukleotydów, czynnik fosforylujący musi mieć zabezpieczone wolne, nie biorące udziału w danej reakcji, grupy hydroksylowe (Tabela 1.). Popularnym czynnikiem fosforylującym jest POCl_3 , stosowany jest w fosforylacji zabezpieczonych nukleozydów.

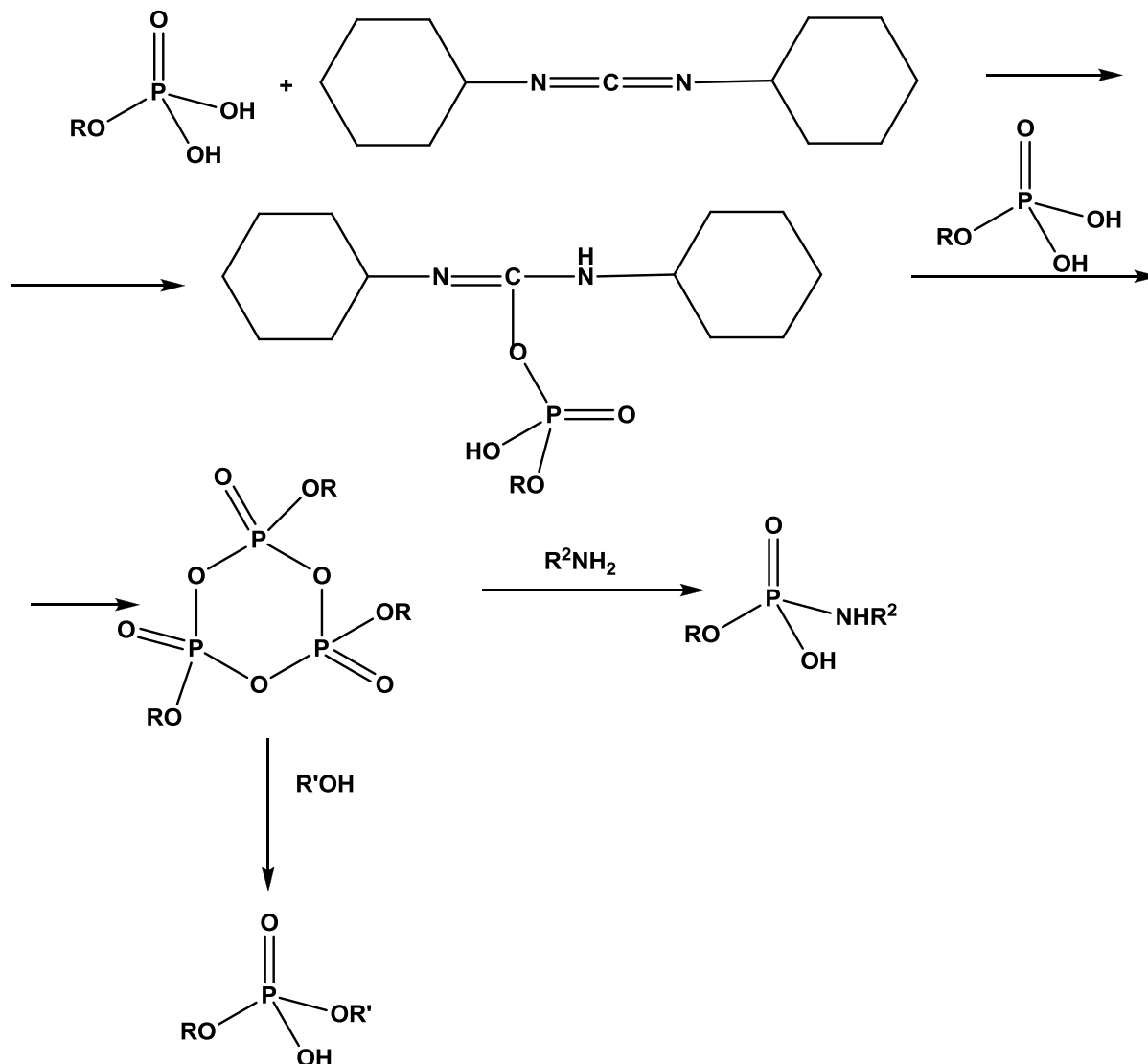


Schemat 4. Popularne czynniki fosforylujące



Tabela 1. Grupy zabezpieczające stosowane w syntezie estrów

Grupa zabezpieczająca	Warunki rozszczepienia
2-ClC ₆ H ₄	OH-/woda, F ⁻
4-ClC ₆ H ₄	OH-/woda,
NCCH ₂ CH ₂	OH-/woda,
4-NO ₂ C ₆ H ₄	Et ₃ N/4-CH ₃ C ₆ H ₄ SH
CCl ₃ CH ₂	Pył cynkowy lub elektrochemicznie
4-NO ₂ C ₆ H ₄ CH ₂	H ₂ /Pd
CH ₃ S	I ₂ /woda

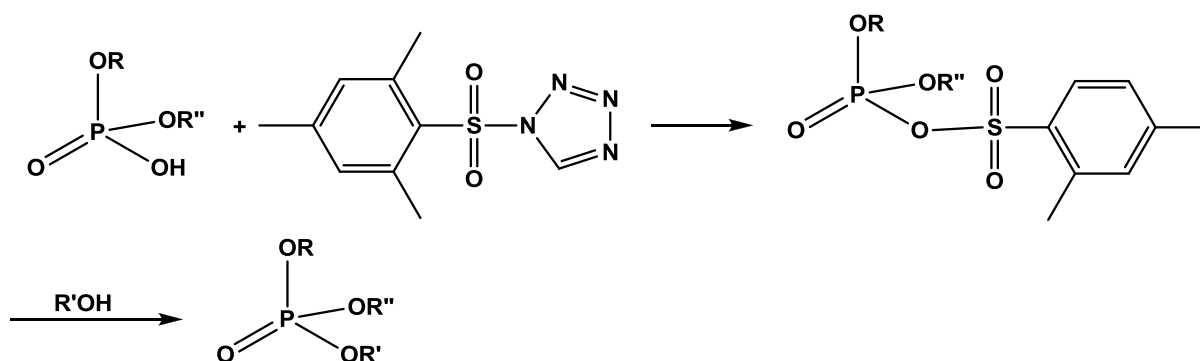


Schemat 5. Synteza nukleotydu w obecności DCC

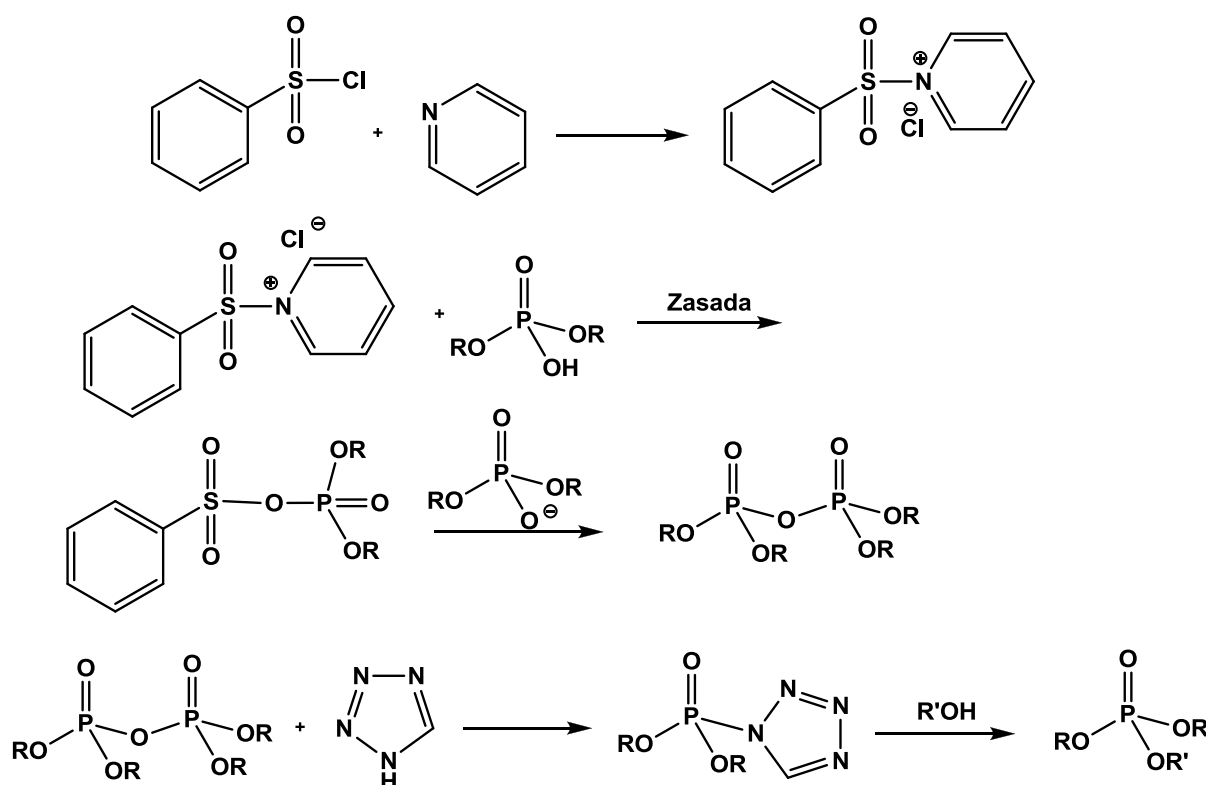
Możliwa jest także estryfikacja niezabezpieczonego nukleozydu w pozycji 5', przy czym reakcja zachodzi z dobrymi wydajnościami, gdy jako rozpuszczalnik stosuje się fosforan trialkilowy. Prawdopodobnie fosforan trialkilu spełnia nie tylko rolę rozpuszczalnika, ale może reagować z POCl₃ tworząc reaktywny w reakcji fosforylowania produkt pośredni (schemat 4, drugi reagent w górnym rzędzie). Aktualnie syntezę fosforanów z pochodnych



fosforu na +5 stopniu utlenienia, przeprowadza się analogicznie jak w estrach kwasów karboksylowych z wykorzystaniem DCC (Schemat 5). Monoester jest aktywowany DCC, w wyniku reakcji powstaje fosforan imidoilu, który reaguje z nadmiarem monoestru tworząc zestyfikowany trimetafosforan. Cząsteczka trimetafosforanu może reagować dalej z dowolnym nukleofilem, mogą powstawać diestry lub amidy. W reakcji tej nie otrzymuje się triestrów.



Schemat 6. Synteza trifosforanów wobec tetrazolidu mezytylenosulfonowego



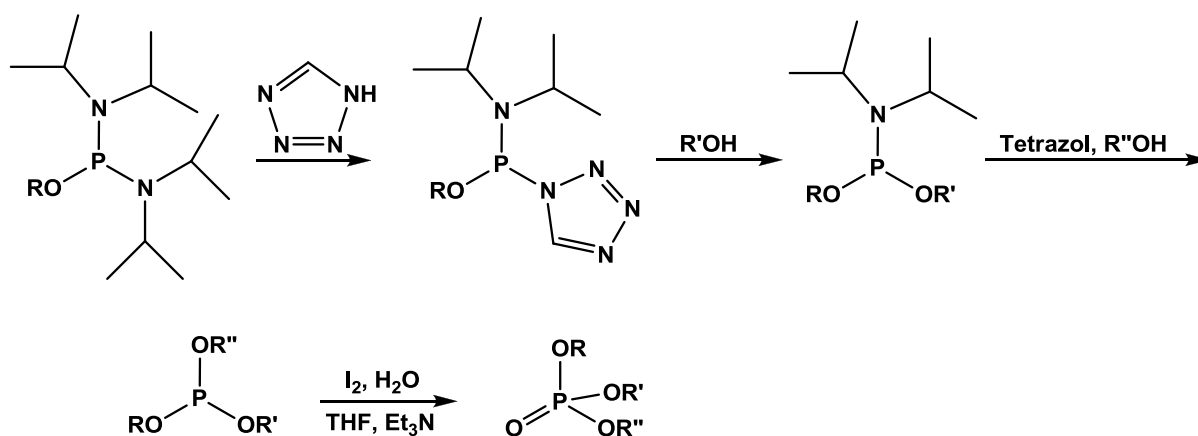
Schemat 7. Aktywowanie fosforanów chlorkami arenosulfonowymi

Difosforany można przeprowadzić w trifosforany w obecności mezytylenosulfonylotetrazolu lub nitrotriazolu jako aktywatora (Schemat 6). Odchodzący anion tetrazoliowy jest słabym nukleofilem i nie konkuruje w reakcji podstawienia z grupą hydroksylową. Innym sposobem



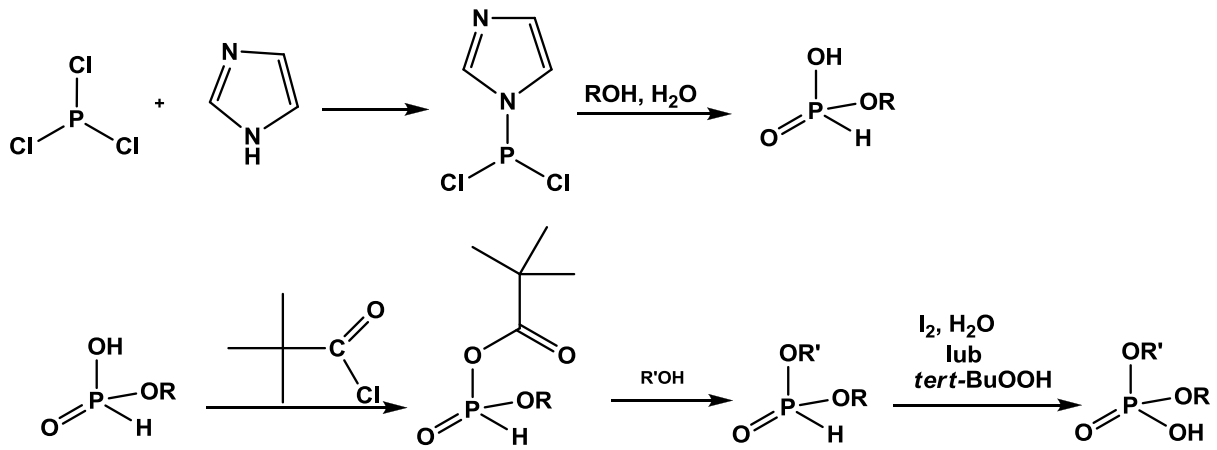
aktywacji monofosforanu jest zastosowanie jako aktywatorów chlorków arenosulfonylowych (Schemat 7). Aktywnym czynnikiem fosforylującym jest tetraester pirofosforanu lub odpowiedni tetrazolid, jeśli reakcję prowadzono w obecności tetrazolu.

Alternatywne metody syntezy nukleotydów bazują na związkach fosforu +3 (Schemat 8, 9). Stabilne diamidy kwasu fosforowego reagują z tetrazolem tworząc przejściowy diamid. Kwasowość tetrazolu jest wystarczająca aby sprotonować drugorzędową grupę aminową, która staje się dobrym nukleofugiem i łatwo ulega podstawieniu anionem tetrazoliowym. Utworzony tetrazolid reaguje szybko z nukleofilem hydroksylowym. Poprzez dobór proporcji reagentów można otrzymać di- lub trifosforyn. Utlenianie przeprowadza się w wodnym roztworze jodu lub wodoronadtlenkiem tert-butylovym.

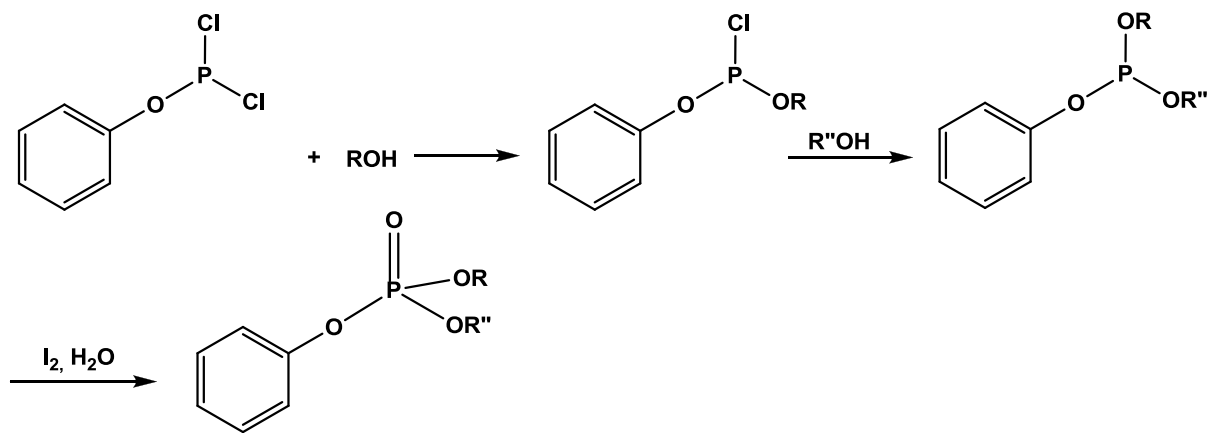


Schemat 8. Synteza trifosforanów z diamidów kwasu fosforowego

W innym wariantcie wykorzystuje się mieszane bezwodniki kwasów karboksylowych i kwasu fosforowego. Trichlorek fosforu traktowany imidazolem a następnie alkoholem tworzy ester kwasu H-fosfonowego. Aktywacje kwasu H-fosfonowego przeprowadza się chlorkami acylowymi posiadającymi zawadę przestrzenną (piwaloilu lub adamantylu). Powstałe mieszane bezwodniki szybko reagują z alkoholami. W ostatnim etapie przeprowadza się utlenienie do fosforanu, ponownie stosuje się roztwór wodny jodu lub wodoronadtlenek *t*-butylu. Inny wariant tej metody syntezy przedstawia schemat 10.



Schemat 9. Synteza fosforanów poprzez kwasy fosfonowe



Schemat 10. Synteza trifosforanów z PCl_3