

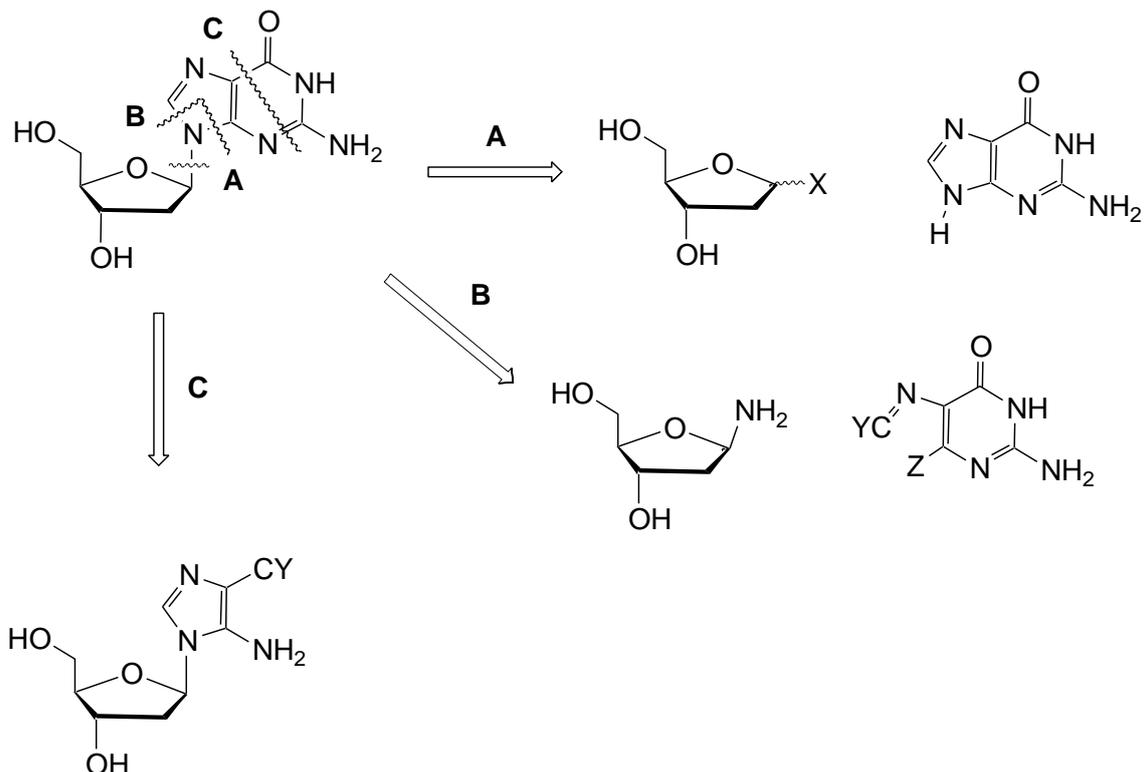
## 2. Synthese der Oligonukleotide

### 2.1 Synthese der Nucleoside

#### 2.1.1 Allgemeines

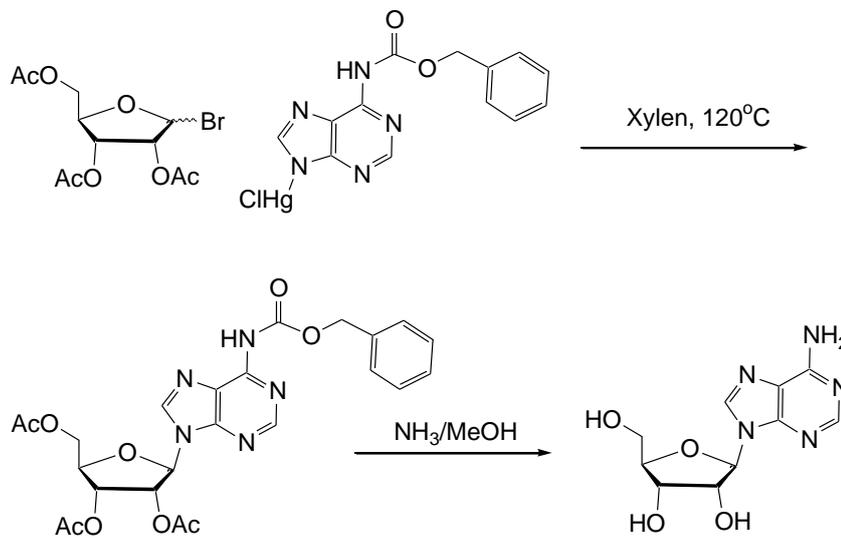
Effiziente Syntheserouten zu Nucleosiden werden zur Synthese verschiedenster Analoga benötigt. Diese Nucleosid Analoga konkurrieren im zellulären Geschehen mit den natürlichen Nucleosiden T, U, C, G und A. Sie stören daher die zellulären Prozesse. Viele derartiger Verbindungen haben anti-virale oder anti-proliferative Eigenschaften. Die t-RNA enthält eine ganze Reihe modifizierter Nucleoside. Das Studium wieso die Natur für die Übersetzung des genetischen Codes auf diese Substanzen zurückgreift bedingt die Synthese dieser modifizierten Nucleoside und deren Einbau in DNA und RNA.

Prinzipiell werden heute drei Wege (A, B und C) zur Synthese von Nucleosiden beschrieben. Auf dem Weg A, findet eine nukleophile Substitution statt. Die Abgangsgruppe befindet sich am anomeren Zentrum des Zuckers. Weg B liegt ebenfalls eine nukleophile Substitution zugrunde. Hier ist das Nucleophil allerdings der Zucker. Weg C bedeutet Aufbau des Heterocyclus am Zuckergerüst.

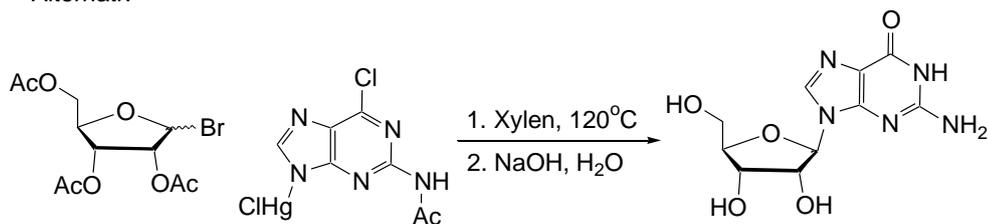


### 2.1.2 Synthesen basierend auf Weg A

Ältere Methoden der Nucleosidsynthese beruhen auf der Umsetzung der Schwermetallsalze der Heterocyclen mit einem Chlor- oder Bromzucker. Diese als Fischer-Helferich oder Koenigs-Knorr Synthesen bekannte Methoden werden heute nur noch vereinzelt angewendet. Als Schwermetallsalze fungieren die weichen  $\text{Hg}^{II+}$  oder  $\text{Ag}^{I+}$  Salze. Für die Synthese müssen alle anderen potentiell nukleophilen Stellen geschützt werden. Nachteilig ist auch die oft schlechte Löslichkeit der Schwermetallsalze. Die Halogenzucker müssen unter wasserfreien Bedingungen gehandhabt werden, da sie sehr hydrolyseanfällig sind.

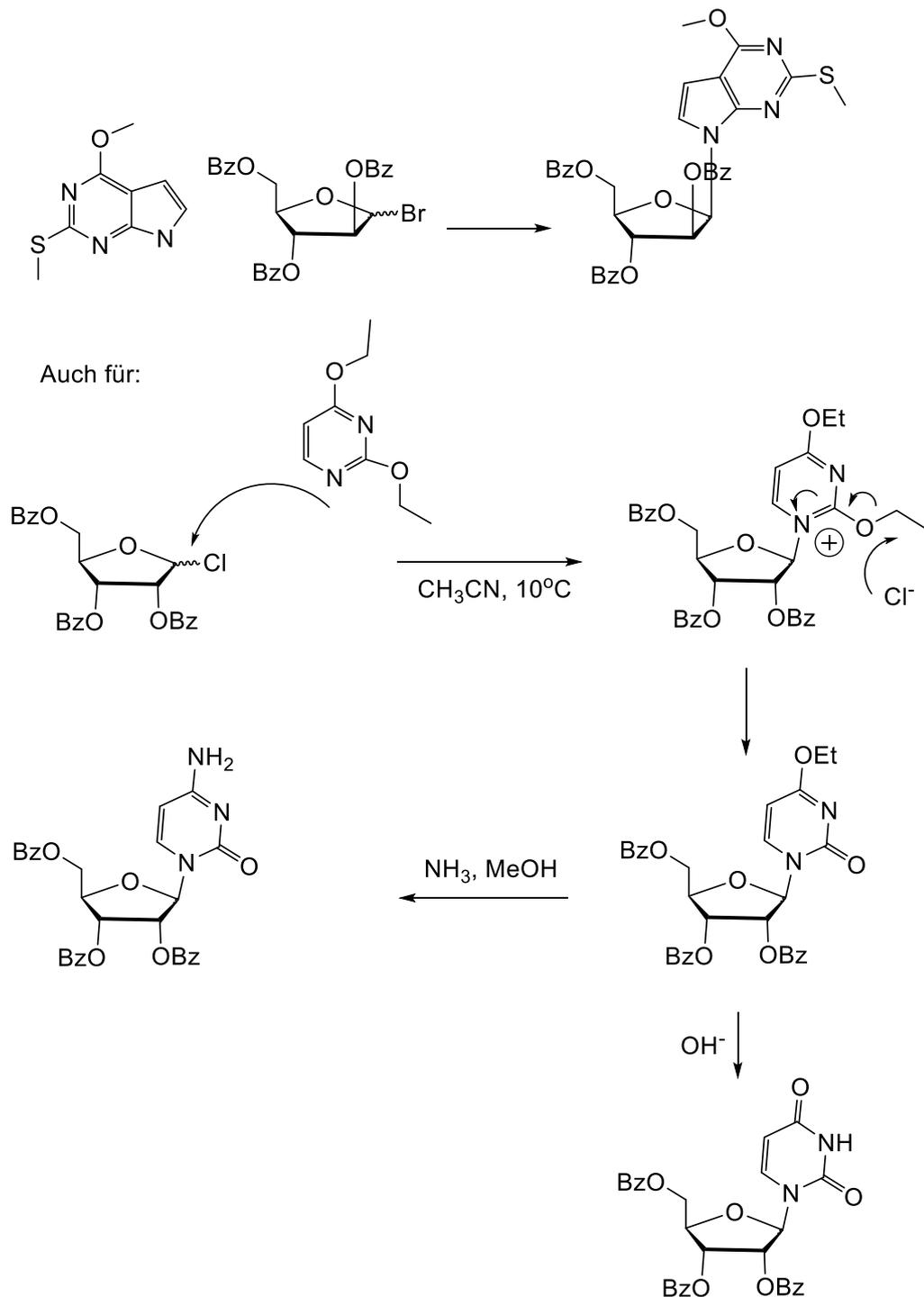


Alternativ

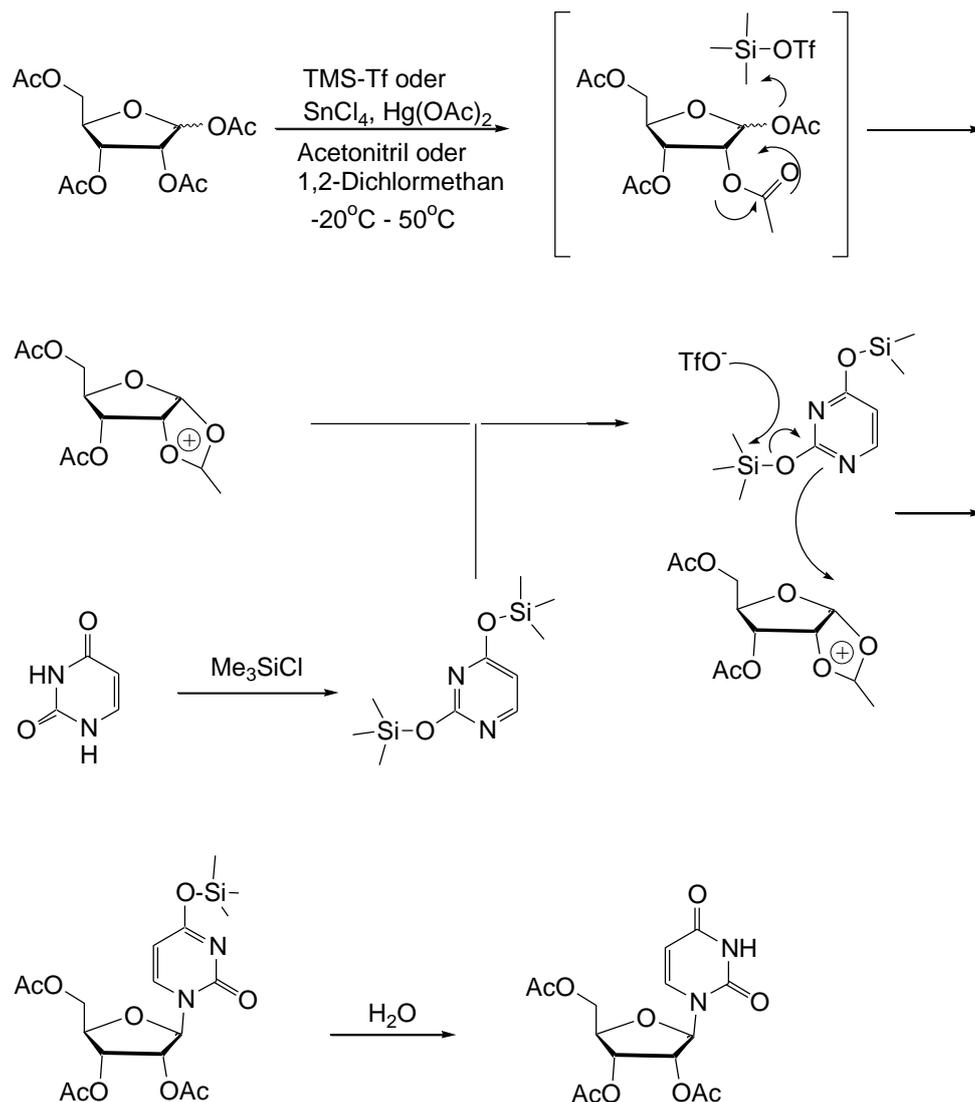


Die Methode liefert in der Regel die richtige regiochemische Verknüpfung d.h. N1 für die Pyrimidine und N9 für die Purine. Die Reaktion verläuft nach einem  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus.

Statt der Schwermetallsalze lassen sich auch die alkylierten Basen verwenden. Deren N-Atome im Heterocyclen sind in der Regel bereits nukleophil genug. Die Methode heißt Hilbert-Johnson Nucleosidierung.

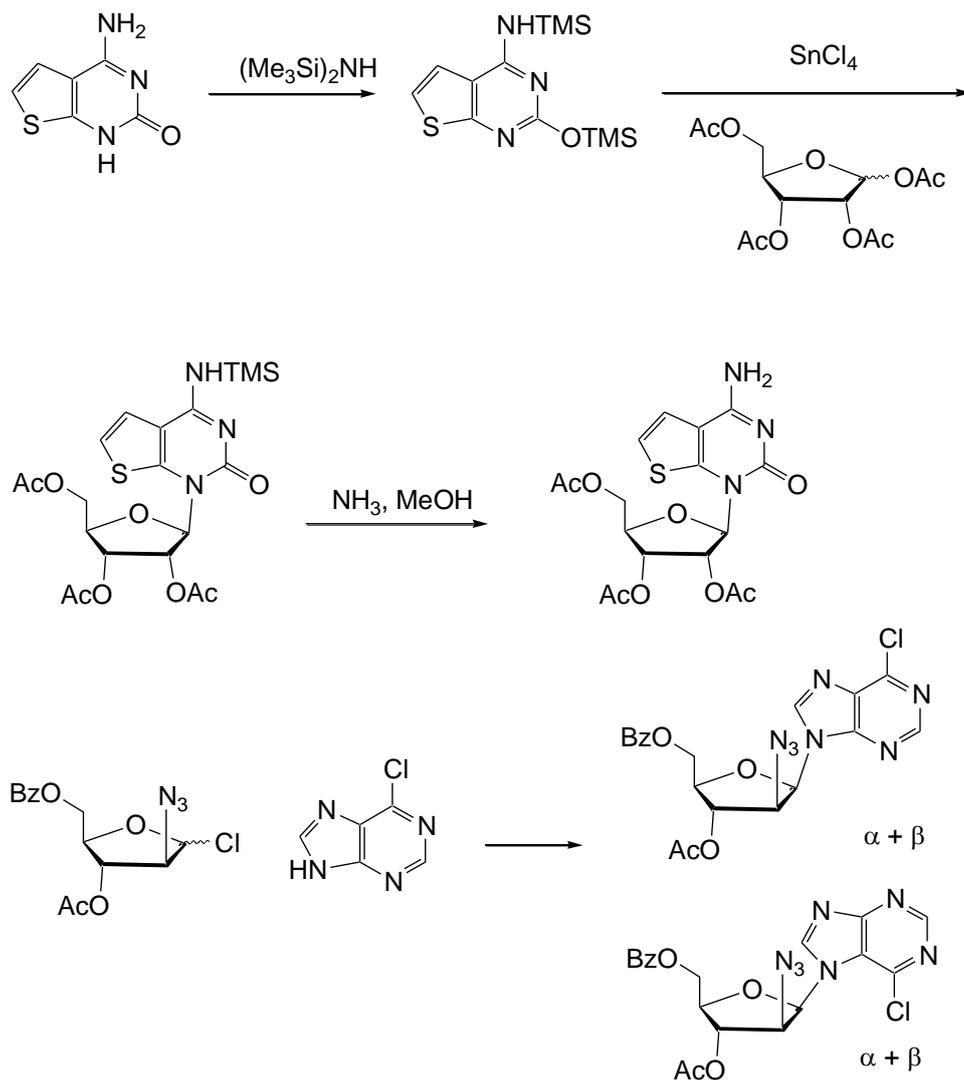


Eine moderne Variante der Hilbert-Johnson Methode ist die Silyl-Hilbert-Johnson Methode, die auch Nukleosidierung nach Vorbrüggen genannt wird. Hierbei wird ein stabilerer Zuckervorläufer, z.B. mit einer schlechteren Abgangsgruppe wie dem Acetat am anomeren Zentrum eingesetzt. Vor der Kupplung wird der Zucker mit einer Lewisäure zur „Aktivierung“ umgesetzt. *In situ* werden die nukleophilen Zentren geschaffen.



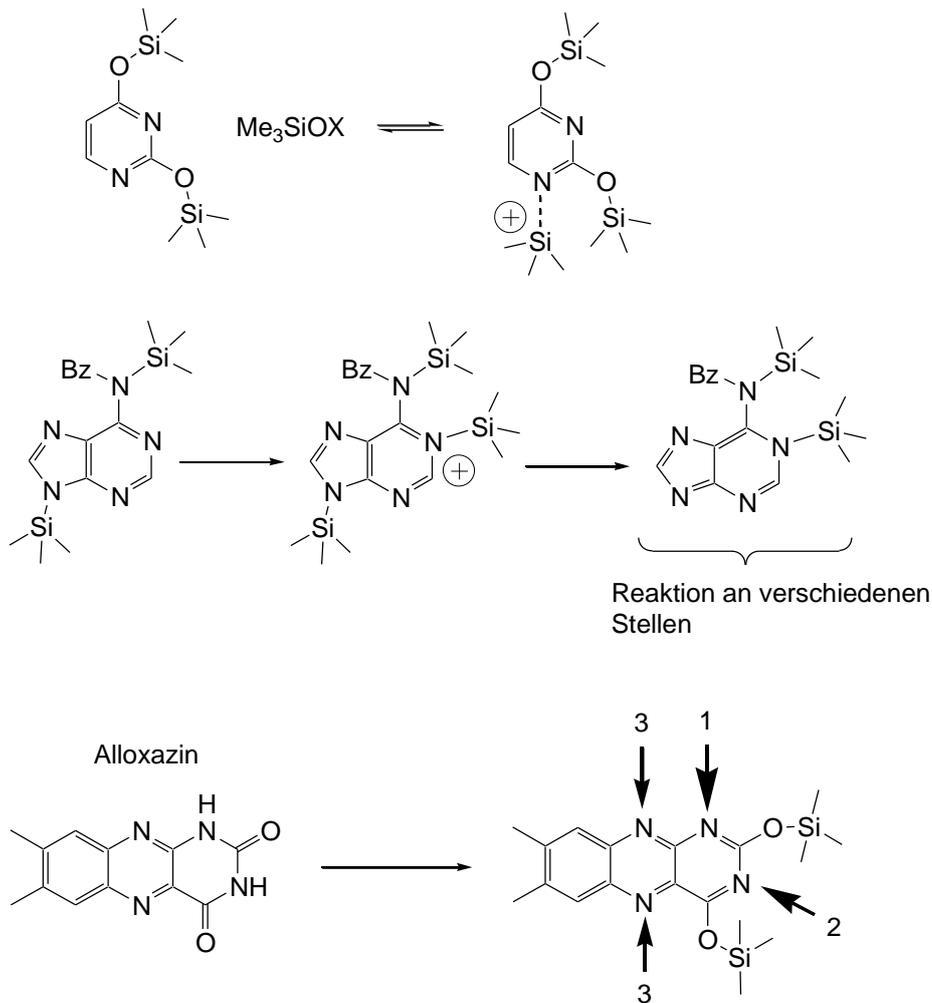
Es entsteht eine Oxycarbenium-Ion Zwischenstufe. Die Nukleosidierung erfolgt daher mehr nach einem  $S_N1$ -Mechanismus und liefert daher meist Gemische des  $\alpha$ - und des  $\beta$ -Produktes. Befindet sich am C2' eine weitere Acetat oder Benzoat-Gruppe so kann das Oxycarbeniumion von dieser Gruppe unter Nachgruppenbeteiligung stabilisiert werden. Die Base kann entweder direkt nach Deprotonierung mit Base (regiochemisch oft uneinheitliche Produkte) oder nach Silylierung (Vorbrücken) eingesetzt werden. Durch die Silylierung (mit HMDS) nimmt die Nukleophilie der N-Atome im Heterocyclus zu. Das freie Elektronenpaar ist nicht mehr an der aromatischen Stabilisierung beteiligt.

Es ist allerdings schwer abzuschätzen wo die Reaktion am Heterocyclus erfolgt und oft werden keine einheitlichen Produkte erhalten. Der Angriff erfolgt immer vom elektronenreichsten d.h. basischsten N im Heterocyclus. Durch den  $S_N1$ -Charakter bedingt ist auch die Bildung eines  $\alpha$ -/ $\beta$ -Anomerengemisches. Zwei weitere Beispiele:



Mechanistisch erfolgt also zunächst die Bildung eines elektrophilen Oxycarbeniumions. Dann bildet sich ein  $\sigma$ -Komplex aus der silylierten Base und der Lewis-Säure. Dann erfolgt die Kupplungsreaktion.

Kritisch ist die  $\sigma$ -Komplexbildung. Bei schwachen Lewissäuren liegt nur wenig Komplex vor. Es reagiert dann das basischste N im Heterocyclus also z.B. das N1 bei Pyrimidinen. Starke Lewissäuren ( $\text{SnCl}_4$ ) führen zur totalen Komplexierung dann reagiert unter Umständen das weniger elektronenreiche Zentrum. Hier hilft dann das Arbeiten in nukleophilen Lösungsmitteln. Das Nucleosidierungen oft Gleichgewichtsreaktionen sind, kann durch Rühren bei leicht erhöhter Temperatur noch ein Umlagern des primär gebildeten kinetischen Produktes zum thermodynamisch günstigeren Produkt erfolgen.



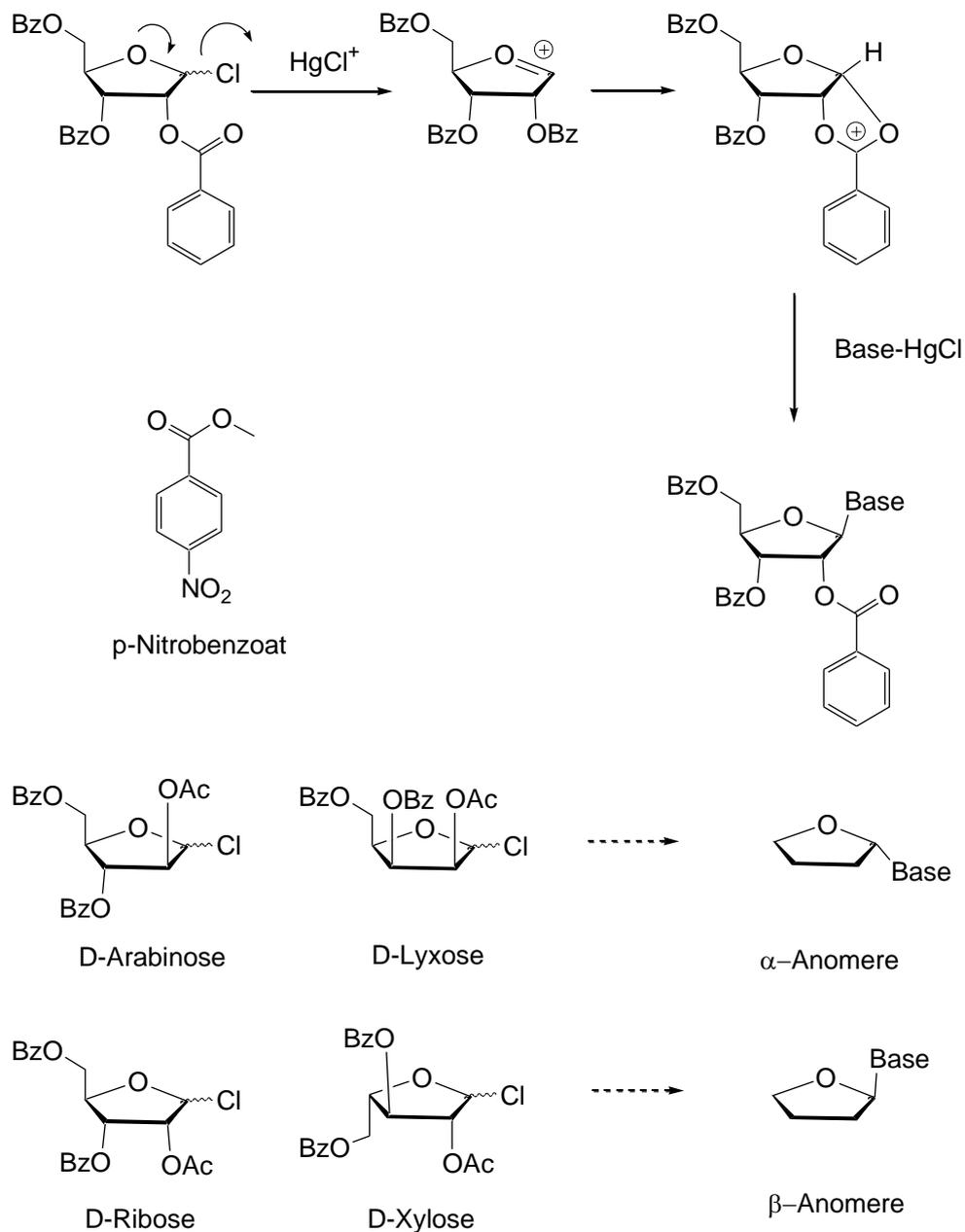
### 2.1.3 Kontrolle der Stereochemie am anomeren Zentrum

Wie oben bereits erwähnt, führen nukleophile Gruppen am C2' zu einer Koordinierung des Oxycarbeniumions. Das ist besonders bei 2'-Acyloxy-oder 2'-benzoyloxygruppen der Fall. Das Oxycarbeniumion wird durch Verbrückung, unter Nachbargruppenbeteiligung stabilisiert. Die Reaktion mit dem Nukleophil erfolgt dann *trans* zur Nachbargruppe. Diese Gesetzmäßigkeit trägt den Namen Bakers-1,2-*trans* Regel.

Aus der Regel folgt, dass die Reaktion der 1'-Chlor-D-Arabinose und 1'-Chlor-D-Lyxose mit einer Base hauptsächlich die  $\alpha$ -Anomeren ergibt. Aus der 1'-Chlor-D-Ribose und der 1'-Chlor-D-Xylose entstehen als Hauptprodukte die  $\beta$ -Anomeren.

Der Nachbargruppeneffekt ist augenfällig wenn die  $\alpha,\beta$ -Verteilung bestimmt wird mit einer p-Nitrobenzoylschutzgruppe an der C2'-OH Gruppe. Der elektronenziehende Effekt der p-Nitrogruppe reduziert die Basizität der einsamen Elektronenpaare am Carboxyl-O-Atom, so dass die Stabilisierung des Oxycarbeniumions schlechter sein

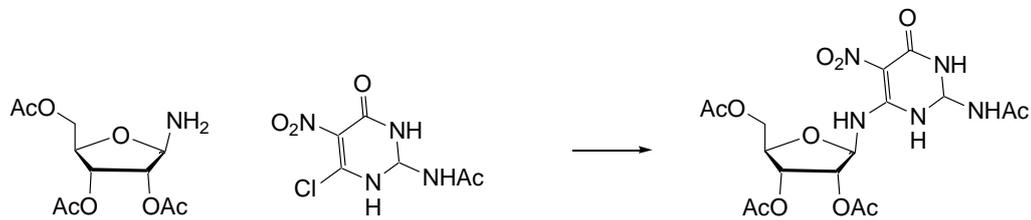
sollt. Genau das wird beobachtet. Es entsteht mehr vom nicht Baker-Regel Produkt als vorausgesagt wird. Die Reaktion wird deutlich weiter ins  $S_N1$ -Regime verlagert.



### 2.1.3 Synthesen basierend auf Strategie B

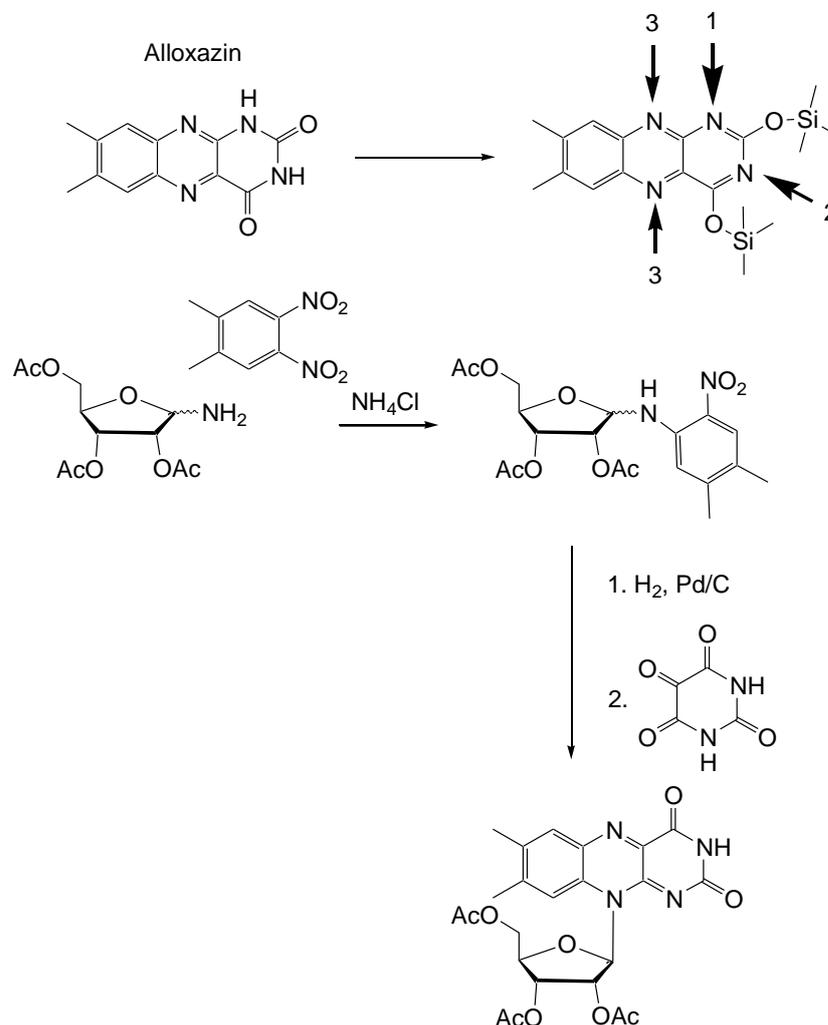
Prinzipiell sind die Basen elektronenarme Heterocylen, in denen durch Alkylierung oder Silylierung nukleophile Zentren geschaffen werden müssen. Den elektronenarmen Charakter der Basen kann man ausnutzen, wenn ein Zuckernukleophil eingesetzt wird. Die Base enthält als Strukturelement quasi ein „vinyloges Säurechlorid“. Dieses wird mit dem Aminozucker umgesetzt. Diese Art der

Nukleosidierung wird relativ selten angewendet. Vom Reaktionstyp her handelt es sich um eine nukleophile Substitution an einem Heteroaromaten, ähnlich wie bei der Umsetzung von Peptiden mit dem Saenger's-Reagenz zur Endgruppenbestimmung.

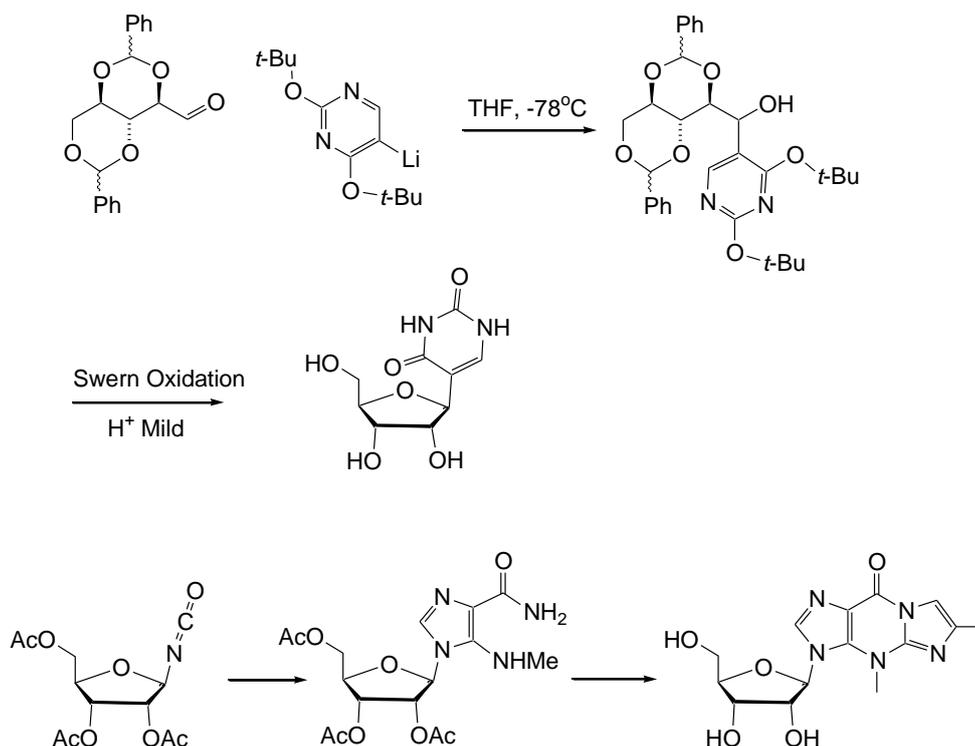


### 2.1.4 Aufbau des Heterocyclus am Zucker

Führen alle Nukleosidierungen nur zur Bildung des falschen Regioisomeren oder reagiert die Base gar nicht, so muss der Heterocyclus am Zuckergerüst aufgebaut werden. Dieser Weg führte z.B. zur erfolgreichen Synthese von Flavin-Basen, die aus den Alloxazinen nicht hergestellt werden können, da andere, im Alloxazin basischere Zentren, bevorzugt reagieren.



Ganz ähnlich gelangen auch die Totalsynthesen, der in *t*-RNA vorkommenden Basen Pseudouridin und Wyosin. Bei Pseudouridin handelt es sich um ein C-Nukleosid. Diese Verbindungen sind aufgrund des Fehlens einer Acetal-Substruktur wesentlich resistenter gegenüber Hydrolysen. C-Nukleoside werden daher als Glycosylase-Inhibitoren eingesetzt. Glycosylasen sind Enzyme die glycosidische Bindungen spalten.

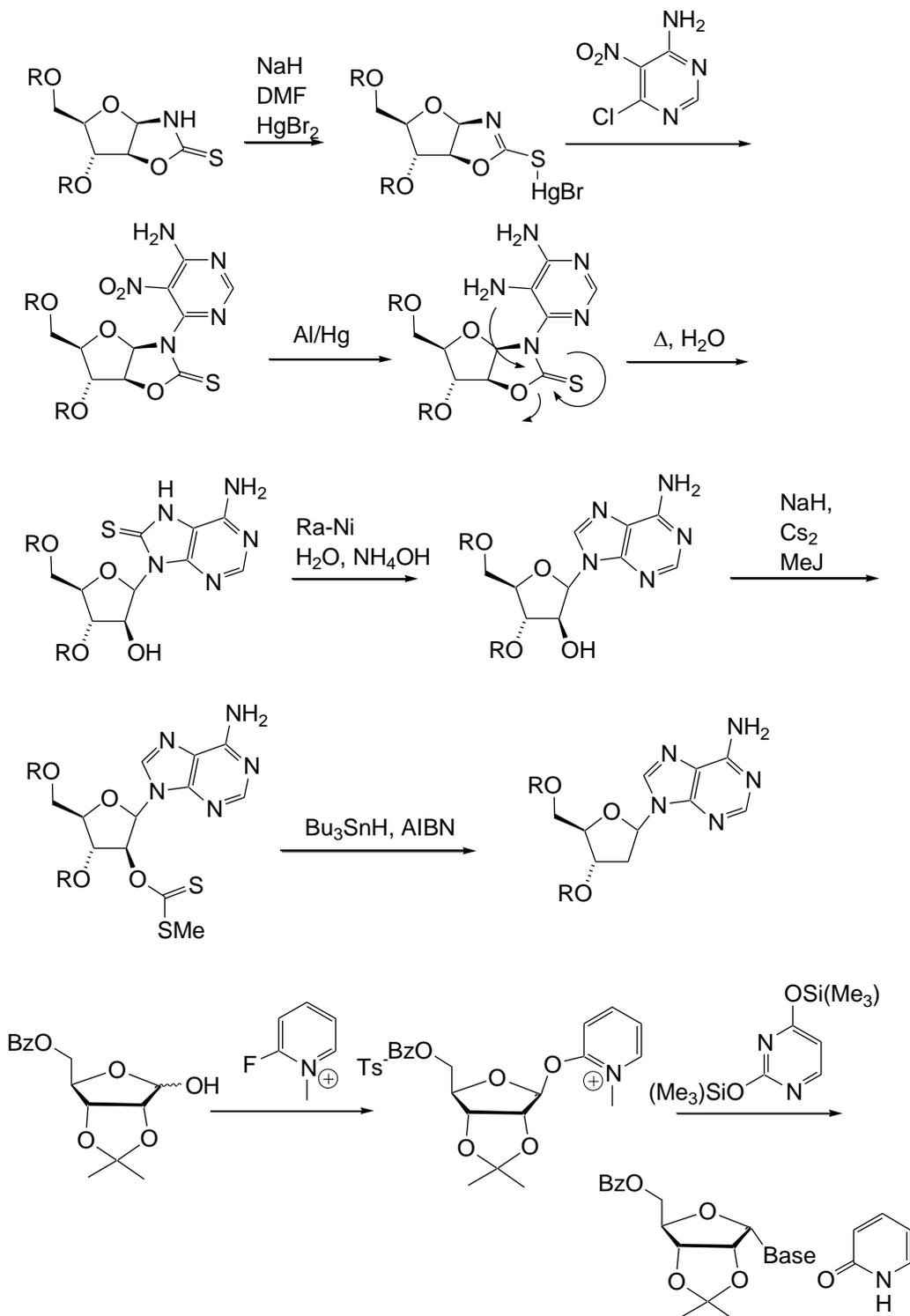


### 2.1.5 Stereoselektiver Zugang zu $\alpha$ - und $\beta$ -Nukleosiden

Für die stereoselektive Synthese wurden eigene Synthesen entwickelt. Die selektive Darstellung von  $\beta$ -Anomeren gelingt mit Hilfe der Oxazolidin-Methode. Gezeigt ist die Synthese von  $\beta$ -Arabinofuranosyl-Adenin. Zur Reduktion von OH-Gruppen, wie hier zur Darstellung der Desoxyribose aus dem Ribosevorläufer wird häufig die Barton-McCombi Reaktion angewendet.

Die stereoselektive Synthese von  $\alpha$ -anomeren Zuckern gelingt mit Hilfe des 2-Fluor-1-methylpyridiniumtosylats. Reaktion mit dem Zucker unter thermodynamischer Kontrolle fixiert das anomere Zentrum, so dass der große Pyridiniumrest die sterisch

günstigere  $\beta$ -Position einnimmt.  $S_N2$ -Substitution durch die silylierte Base erfolgt hauptsächlich unter inversion der Konfiguration zum  $\alpha$ -Anomeren.



## 2.2 Synthese der Nukleotide

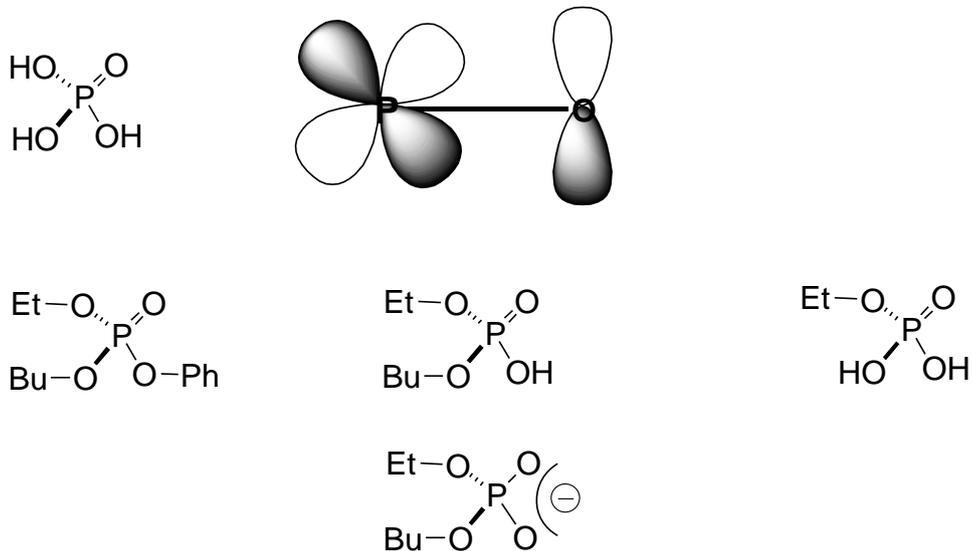
### 2.2.1 Die Chemie der Phosphor- und Phosphorigsäureester

Der in der Biologie relevante Phosphor (P) hat die Oxidationsstufe P(V) und ist vierfach koordiniert. Zur Synthese biologisch relevanter Strukturen ist deshalb die Kenntnis der Chemie dieser Phosphorverbindungen notwendig.

Die P-O Einfachbindungen sind  $sp^3$  Hybridorbitale und ca. 1.6 Å lang.

In den Triestern und in anderen Verbindungen sind die P=O Bindungen 1.46 Å lang.

Es handelt sich um  $p\pi d\pi$  Hybridorbitale. Der Phosphor weitet also seine Schale unter Beteiligung von d-Orbitalen auf.

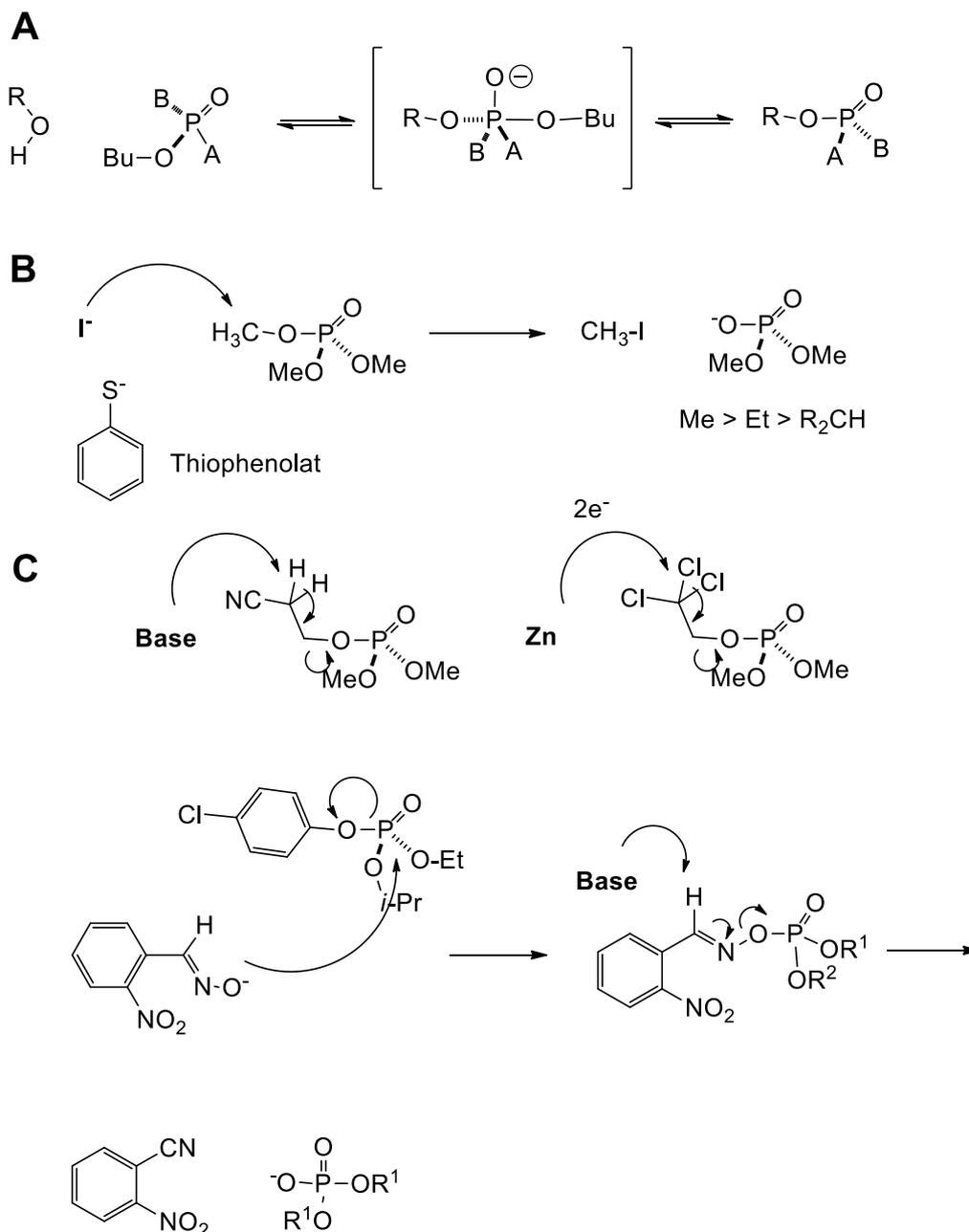


Die Triester wie  $\text{PO}(\text{OEt})(\text{OBu})(\text{OPh})$  sind löslich in vielen organischen Lösungsmitteln und leicht an Kieselgel chromatographierbar. Der P bildet ein stabiles chirales Zentrum.

Die Diester wie  $\text{PO}(\text{OEt})(\text{OBu})(\text{OH})$  sind wasserlösliche Verbindungen und mit einem  $pK_a$ -Wert von 1.5 wesentlich stärker sauer als Essigsäure ( $pK_a = 4.75$ ). Sie liegen in Wasser deprotoniert vor. Die Ladung ist zwischen den zwei O-Atomen am P delokalisiert (deshalb der niedrige  $pK_a$ -Wert).

Die Monoester wie  $\text{PO}(\text{OEt})(\text{OH})_2$  sind ebenfalls wasserlöslich. Die  $\text{pK}_a$ -Werte betragen 1.6 und 6.6. Unter physiologischen Bedingungen liegen die Monoester als Gemisch der Mono- und Dianionen vor.

Die negativ geladenen Mono- und Diester der Phosphorsäure sind sehr hydrolysebeständig. Ein angreifendes Nukleophil hat kaum eine Chance das durch die negativen Ladungen abgeschirmte P-Atom anzugreifen. Diese hohe Hydrolysestabilität ist die Grundlage des Lebens auf der Erde. Sie garantiert, dass Oligonukleotide stabile Verbindungen sind, die Informationen kodieren können.



Die Triester der Phosphorsäure werden auf drei Reaktionswegen (A, B und C) angegriffen. Sie besitzen nicht die schützende negative Ladung sondern werden hydrolysiert.

Reaktionsweg A beschreibt eine Substitution nach dem  $S_N2P$ -Mechanismus. Es ist ein assoziativer Prozess bei dem das Nukleophil zuerst an das P-Atom addiert. Erst anschließend zerfällt das Zwischenprodukt. In diesem Prozess ist die Pseudorotation oft langsamer als der Zerfall des Zwischenproduktes, so dass chirale Information teilweise erhalten bleibt. Dieser Hydrolysemechanismus ist besonders schnell, wenn es sich um Arylester handelt (s.o.) Der niedrigere  $pK_a$ -Wert der Phenolate ( $pK_a$ -Wert ca. 10) im Vergleich zu nichtaromatischen Alkoholen ( $pK_a$ -Wert ca. 15) zeigt bereits, dass Phenolate wesentlich bessere Abgangsgruppen sind, die die negative Ladung besser, durch Delokalisation in den Ring, stabilisieren können. Zur Abspaltung von Arylestern als Schutzgruppen verwendet man meist Oximat-Anionen als Nukleophile, die dann in einer  $\beta$ -Eliminierung (s.u.) in einem zweiten Schritt abgespalten werden. Als Arylester-Schutzgruppe werden meist p-Chlorphenolester verwendet (warum?).

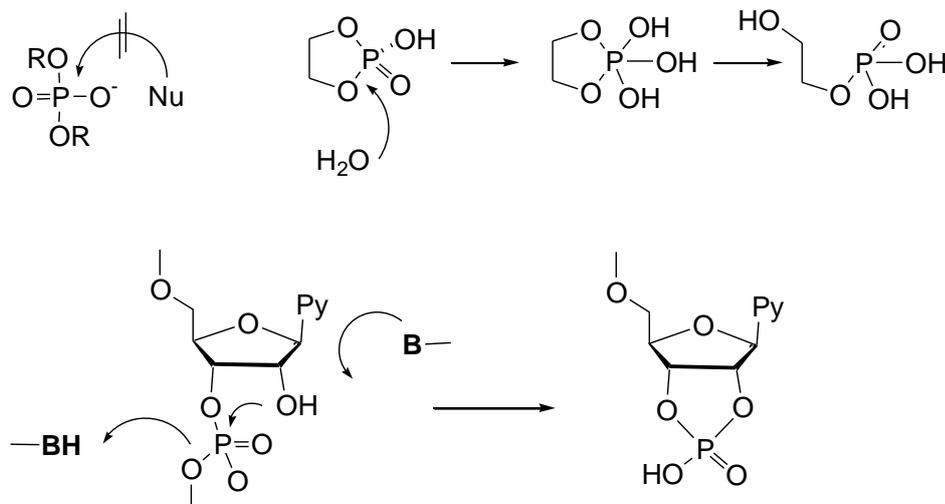
Reaktionsweg B beschreibt den Angriff sehr weicher Nukleophile. Sie greifen nicht am P-Atom sondern an den Alkylgruppen eines Esterrestes an. Das sind typische  $S_N2$ -Reaktionen in denen der Phosphorsäuremonoester als gute Abgangsgruppe fungiert. Diese Reaktion wird zum Entschützen von Phosphorsäuretriestern verwendet. Sie funktioniert phantastisch bei Methylestern, ist bei Ethyl- oder sekundären Zentren allerdings schon relativ schlecht.  $Me > Et > R_2CH$ .

Ausgenutzt wird diese Reaktivität bei der Entschützung von Phosphorsäuremethylestern mit Thiophenolat.

Reaktionsweg C beschreibt eine  $\beta$ -Eliminierung von Alkylphosphat-Triestern. Diese Reaktion ist dann besonders gut wenn am  $\beta$ -C-Atom noch eine elektronenziehende Gruppe vorhanden ist, die die H-Atome acidifiziert. Hier hat sich die Cyanoethyl-Gruppe sehr bewährt. Sie wird heute als Schutzgruppe in der Oligonukleotidchemie angewendet. Ein weiteres Beispiel ist die Trichlorethylester-Schutzgruppe, die Reduktiv mit Zn entfernt werden kann. Durch  $\beta$ -Eliminierung werden auch die Oximat-Ester abgespalten.

Die Phosphorsäuredi- und -monoester sind wie schon gesagt sehr hydrolysebeständig. Das ist im Fall der DNA sehr wichtig. RNA muss jedoch, nachdem die Information in ein Protein translatiert wurde abgebaut werden, sonst würde die Zelle nach der Produktion eines m-RNA Stranges ewig das kodierte

Protein erzeugen. Zum Abbau der DNA durch Enzyme (Ribonukleasen) nutzt man aus, dass Aktivierungsenergien durch Proximitätseffekte und Ringspannung (Aktivierungsentropie) stark reduziert werden können. Fünfring enthaltende, cyclische Phosphorsäurediester werden aufgrund der Spannung im 5-Ring  $10^7$  mal schneller hydrolysiert als die nicht zyklischen Diester. Das entspricht einer Verringerung der freien Aktivierungsenthalpie  $\Delta G^\ddagger$  um 36 kJ/mol. Genau dieses Prinzip nutzen die Ribonukleasen, die RNA nach dem unten gezeigten Mechanismus hydrolysieren.

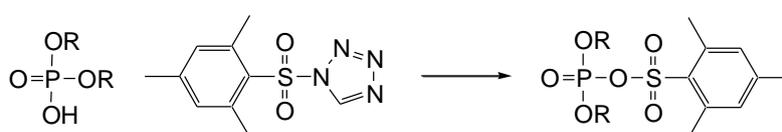
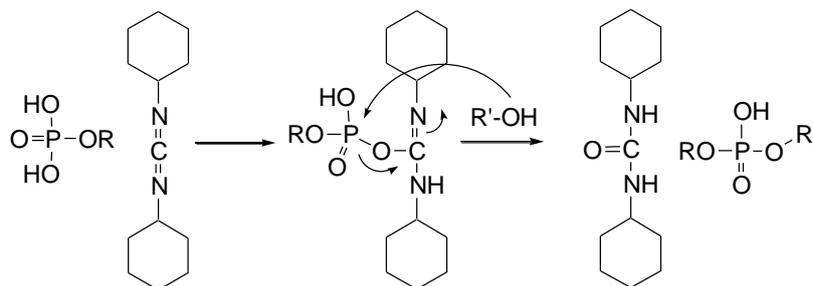


Die intrinsische Stabilität der Mono- und Diester wird durch die 5-Ring Zwischenstruktur überwunden. Hydrolyse kann so erfolgen.

### 2.2.2 Kondensierte Phosphate und Synthese von Phosphorsäureestern

Die Synthese von Phosphorsäureester kann mit Hilfe von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) analog einer Carbonsäureester Synthese erfolgen. Hierzu wird die Phosphorsäure durch Umsetzung mit DCC aktiviert. Dann erfolgt der Angriff des Alkohols. DCC erlaubt hauptsächlich Synthese von Diestern aus Monoestern. Triester werden nicht gebildet. Hierzu reicht die Aktivität des DCC nicht aus. Zur Triestersynthese verwendet man meistens Mesitylsulfonylchlorid oder die entsprechenden Tetrazolide und Nitrotriazolide. Die Azolid-Anionen haben den Vorteil, dass sie sehr wenig nukleophil sind. Schon das Cl<sup>-</sup> bereitet manchmal Probleme und führt zur Phosphorsäureester Spaltung. Das Mesitylen wird auf Grund

der erzeugten sterischen Abschirmung des S-Zentrum verwendet. So wird der nukleophile Angriff des Alkoholats auf das P-Atom gefördert.



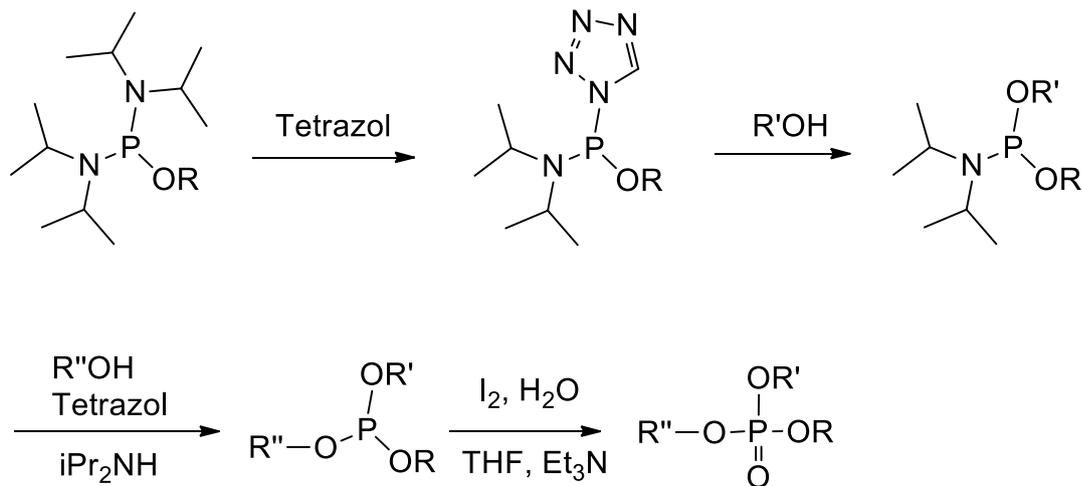
Viele heute verwendete Synthesen laufen über den P in der Oxidationsstufe P(III), also über die Phosphit-Trister. Hier nutzt man die größere Reaktivität der P(III)-Spezies aus (Vgl.  $\text{PCl}_3$  versus  $\text{POCl}_3$ ). Bahnbrechend war die Entwicklung der Phosphoramidit-Chemie durch Caruthers und Matteucci (Abbildung **A** unten).

Hier werden die Diamide der Phosphorigsäure mit Tetrazol umgesetzt. Dabei reicht die Acidität des Tetrazol aus um das N-Atom im Phosphorigsäureamid zu protonieren. Erst nach der Protonierung werden die N-Substituenten zu sehr guten Abgangsgruppen. Man kann also die stabilen Amide einsetzen und so das Arbeiten mit den Hydrolyseanfälligen Halogenverbindungen vermeiden. Intermediär entstehen die Tetrazolide der P(III)-Spezies, als Reaktivester. Diese reagieren mit Nucleophilen wie z.B. Alkoholen z. B. zu den Triestern. Unter bestimmten Umständen (Stöchiometrie) kann auf der Stufe der Diester die Reaktion gestoppt werden. Die Phosphit-triester sind in der Regel auch instabil und werden nach erfolgter Bildung mit Iod oder *tert*-Butylhydroperoxid zu den Phosphat-triestern aufoxidiert.

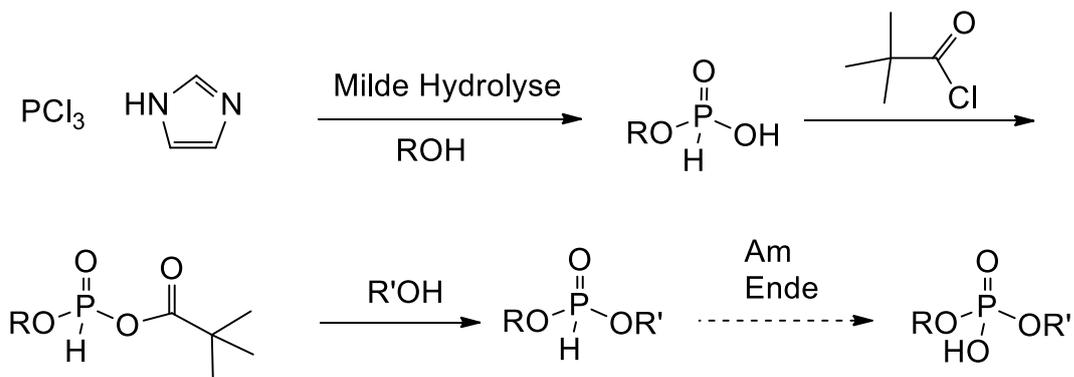
Basierend auf alten Arbeiten der Todd-Gruppe hat sich in den letzten Jahren auch die H-Phosphonat Chemie (Abbildung **B** oben) stark entwickelt. Durch Umsetzung von  $\text{PCl}_3$  mit Imidazol und nachfolgender milder Hydrolyse entstehen H-Phosphonate

als Tautomere der Phosphit-Monoester. Diese H-Phosphonate sind im Gegensatz zu den Phosphit-Monoester relativ stabil. Sie lassen sich durch Umsetzung mit einem sperrigen Säurechlorid wie Pivaloylsäurechlorid oder Adamantylsäurechlorid in gemischte Anhydride als aktivierte H-Phosphonate überführen. Diese reagieren dann mit Alkoholen zu den H-Phosphonat Diestern. Erst ganz am Ende werden auch die H-Phosphonate durch Umsetzung mit Iod oder *tert*-Butylhydroperoxid zu den Phosphorsäurediestern aufoxidiert.

**A**



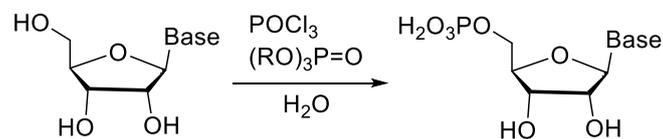
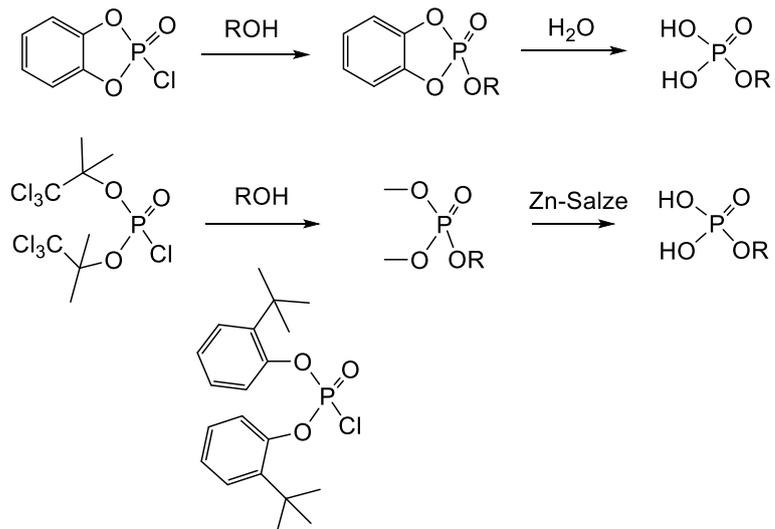
**B**



### 2.2.3 Synthese biologisch wichtiger Phosphat-Monoester

Zur Synthese der Phosphat-Monoester bedient man sich zweier Methoden. Sie sind aus den Triestern durch Hydrolyse erhältlich. Zur Synthese der Monoester wurde das Catechol-Phosphorsäurechlorid entwickelt. Es reagiert mit Alkoholen zum Triester, der dann selektiv zum Monoester aufgrund der hohen Reaktivität des Catechol-System (phenolisch und cyclisch) hydrolysiert werden kann. Darüber hinaus wurden

Reagenzien entwickelt, die auf Grund ihres großen Raumbedarfs nur mit primären Alkoholen zu den Phosphorsäuremonoestern reagieren können. Das ist wichtig, da in der Natur zumeist die primäre 5'-Position der Ribose phosphoryliert vorliegt. Die gebräuchlichsten Reagenzien sind das *Bis(2-tert-butylphenyl)phosphorchloridat* (Hydrolyse mit H<sub>2</sub>O) oder das *Bis(2,2,2-trichlor-1,1-dimethylethyl)phosphorchloridat* (Hydrolyse mit Zn-Salzen).

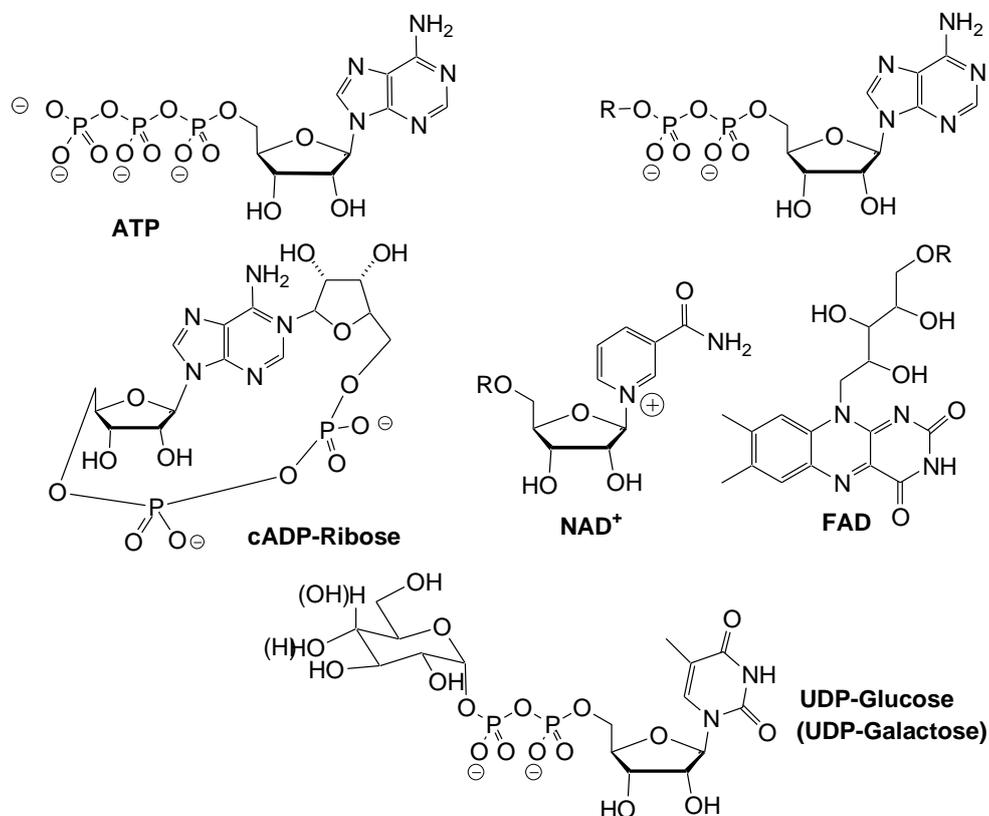


oder AcCN, Pyridin, H<sub>2</sub>O 80% Ausbeute, >90% Selektivität

Besonders gut funktionieren auch Methoden, die von Yoshikawa und Sowa-Ouchi entwickelt wurden. Hierbei wird Phosphorylchlorid in einem Phosphorsäuretriester Lösungsmittel mit dem Alkohol zur Reaktion gebracht (Yoshikawa). Nachfolgende Hydrolyse gibt die Monoester. Wichtig hier sind die Reaktionsbedingungen. Umsetzung von Phosphorylchlorid mit dem Alkohol in Acetonitril/Pyridin/H<sub>2</sub>O (Sowa-Ouchi) führt ebenfalls in 80%-iger Ausbeute und >90%-iger Selektivität zur Synthese der Monoester.

## 2.2.4 Synthese kondensierter Phosphate, Pyrophosphate

Einige Beispiele zeigen wie verbreitet und in der Natur wichtig kondensierte Phosphate sind. Das ATP ist der wichtigste Energiespeicher in unsere Zellen. Verbindungen wie das NAD<sup>+</sup> oder das FAD sind wichtige Coenzyme, die entscheidend an der Zellatmung teilnehmen. Die Biosynthese der komplexen Zucker auf den Oberflächen unserer Zellen geschieht im Wesentlichen mit Hilfe der UDP-Zucker Vorläufer z.B. UDP-Glucose oder UDP-Galaktose. cADP-Ribose ist an der Regulierung des Calciumhaushaltes wesentlich als *second messenger* beteiligt.



Die Synthese derartiger Verbindungen im Laboratorium erfolgt über die Aktivierung der Monoester. So können Monoester mit DCC aktiviert werden. Umsetzung mit Morpholin oder Diisopropylamin führt zur Bildung der Amidate, die mit Diphosphaten zu den Triphosphaten umgesetzt werden können. Direkte Reaktion der Monophosphate mit dem Diphenylphosphorchloridat führt nach Hydrolyse zur Bildung der Diphosphate. Das intermediär entstehende Diphenyloxy-geschützte Diphosphat kann mit Phosphat in einer S<sub>N</sub>2-Reaktion zum Triphosphat umgesetzt werden.

Wichtig bei der Synthese ist, dass sichergestellt wird, dass jedes Phosphatzentrum am Besten schon in der Synthese eine negative Ladung trägt, weil sonst rasche Hydrolyse erfolgt. Alle Synthese von kondensierten Phosphaten vermeiden die Bildung von Triphosphat Zwischenstufen.

Poulter hat z.B. auch die 5'-OH Tosylate direkt mit Diphosphat oder sogar Triphosphat umgesetzt, was eine direkte Synthese ermöglichte.

