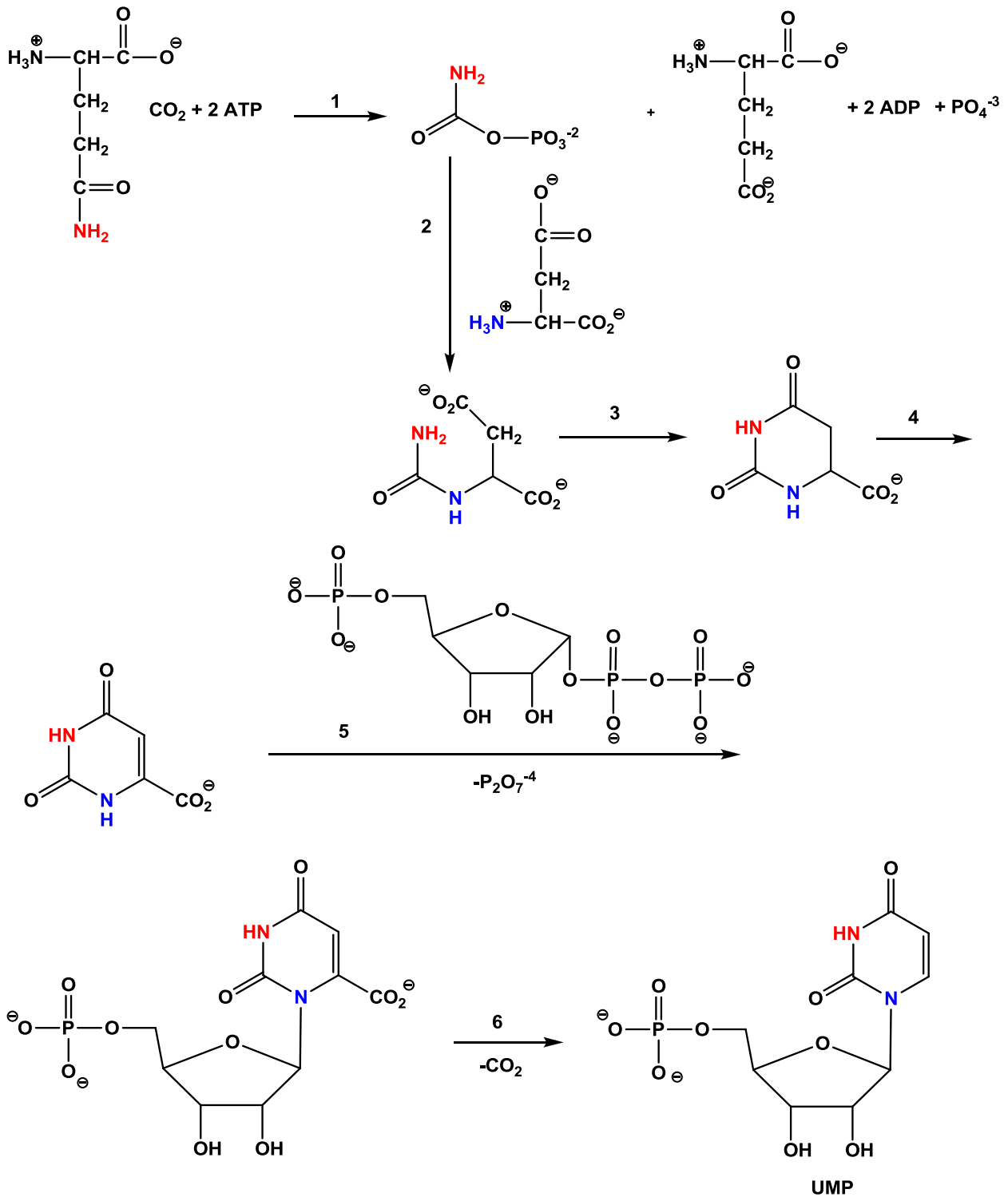


Biochemiczne i chemiczne metody syntezy nukleozydów

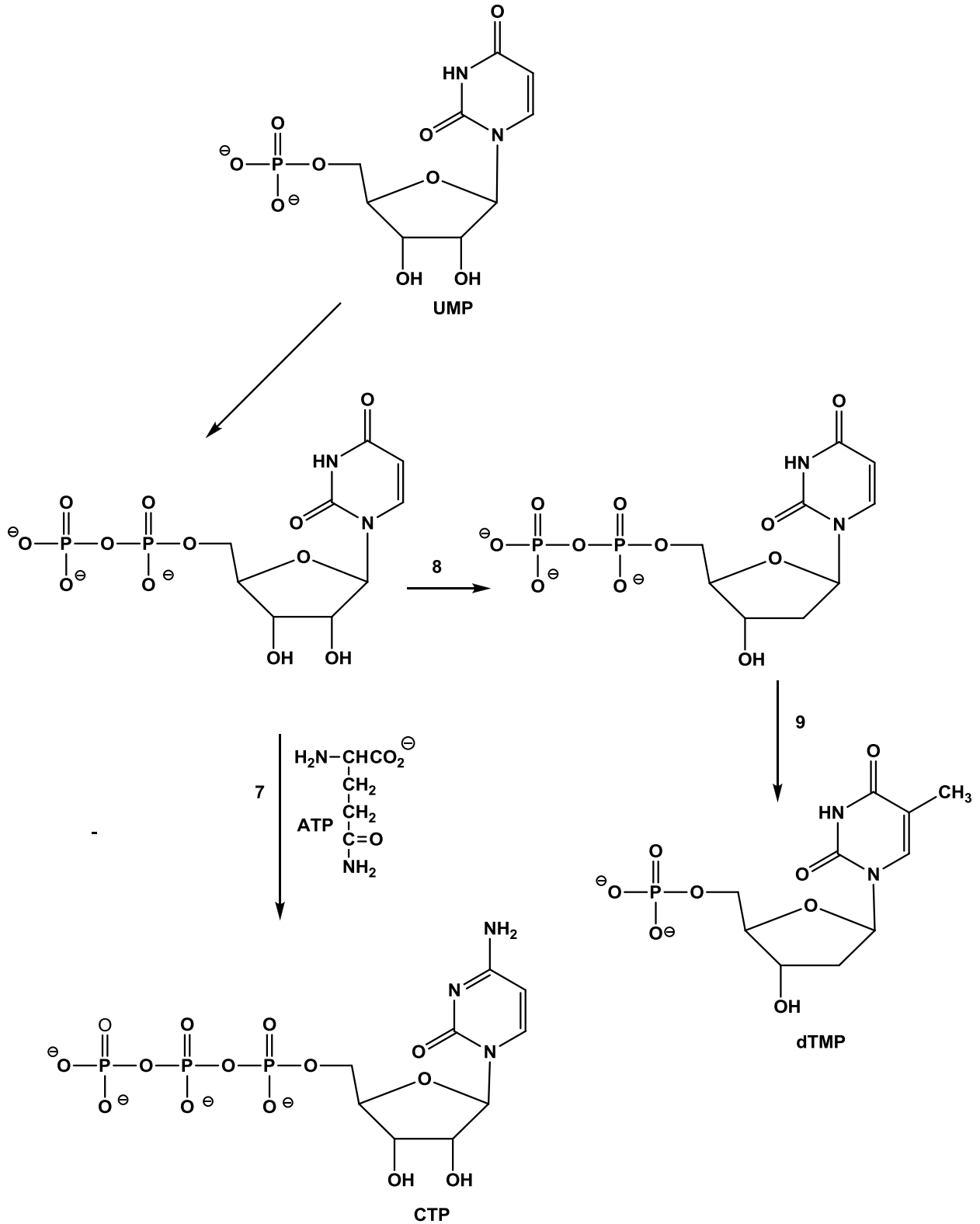
Biosynteza nukleozydów pirymidynowych i purynowych przebiega w komórkach w sposób ciągły. Jest to spowodowane koniecznością ciągłego dostarczania nukleozydów do syntezy kwasów nukleinowych. Zapotrzebowanie to wiąże się z procesem podziałów komórkowych, kopiowaniem DNA oraz syntezą kwasów RNA koniecznych w procesach transkrypcji, translacji i syntezy białek. Należy zaznaczyć, że proces syntezy zachodzi w sposób *de novo* tzn. poszczególne fragmenty, cukrowy i heterocykliczny syntezowane są z produktów metabolizmu komórkowego. Synteza nukleozydów pirymidynowych znacząco różni się od syntezy puryn.

Biosynteza pirymidyn obejmuje kilka kluczowych etapów (Schemat 1).

- 1 – W reakcji katalizowanej syntetazą karbamoilową następuje przeniesienie grupy aminowej z kwasu glutaminowego do cząsteczki dwutlenku węgla, w obecności ATP powstaje karbamoilofosforan .
- 2 – Pod wpływem karbamoilotransferazy asparaginianowej następuje podstawienie grupy fosforanowej w karbamoilofosforanie grupą aminową kwasu asparaginowego.
- 3 – Kondensacja katalizowana dihydroorotazą prowadzi do utworzenia cząsteczki kwasu dihydroorotowego
- 4 – Utlenienie kwasu dihydroorotowego wobec dehydrogenazy dihydroorotowej daje kwas orotowy
- 5 – Tworzy się wiązanie β -glikozydowe w reakcji kwasu orotowego z 5-fosfo- α -D-rybozylo-1-pirofosforanem katalizowanym fosforybozylotransferazą orotanową
- 6 – Dekarboksylacja daje monofosforan urydyny (UMP), który dalej jest fosforylowany do di- i trifosforanu.
7. Kwas glutaminowy jest donorem kolejnej grupy aminowej. W reakcji katalizowanej przez syntetazę CTP (trifosforanu cytydyny)
- 8 – Reduktaza rybonukleotydomowa transformuje difosforan urydyny do difosforanu 2-deoksyurydyny (dUMP)
- 9 – Metylowanie monofosforanu 2-deoksyurydyny kwasem N^5,N^{10} -metylenotetrahydro- foliowym wobec syntetazy tymidylanowej daje monofosforan 2-deoksytymidyny.

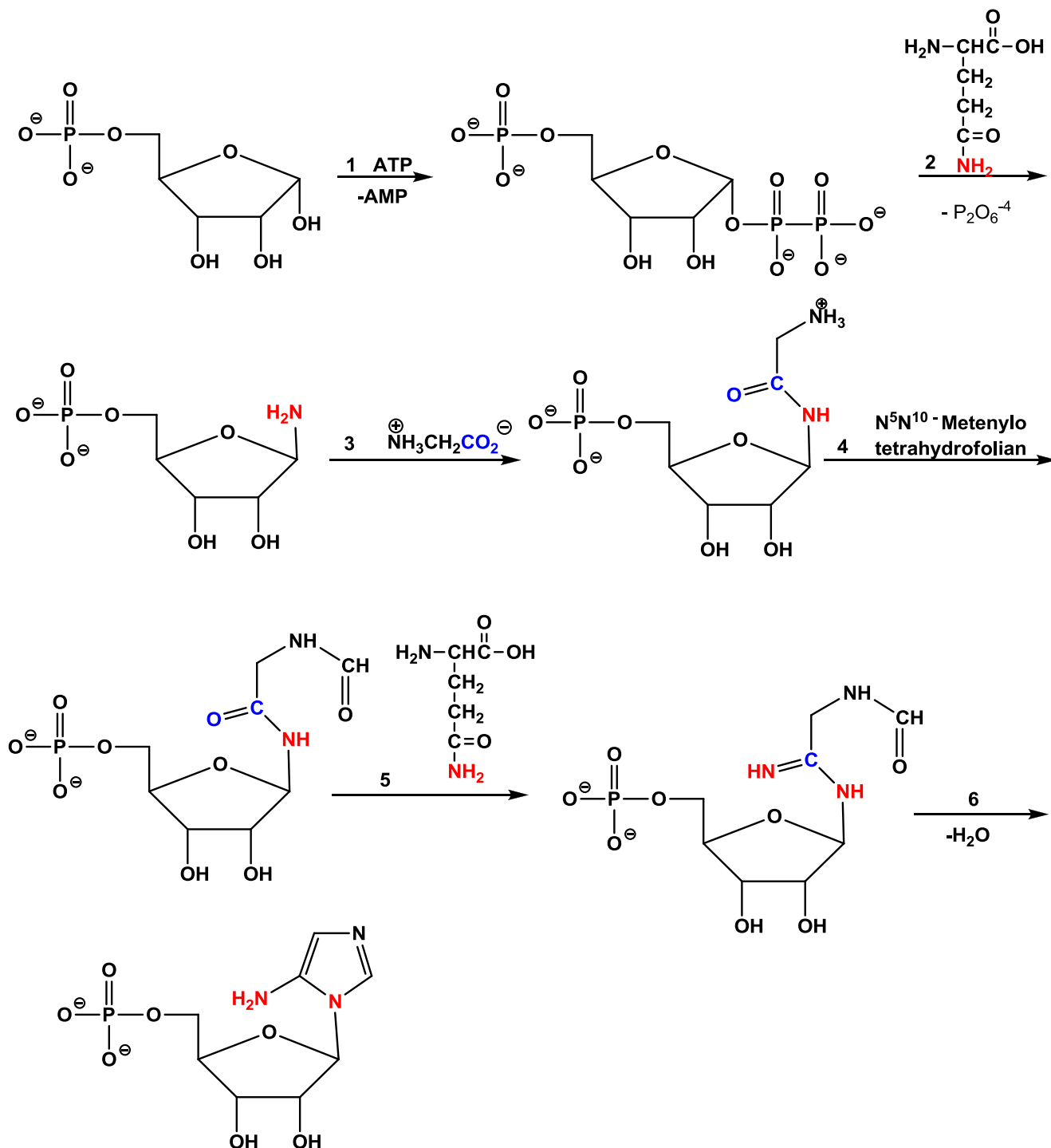


Schemat 1. Synteza monofosforanu urydyny.

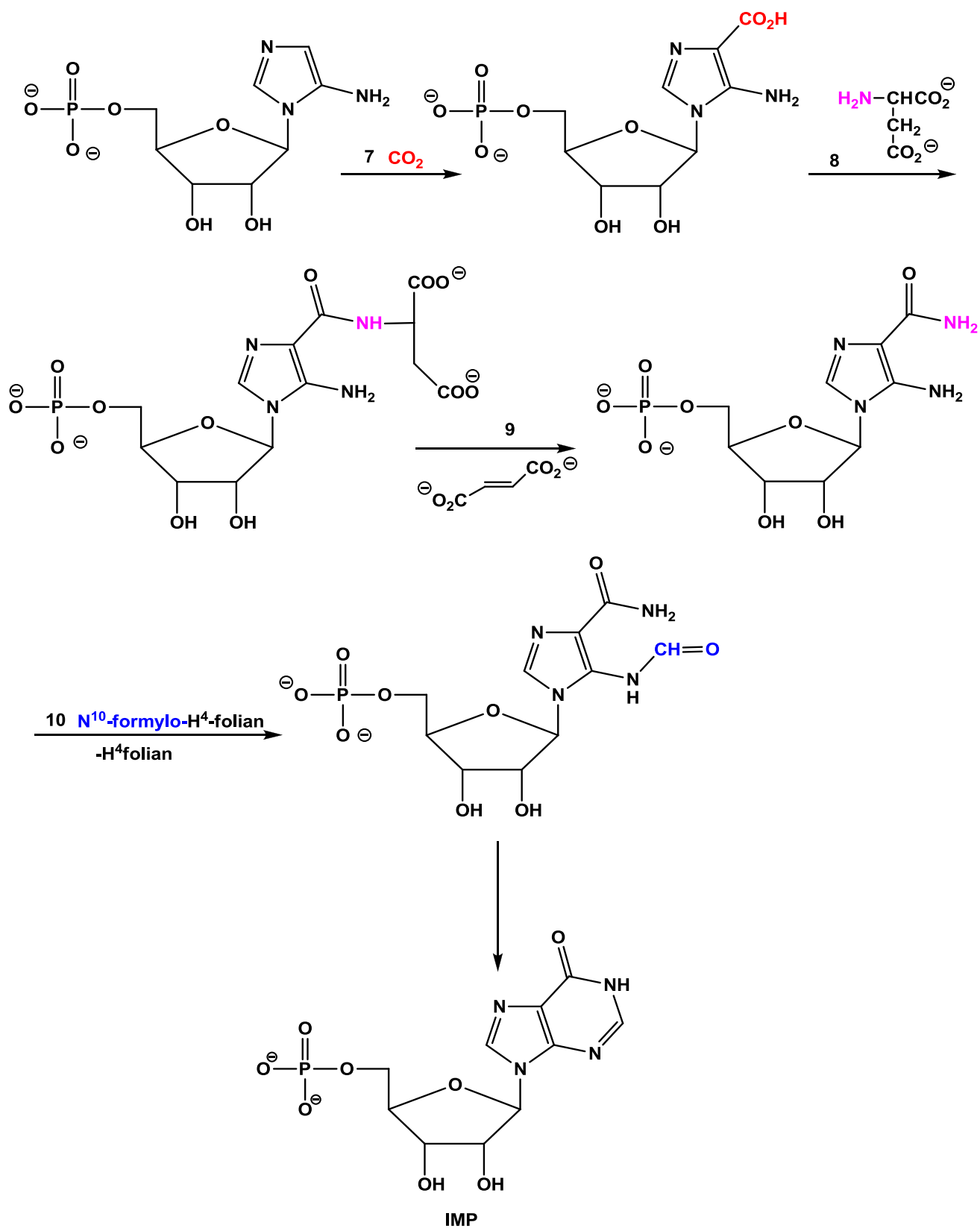


Schemat 2. Przemiana urydyny w cytydynę i 2-deoksytymidynę.

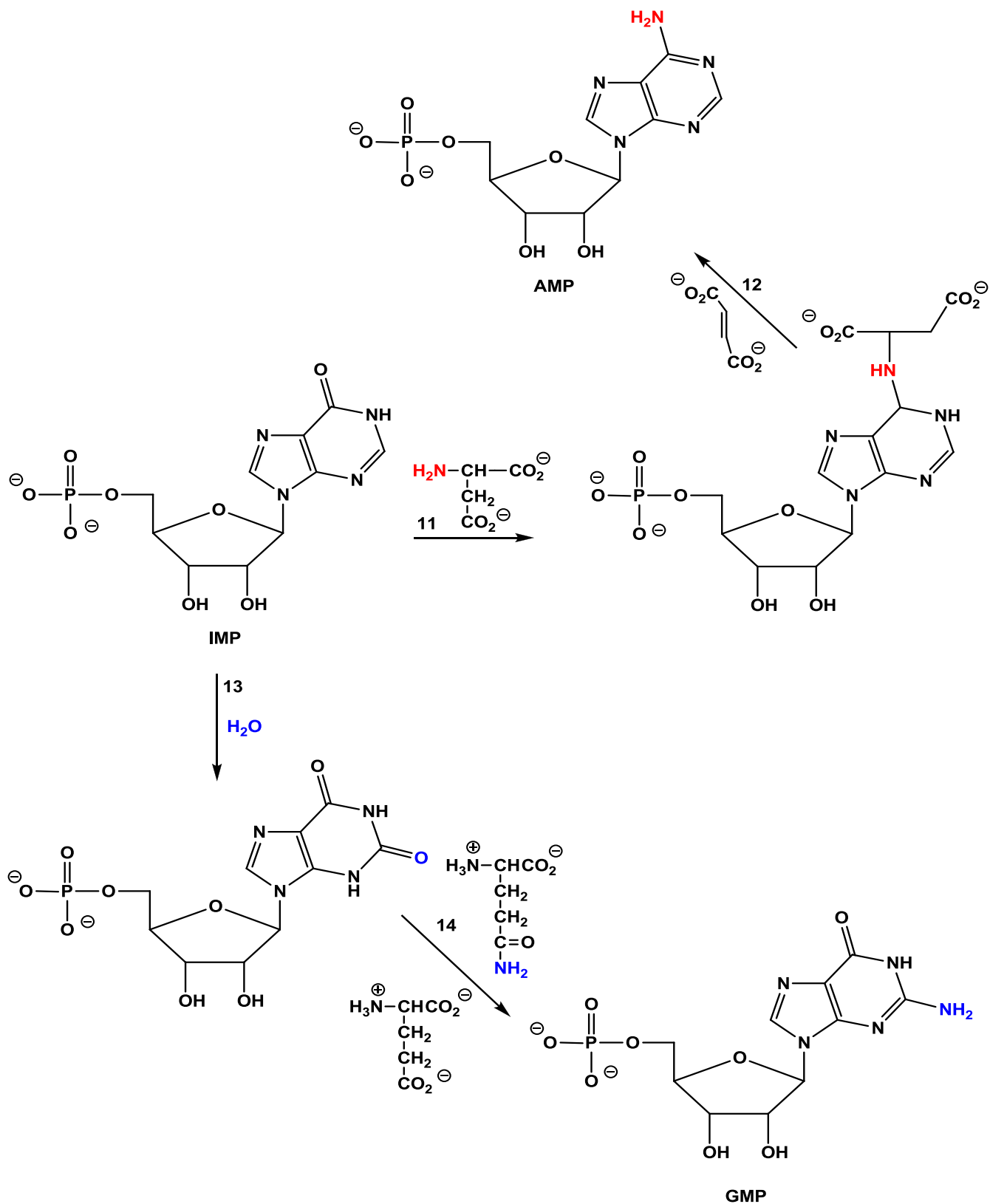
W przeciwieństwie do monofosforanu urydyny, synteza nukleozydów purynowych przebiega poprzez utworzenie pierścienia imidazolowego na grupie aminowej glikozyloaminy, a następnie poprzez dobudowanie pierścienia pirymidynowego. Kluczowym produktem jest monofosforan inozyny, który ulega dalszym przemianom do adenozyiny i guanozyiny (Schematy 3 do 5).



Schemat 3. Biosynteza 5'-fosforanu 5-amino-1-(β-D-rybofuranozylo)imidazolu



Schemat 4. Synteza monofosforanu inozyny (IMP)

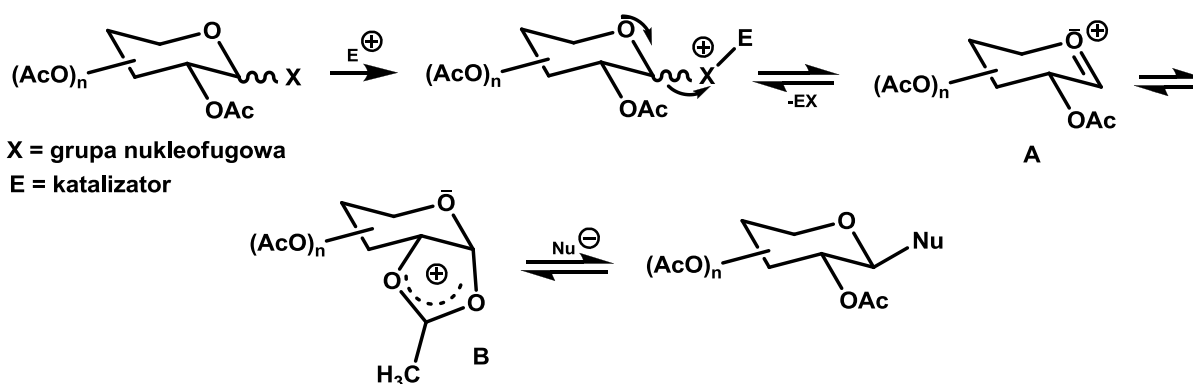


Schemat 5. Przemiana IMP w monofosforan adenyliny i guanyliny

- 1 - Syntetaza PRPP przenosi z ATP cząsteczkę pirofosforanu na 5-fosforan α -D-rybofuranozy, powstaje -5-fosforybozylo-1-pirofosforan (PRPP).
- 2 – Podstawienie nukleofilowe pirofosforanu grupa aminową pochodzącą z kwasu glutaminowego katalizowane amidotransferazą glutamylową daje 5-monofosforan D-rybofuranozyloaminy.
- 3 – W kolejnym etapie wytwarza się wiązanie amidowe pomiędzy grupa aminową i karboksylową glicyny.
- 4 – Utworzona pochodna ulega formylowaniu N4, N10-mentenylotetrahydrofolianem w reakcji katalizowanej formylotransferazą.
- 5 – W kolejnym etapie grupa karbonylowa ugrupowania amidowego zostaje zamieniona grupą iminową. W efekcie powstaje pochodna amidynowa. Donorem grupy aminowej jest ponownie kwas glutaminowy.
- 6 – W reakcji kondensacji terminalnej grupy formylowej i aminowej zostaje zamknięty pierścień 5-aminoimidazolu.
- 7 – W kolejnym etapie zostaje przyłączona cząsteczka ditlenku węgla.
- 8 – Utworzenie grupy amidowej katalizuje amidotransferaza asparaginianowa.
- 9 – Z powstałego amidu odszczepia się fumaran, powstały fragment 5-amino-4-karbamoiloimidazolu, w następnym etapie jest formylowany na grupie aminowej. Przeniesienie grupy formylowej katalizuje formylotransferaza folianowa.
- 10 – W ostatnim etapie następuje wewnątrzcząsteczkowa kondensacja, której produktem jest pierścień inozyny. Finalnym produktem tych przemian jest 5'-monofosforan inozyny, kluczowy związek w syntezie adenozyiny i guanozyiny.
- 11 - Utworzony pierścień inozyny, ulega dalszym przemianom do adenozyiny i guanozyiny. Pod wpływem syntetazy adenylobursztynianowej następuje wymiana grupy karbonylowej inozyny na aminową poprzez utworzenie przejściowego adenylobursztynianu. Odszczepienie kwasu fumarowego w obecności liazy adenylobursztynianowej daje adenozyinę.
- 12 - Utlenienie inozyny NAD⁺ dinukleotydem nikotynamidoadeninowym w obecności dehydrogenazy IMP daje ksantozynę.
- 13 –Ksantozyna ulega przemianie w guanozyinę w reakcji z kwasem glutaminowym.

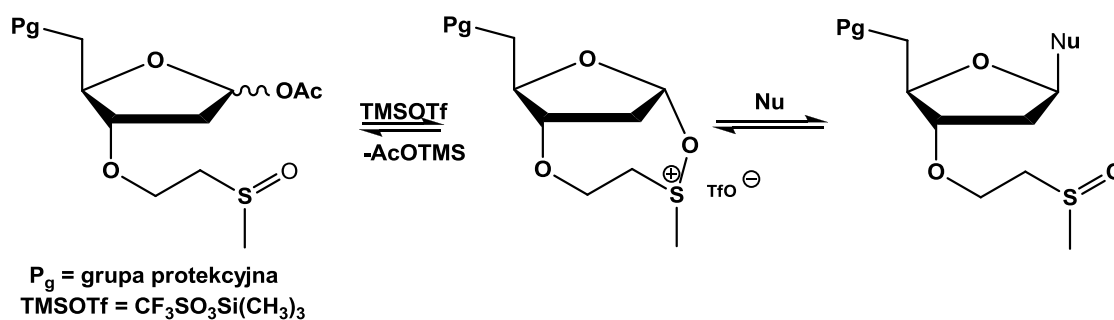
Chemiczne metody syntezy nukleozydów, zarówno pirymidynowych jak i purynowych polegają na połączeniu fragmentu cukrowego z heterocyklicznym wiązaniem N-glikozydowym. Aby tego dokonać należy zastosować pochodną cukrową posiadającą na węglu anomerycznym grupę łatwo odchodzącą (tzw. grupę nukleofugową), natomiast zasada heterocykliczna musi być w postaci umożliwiającej podstawienie grupy nukleofugowej. Pozostałe grupy hydroksylowe cukru powinny być odpowiednio zabezpieczone, grupy te usuwa się w ostatnim etapie syntezy nukleozydu. Rolę grupy nukleofugowej spełniają grupy lub aniony będące grupami łatwo odchodzącymi w reakcjach podstawienia nukleofilowego S_N1 i S_N2 . Są to słabe zasady takie jak jony halogenowe, najczęściej chloru i bromu, octanowe, tosyłanowe itd. Aby ułatwić reakcję podstawienia stosuje się katalizę kwasową, zarówno kwasami Brönsteda jak i Lewisa. Najczęściej stosowane metody polegają na użyciu kwasów Lewisa (np. sole srebra i cyny(IV), trifluorometanosulfonian trimetylosililu, (TMS-triflan, TMSOTf)), które powodują przemianę 1-halogeno-, 1-O-acylo-, 1-O-alkilo-furanozydów lub piranozydów w jon oksoniowy. Ogólny mechanizm syntezy nukleozydów przedstawia schemat 6.

Podstawowym problemem w syntezie nukleozydów jest zapewnienie wysokiej stereoselektywności reakcji glikozylacji. Osiąga się ją, poprzez odpowiednie dobranie reagentów i warunków reakcji (rozpuszczalnika, temperatury i ewentualnie katalizatora). W reakcjach N-glikozylacji nukleozasad istnieją różne drogi aktywowania centrum anomerycznego cukru, ułatwiające wprowadzenie zasady azotowej. W obecności grupy estrowej w pozycji 2 pierścienia cukrowego jon oksoniowy A jest stabilizowany przez utworzenie jonu acylooksoniowego B (Schemat 6). Utworzony jon acylooksoniowy determinuje kierunek ataku czynnika nukleofilowego, który może zachodzić tylko od strony bardziej odsłoniętej w odniesieniu do grupy partycypującej. Gdy grupa ta znajduje się po „stronie α ”, w cukrach szeregu D, poniżej płaszczyzny pierścienia, powstaje izomer β .



Schemat 6. Ogólna synteza nukleozydów.

Jeśli w stanie równowagi jest znaczne stężenie jonu oksoniowego, w wyniku ataku zasady azotowej powstaje zazwyczaj mieszanina anomerów o różnej proporcji $\alpha:\beta$. Funkcję stabilizującą kation oksoniowy mogą spełniać również inne grupy obecne w pozycji 2-pierścienia cukrowego, np. tiofenylowa czy selenofenylowa. Obecność tych grup wywiera podobny efekt jak grupa acylowa. Jeżeli substrat sacharydowy nie zawiera w pozycji 2-grupy partycypującej lub jest 2-dezoksysacharydem stereoselektywność reakcji *N*-glikozylacji praktycznie zanika. Grupa stabilizująca kation oksoniowy może być obecna w innej pozycji pierścienia cukrowego (Schemat 7.)



Schemat 7. Stereokontrolowana synteza nukleozydów

Znane są trzy podstawowe syntezy nukleozydów:

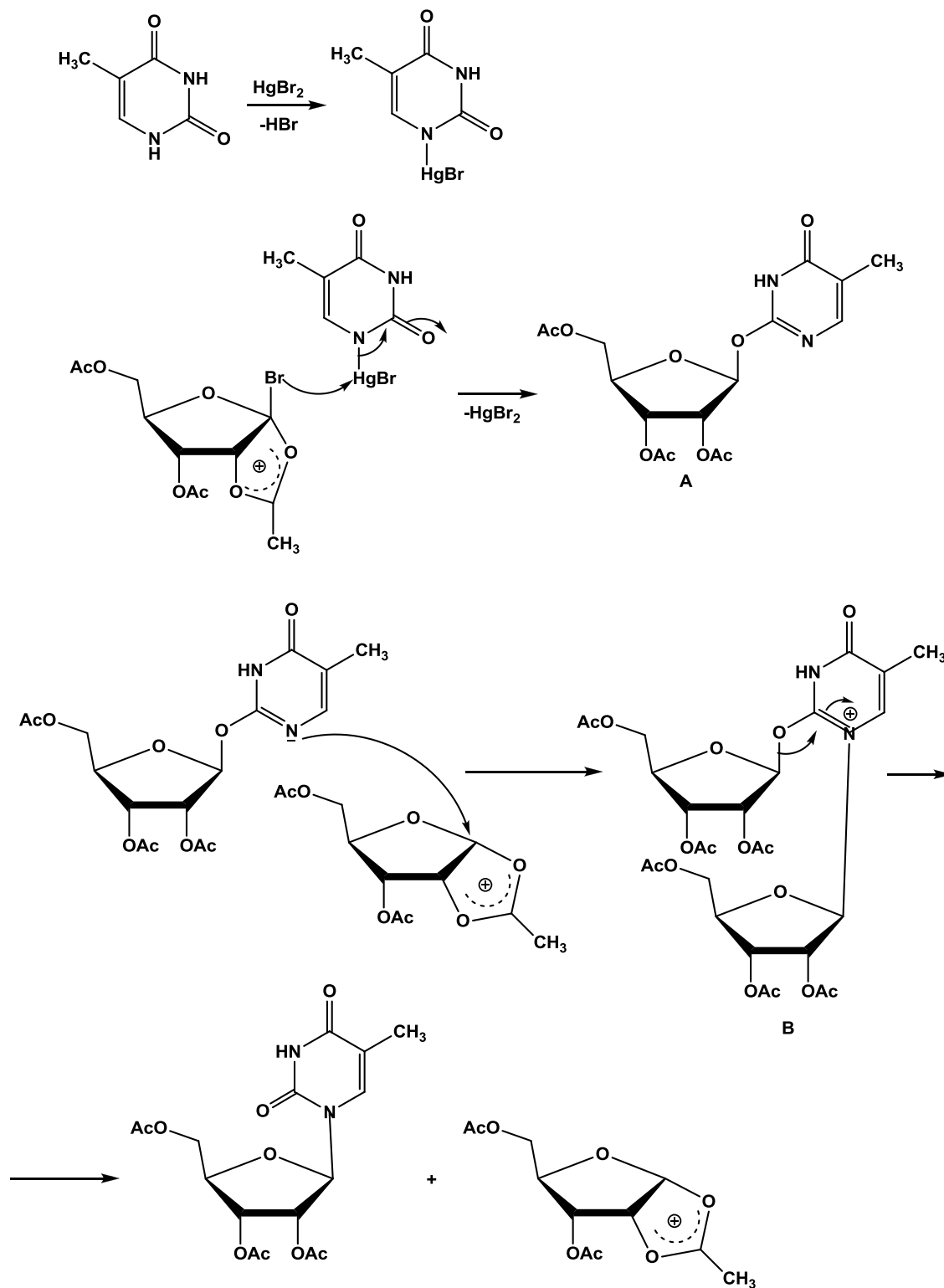
- glikozylacja katalizowana jonami metali ciężkich
- glikozylacja katalizowana kwasami Brönsteda (metoda stapiania)
- glikozylacja metodą sililową

Glikozylacja katalizowana solami metali ciężkich

Podstawą metody jest reakcja związków metali ciężkich (srebra, rtęci) i zasad heterocyklicznych z peracylowanymi halogenkami glikozyłowymi w bezwodnym rozpuszczalniku (toluen, nitrometan, ksylen). Po raz pierwszy metodę tę zastosowali Fischer i Helferich kondensując pochodną srebrną 2,8-dichloroadeniny z bromkiem 2,3,4,6-tetra-O-acetylo- β -D-glukopiranozyłu. Zastosowanie związków chlorortęciowych puryn w reakcji kondensacji z peracylowanymi halogenkami glikozyłu znacznie zwiększa wydajność nukleozydów. W przypadku pirymidyn w pierwszym etapie reakcji powstaje O-glikozyd A, który reaguje z następną cząsteczką halogenocukru w obecności $HgBr_2$ z utworzeniem nukleozydu B. Szybkość przemiany O-glikozydu w nukleozyd prawdopodobnie jest katalizowana solą rtęci, zależy od łatwości rozerwania wiązań C1'-O2



(Schemat 8.). Ze względu na stosowanie soli rtęci metoda ta ma dzisiaj w syntezie nukleozydów znaczenie historyczne.

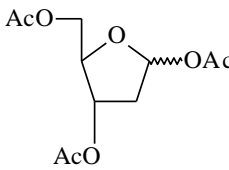
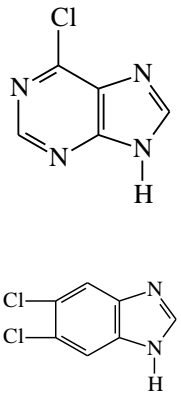
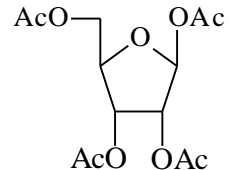
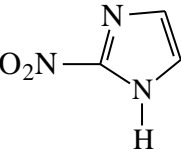
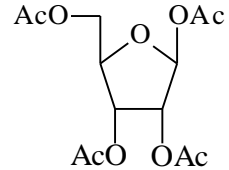
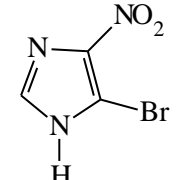
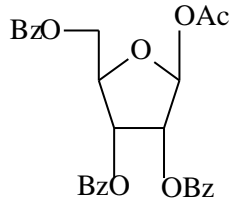
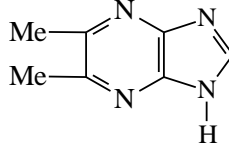


Schemat 8. Glikozylacja tyminy wobec bromku rtęci

Glikozylacja katalizowana kwasami Brönsteda

Metoda była stosowana w syntezie nukleozydów zarówno nukleozydów naturalnych jak i innych związków heterocyklicznych z peracylowanymi cukrami. Ze względu na sposób wykonania tej kondensacji, stapianie obu reagentów w obecności katalizatora, metoda ta jest często nazywana reakcją stapiania. Jako katalizatory

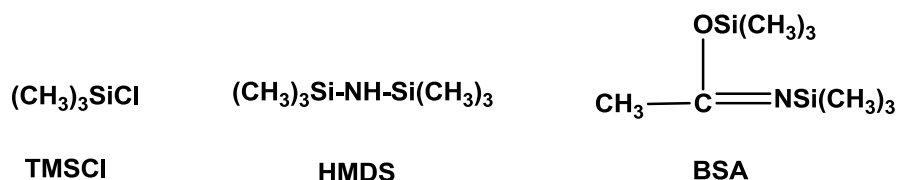
Tabela 1. Synteza nukleozydów metodą stapiania

Peracylowany monosacharyd	Azotowa zasada heterocykliczna	Katalizator	Wyd. % (α : β)
		CH_2ClCOOH	38 (3 : 1) 76 (1,5 : 1)
		CH_2ClCOOH	34 (0 : 1)
		CH_2ClCOOH	72 (0 : 1)
		$(p\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4)_2\text{HPO}_4$	85 (0 : 1)

stosowane są typowe kwasy: kwas siarkowy, benzoesowy, p-toluenosulfonowy i kwasy chlorooctowe. Wydajność reakcji waha się w dość szerokim zakresie. Zależy zarówno od budowy obu reagentów jak i zastosowanego katalizatora (Tabela 1.). Reakcja przebiega wg. ogólnego schematu glikozylacji (Schemat 6.). Jeśli czysty nukleozyd o konfiguracji β stopimy w obecności kwasu protonowego, to powstanie mieszanina obu anomerów.

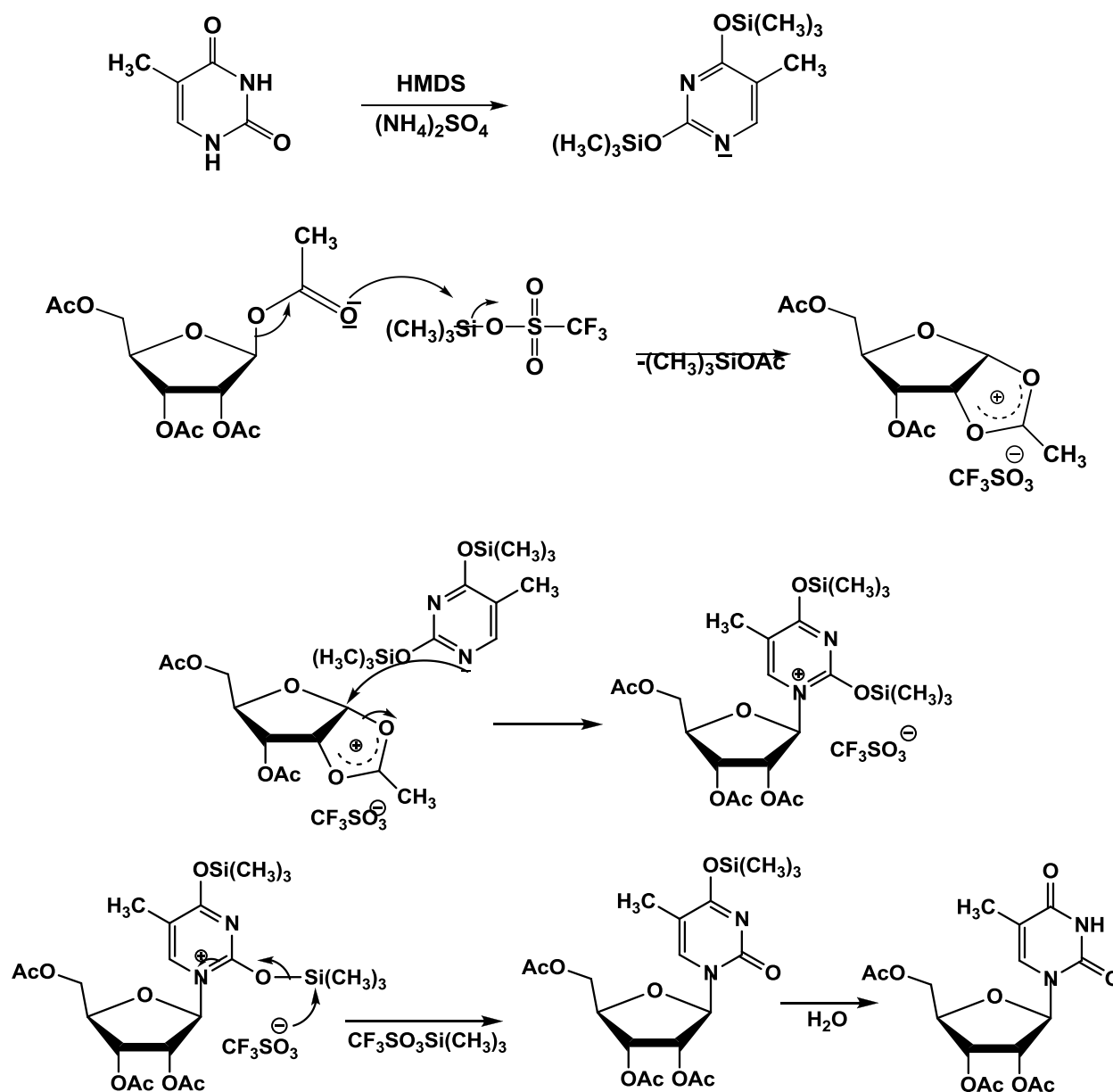
Glikozylacja metodą sililową

Jest to obecnie najczęściej stosowany sposób syntezy nukleozydów zwana często metodą Vorbrüggena, od nazwiska niemieckiego chemika, który jako pierwszy zastosował ją w latach 80. Heterozasadę przeprowadza się w pochodną pertrimetylosililową w reakcji z chlorkiem trimetylosililu, *N,O*-bis-trimetylosililoacetamidem (BSA) lub bardziej popularnym 1,1,1,3,3,3-heksametylodisilazanem (HMDS) (rys. 1.), a następnie poddaje kondensacji wobec katalizatorów typu kwasu Lewisa z peracylowanym sacharydem lub O-glikozydem (Schemat 9.). Procedurę tę można uprościć, prowadząc reakcję w jednym naczyniu jako tzw. „one pot reaction”. Jako katalizatory najczęściej stosuje się chlorek cyny(IV) lub trifluorometanosulfonian trimetylosililu (TMSOTf). Reakcja ma złożony przebieg. W pierwszym etapie następuje utworzenie, pod wpływem katalizatora, stabilizowanego rezonansem kationu 1,2-acyloksoniowego przy współudziale grupy partycypującej w pozycji 2 pierścienia cukrowego. W następnym etapie persililowana pochodna pirymidynowa lub purynowa atakuje kation acyloksoniowy od mniej zatłoczonej sterycznie strony „od góry” w D-furanozydach, co w konsekwencji prowadzi do utworzenia nukleozydu o konfiguracji β . W przypadku kondensacji pochodnych nie zawierających grupy partycypującej (np. zabezpieczenia eterowe) lub 2-deoksycukrów otrzymuje się mieszaninę anomerów w teoretycznej proporcji 1:1. Reakcje zakańcza hydroliza pod wpływem wody. Tak jak w pozostałych metodach otrzymany nukleozyd zabezpieczony należy odzabezpieczyć stosując specyficzne reakcje rozszczepienia grup zabezpieczających. Grupy estrowe zabezpieczające pozostałe grupy hydroksylowe w cząsteczce nukleozydu zazwyczaj rozszczepia się w reakcji transestryfikacji w warunkach zasadowych.



Rys.1. Stosowane środki sililujące

Stosuje się metanolowy roztwór zawierający katalityczne ilości metoksyłanu sodu, nasycony metanolowy roztwór amoniaku lub etanolowy roztwór metyloaminy. Nie stosuje się warunków kwaśnych ze względu na łatwą hydrolizę wiązania glikozydowego. Odbezpieczenie przeprowadza się w temperaturze pokojowej, a otrzymany nukleozyd wydziela najczęściej metodą chromatografii kolumnowej. W przypadku innych grup zabezpieczających stosuje się specyficzne czynniki rozszczepiające np. etery sililowe rozszczepia się przy pomocy fluorku tetrabutylamoniowego.



Schemat 9. Synteza nukleozydów metodą sililową