Химичен синтез в разтвор на малки олигонуклеотиди с използването на модификация на Н-фосфонатната химия

Станислав Байрямов

***Chemical synthesis of small oligonucleotides in solution, using a modification of the H-phosphonate chemistry**: In this paper we describe the synthesis of oligonucleotides, using our originally discovered approach (as a modification strategy) of the H-phosphonate chemistry. The synthesis was carried out at mild conditions, improving the previously employed protocol for the synthesis, applying the 3'-phosphonylated nucleotide as a base structural unit.*

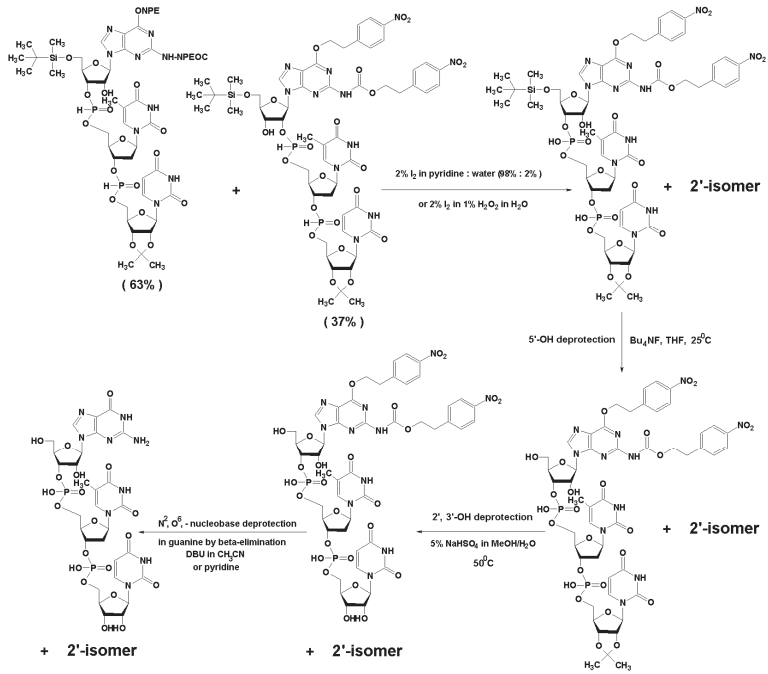
***Key words:** H-phosphonate chemistry, oligonucleotide synthesis, methyl oxirane (1,2-propylene oxide), H-phosphonic acid (phosphorous acid), DNA, RNA.*

ВЪВЕДЕНИЕ

Прилагането на подходите и техниките за олигонуклеотиден синтез с цел-създаването на различни фрагменти за целите на фармацията и медицината датира още от началото на 50-те години на XX век. В тази връзка като баща на нуклеотидния синтез се сочи лорд Александър Тод [1], въвел фосфотриестерния метод за синтез на олигонуклеотиди [2]. От тогава методологията за олигонуклеотиден синтез търпи непрекъснато развитие, като се разработват и развиват фосфотриестерният метод [3], фосфорамидитен метод (наричал се е преди фосфиттриестерен или фосфитен метод) [4] и Н-фосфонатен метод [5]. В ранните етапи от развитието на нуклеотидния синтез често се е прилагал фосфодиестерният метод с използване на дициклохексилкарбодиимид като кондензиращ агент за създаване на междубиомономерна връзка. Този метод има вече само историческо значение, но през 70-те години на XX век, благодарение на него е синтезиран гена, кодиращ аланин-тРНК [6].

ИЗЛОЖЕНИЕ

Използването на Н-фосфонатния метод за синтез има редица предимства пред останалите: фосфатната група не се защитава; окислението може да се извърши по всяко време независимо от етапа на синтез; фосфонилирането е по-бързо от фосфорилирането и фосфитилирането; Н-фосфонатите са по-стабилни от фосфорамидитите, като това позволява да се синтезират аналози с модифицирана междунуклеотидна връзка. Това ни е накарало да потърсим нови модификации и протоколи за синтез по този начин, използвайки Н-фосфонатната химия с цел-смекчаване на условията, постигане на по-кратко реакционно време, високи добиви и оригиналност на метода. Използването на химията на метилоксирана (1,2-пропиленов окис) и Н-фосфоновата киселина, като оригинален метод за рибозимомиметичен синтез (създаване) на междубиомономерна връзка открива цяла област за тяхното приложение, напр. при синтеза на естери на аминокиселини [7, 8, 9, 10], синтеза на амиди и пептиди [11, 12], при фосфонилиране на аминокиселини и захари [13], при олигозахаридния синтез, при олигонуклеотидния синтез [14], при аминоацилиране на захари и нуклеозиди [15], както и при модификацията на нуклеозиди и нуклеотиди. В тази връзка в предишната публикация бяха синтезирани 2 тринуклеотида (деоксирибонуклеотид: dCdCdA, имитиращ 3'-края на тРНК, но изграден само от деоксирибонуклеотиди, както и смесеният тринуклеотид: GTU) [14]. Беше използван подхода за фосфонилиране на 3'-края на 5'-защитен 2'-деоксирибонуклеотид и 3'-края на 5'-защитен рибонуклеотид и използването му като структурна единица при синтеза на съответните тринуклеотиди. Деблокирането на функционалните групи в крайния етап води до получаването на свободния тринуклеотид, напр. при получаването на GTU (фиг. 1).



Фиг. 1. Деблокиране на функционалните групи при 5’-TBDMS-O-G$^{N2\text{-}NPEOC,\ O6\text{-}NPE}$ -p-T-p-U-2’,3’-O-iPr в крайния етап при получаването на смесения тринуклеотид или по-точно тринуклеозид дифосфат: 5’-G-p-T-p-U-3’-OH (GTU).

С настоящата работа се представя елегантен метод за синтез на малки олигонуклеотиди в разтвор, с фосфонилиране на 5'-края на даден 3'-защитен 2'-деоксирибонуклеотид и на 5'-края на даден 2',3'-О-защитен рибонуклеотид и използването му като структурна единица при синтеза на съответните малки олигонуклеотиди (Фиг. 2). Освен това методиката може да бъде усъвършенствана и приложена при твърдофазния (ръчен) синтез, както и за прилагането при автоматизирания синтез на олигонуклеотиди.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

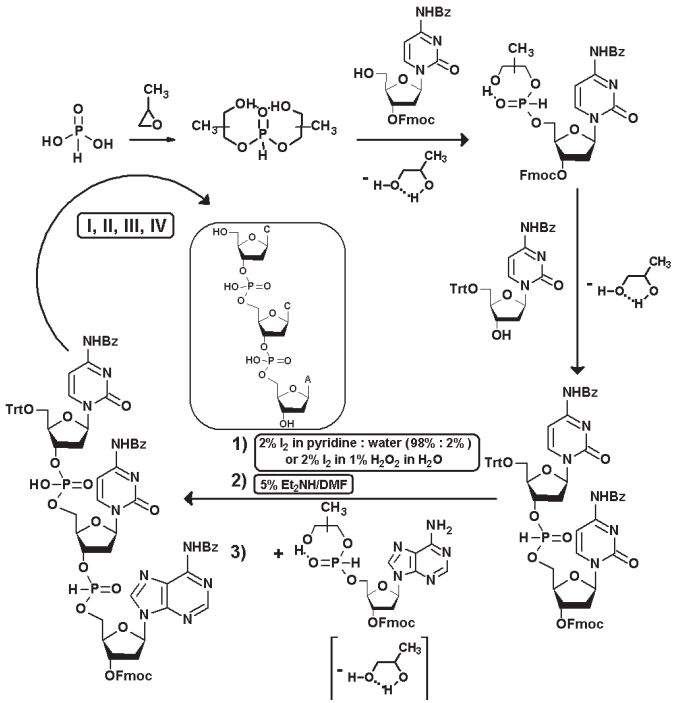
Обърнато-фазовите HPLC-анализи са извършени на течен хроматограф "Waters”, снабден с абсорбционен детектор модел 441 при дължина на вълната 280 nm и колона Nucleosil 100-5C_{18} (12.5 cm x 4.6 mm) за аналитични цели.

^{1}H и ^{13}C NMR спектрите са снети и обработени на Bruker Avance II+ 600MHz spectrometer, използвайки BBO или TBI сондиране и изследване. Химичните отмествания са изразени в единици ppm и константите на спин-спиново взаимодействие са обозначени в Hz. Прецизните определяния на ^{1}H и ^{13}C NMR спектрите са извършени чрез изчисляване на 2D хомоядрената корелация (COSY), DEPT-135 и 2D обърнатите (противоположните) детектирани хетероядрени (C–H) корелации (HSQC and HMBC).

TLC анализите са проведени с използване на силикагелни пластинки UV260, закупени от Merck, като за индикация на петната и визуална детекция са използвани 5% разтвор на H2SO4 в метанол или етанол, а също така алкохолен разтвор на нинхидрин, както и разтвор на фосфор-молибденова киселина. За провеждане на

TLC анализите бяха използвани следните системи от разтворители: CH2Cl2 : MeOH (9:1) или (9.5:0.5).

Крайните продукти бяха определени чрез елементен анализ, използвайки автоматични анализатори: Carlo Erba Elemental Analyzer Model 1106 (Carlo Erba, Milan, Italy) и Perkin-Elmer Elemental Analyzer Model 240 (Perkin-Elmer Corp.,Norwalk, Connecticut).



Фиг. 2. Синтез на dCdCdA използвайки 5'-фосфонилирани 3'-защитени 2'-деоксирибонуклеотиди като донори на фосфатна група. I – 2% I_2 в пиридин : вода (98:2%) или 2% I_2 в 1% H_2O_2 във вода за окисляване на H-фосфонатната група във фосфатна; II – 5% Et_2NH/DMF за деблокиране на 3'-края; III – 5% $NaHSO_4$ в MeOH/H_2O при 50^0C за деблокиране на 5'-края; IV – 3 еквивалента MeOK в MeOH (калиев метилат в метанол) за освобождаване на нуклеобазите.

СИНТЕЗ НА ТРИНУКЛЕОТИДИТЕ: dCdCdA и GTU

За целта беше приложена опитната процедура за синтез на тринуклеотиди [14], като вместо 5'-защитен 2'-деоксирибонуклеотид (рибонуклеотид), беше използван 3'-защитен 2'-деоксирибонуклеотид, с последващо фосфонилиране на неговия 5'-край и прилагането му като структурна единица при синтеза. Като реагенти за фосфонилиране бяха използвани метилоксиран (изопропиленов окис) и H-фосфонова киселина. За разлика от предишния протокол за синтез [14], окислението с йод се е извършвало на всеки етап на създаване на връзка между два нуклеотида с цел – да се предотврати нуклеофилна атака от диетиламина при премахването на Fmoc-групата.

При анализ на получените съединения с помощта на ЯМР-спектроскопията се доказа идентичността на продуктите, чрез сравняване на ^{1}H и ^{13}C NMR спектрите, които са аналогични с тези на получените крайни продукти, използвайки предишния

протокол на фосфонилиране на 3'-края на 5'-защитен 2'-деоксирибонуклеотид и на 5'-защитен рибонуклеотид.

1) 5'-TrO-dC^{Bz}-p-dC^{Bz}-p-dA^{Bz}-3'-OFmoc (Tr-dC^{Bz}dC^{Bz}dA^{Bz}-Fmoc):

Добив: 0,532 гр. (73,5%). Rf-0,786. (CH_2Cl_2 : MeOH – 9,5:0,5). Елементен анализ: Anal. Calculated for $C_{83}H_{73}N_{11}O_{20}P_2$: (Mw = 1606,485 g/mol); C-62.054%, H-4.58%, N-9.591%; found: C-62.171%, H-4.576%, N-9.726%. Rt = 17,781 min. Flow rate: 0,8ml/min (CH_3CN : 20mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 buffer - 70:30).

2) 5'-dC-p-dC-p-dA-3'-OH (dCdCdA):

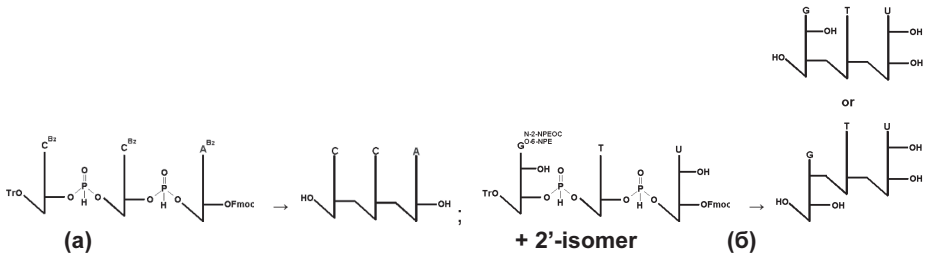
Добив: 0,117 гр. (37%). Rf-0,267. (CH_2Cl_2 : MeOH - 9:1). Елементен анализ: Anal. Calculated for $C_{28}H_{37}N_{11}O_{15}P_2$: (Mw = 829,609 g/mol); C-40.537%, H-4.495%, N-18.572%; found: C-40.519%, H-4.507%, N-18.581%. Rt = 5,867 min. Flow rate: 0,8ml/min (CH_3CN : 20mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 buffer - 40:60).

3) 5'-TBDMS-O-G$^{N2\text{-}NPEOC,\ O6\text{-}NPE}$-p-T-p-U-2',3'-O-iPr (TBDMS-G$^{N2\text{-}NPEOC,\ O6\text{-}NPE}$ TUiPr) и неговият 2'-изомер:

Добив: 0,594 гр. (75%). Rf-0,834. (CH_2Cl_2 : MeOH – 9,5:0,5). Елементен анализ на сместа от двата изомера: Anal. Calculated for $C_{110}H_{138}N_{22}O_{52}P_4Si_2$: (Mw = 2780,467 g/mol); C-47.517%, H-5.003%, N-11.083%; found: C-47.238%, H-4.996%, N-11.078%. Rt = 20,134 min. (3'-изомер). Rt = 19,413 min. (2'-изомер). Flow rate: 0,8ml/min (CH_3CN : 20mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 buffer - 70:30).

4) 5'-G-p-T-p-U-3'-OH (GTU) и неговият 2'-изомер:

Добив: 0,157 гр. (39%). Rf-0,315. (CH_2Cl_2 : MeOH - 9:1). Елементен анализ на сместа от двата изомера: Anal. Calculated for $C_{58}H_{74}N_{18}O_{40}P_4$: (Mw = 1787,207 g/mol); C-38.978%, H-4.173%, N-14.107%; found: C-39.291%, H-4.091%, N-14.092%. Rt = 10,786 min. (3'-изомер). Rt = 9,349 min. (2'-изомер). Flow rate: 0,8ml/min (CH_3CN : 20mM KH_2PO_4/K_2HPO_4 buffer - 40:60).



Фиг. 3. Различни начини на представяне на синтезираните продукти: dCdCdA (а) и GTU (б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработен е протокол за синтез на олигонуклеотиди в разтвор при меки условия, като е използвана създадената и усъвършенстваната от автора модификация на Н-фосфонатната химия.

Синтезираните малки тринуклеотиди са анализирани с помощта на ^{1}H и ^{13}C ЯМР спектроскопия, както и е определен техният елементен състав.

Разработените протоколи, използващи създадената от автора модификация на Н-фосфонатната химия, както и предстоящото усъвършенстване на методологията, позволяват синтез на малки олигонуклеотиди в разтвор и внедряването на метода за осъществяването на ръчен и автоматизиран твърдофазен олигонуклеотиден синтез за създаване на олигонуклеотиди, необходими като гени и оперони в рекомбинантната ДНК-технология.

Тези разработки биха послужили във фармацията и медицината - от една

страна във връзка с усъвършенстването на методите за синтез на нуклеотиди в разтвор в големи мащаби, както и във връзка с разработването на методологията за ръчен и автоматизиран твърдофазен олигонуклеотиден синтез, използващи се в паралелния синтез при създаването на комбинаториални библиотеки.

Синтезираните по този метод олигонуклеотиди биха намерили приложение като праймери, за лекарствени средства, вкл. и в антисенс терапията и др.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Michelson, M., Todd, A. R. J. Chem. Soc. 1955, 2632.

[2] Sonveaux. Bioorg. Chem. 1986, 14, 274.

[3] Katagari, K., Itakura, K., Narang, S. A. J. Amer. Chem. Soc. 1975, 97, 7332.

[4] Beaucage, L., Iyer, R. P. Tetrahedron. 1992, 48, 2223. b. Beaucage, L., Caruthers, M. H. Tetrahedron Lett. 1981, 22, 1859.

[5] Froehler, C., Ngo, P. G., Matteuci, M. D. Nucleic Acid Res. 1988, 14, 5399.

[6] Khorana G. et al. J. Mol. Biol. 1972, 72, 209-217.

[7] Videva, V.S., Bairyamov, S.G., Devedjiev, I.T. Bulg. Chem. Commun. 2007, 39, 276.

[8] Devedjiev, I.T., Bairyamov, S.G., Videva, V.S. Heteroatom Chemistry. 2008, 19, 252.

[9] Bayryamov, S.G. Научни трудове на Русенски Университет -2010, том 49, серия 9.1, 41 – 48. Русе, 2010 г.

[10] Bayryamov, S.G., Bayryamov, N.G., Danalev, D. L. & Vassilev, N. G. Unpublished results.

[11] Bayryamov S., Dantcho Danalev, Nikolay Vassilev. Proceedings of the 30th European Peptide Symposium, 2009, 1-03-157, 130-131.

[12] Bayryamov S., Dantcho Danalev, Nikolay Vassilev. Phosphorus, Sulfur and Silicon and Related Elements. 2011, 186 (2), 338-344.

[13] Bayryamov, S.G. Unpublished results.

[14] Bayryamov, S.G. Научни трудове на Русенски Университет - 2011, том 50, серия 9.1, 19 – 28. Русе, 2011 г.

[15] Bayryamov, S.G. Научни трудове на Русенски Университет -2011, том 50, серия 9.1, 39 – 45. Русе, 2011 г.

За контакти:

Гл. ас. д-р Станислав Георгиев Байрямов, катедра “Ремонт, надеждност и химични технологии”, Русенски университет “Ангел Кънчев”, Тел.: 082/ 888 228, 888 459.

Докладът е рецензиран.