

FRI-21-P-CT(R)-13

**CHEMICAL STEPWISE SOLUTION PHASE SYNTHESIS OF A TETRARIBO-  
NUCLEOTIDE AGCU, IN DIRECTIONS FROM THE 5'→3' AS WELL AS 3'→5'  
TERMINUS, USING A MODIFICATION OF THE H-PHOSPHONATE CHEMISTRY**

Stanislav Bayryamov

**ХИМИЧЕН СЪПЪКОВ СИНТЕЗ В РАЗТВОР НА ТЕТРАРИБОНУКЛЕОТИДА AGCU  
ОТ 5'→3' КАКТО И ОТ 3'→5' КРАЙ С ИЗПОЛЗВАНЕ НА МОДИФИКАЦИЯ НА  
Н - ФОСФОНАТНАТА ХИМИЯ**

Станислав Байрямов

*Chemical stepwise solution phase synthesis of a tetraribonucleotide AGCU, in directions from the 5'→3' as well as 3'→5' terminus, using a modification of the H-phosphonate chemistry: In previous work, the stepwise ribozyme-mimetic synthesis of tetra-2'-deoxyribonucleotide: d(AGCT), in both cases prepared from the 5'→3' and 3'→5' end, was described consecutively, using the improved modification of the H-phosphonate chemistry. 3'-protected 5'-phosphonylated 2'-deoxyribonucleosides and 5'-protected 3'-phosphonyl 2'-deoxyribonucleosides were used as building units.*

*The ribozyme-mimetic short-chain nucleotide chemical stepwise synthesis in solution was developed in the present paper by the author, who describes the preparation of the oligonucleotide AGCU, using originally discovered approach of the H-phosphonate chemistry. For this purpose 2',3'-protected 5'-phosphonylated ribonucleosides and 2',5'-protected 3'-phosphonyl ribonucleosides were used as building blocks in the procedure.*

*The results show that the proposed protocols would successfully be applied to the large-scale short-chain nucleotide synthesis, including as ribonucleotides as well as 2'-deoxyribonucleotides as monomers.*

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

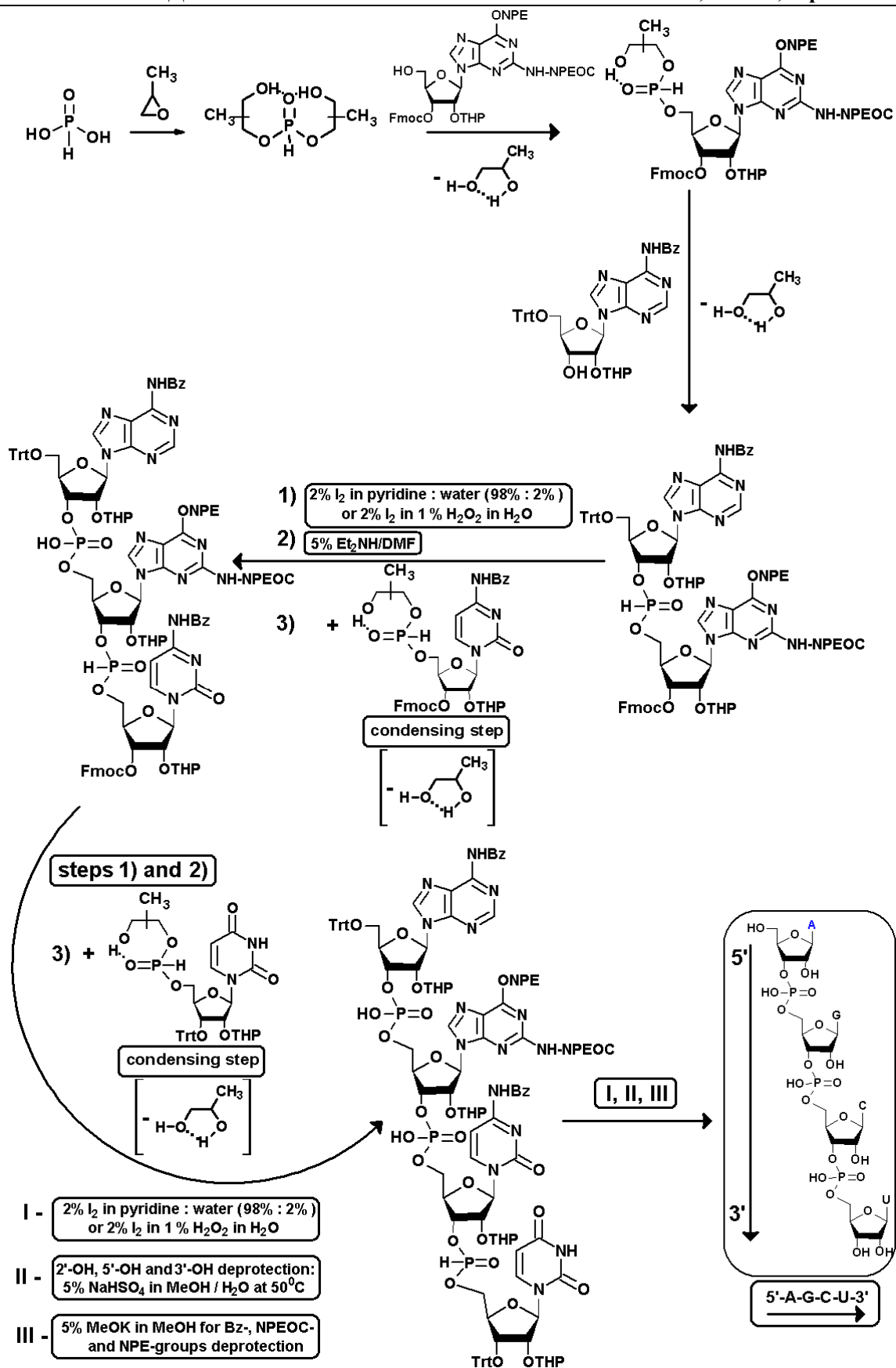
## ВЪВЕДЕНИЕ

В предишната работа бе описан последователно стъпковият рибози момиметичен синтез на тетра-2'-деоксирибонуклеотида АГЦТ [d(AGCT)], както от 5'→3' така и от 3'→5' край, прилагайки усъвършенстваната модификация на Н-фосфонатната химия [1, 2]. Бяха използвани 3'-защитени 5'-фосфонилирани 2'-деоксирибонуклеозиди като градивни единици, както и 5'-защитени 3'-фосфонилирани 2'-деоксирибонуклеозиди като градивни единици. Тук прилагаме същият подход за синтез на тетрарибонуклеотида AGCU от 5'→3' както и от 3'→5' края с използване на модификация на Н-фосфонатната химия. За целта в процедурата са използвани 2',3'-защитени 5'-фосфонилирани рибонуклеозиди и 2',5'-защитени 3'-фосфонилирани рибонуклеозиди като структурни единици (синтетични еквиваленти, носещи съответните фосфонилни рибонуклеозидни синтони).

Vz-бензоил; NPEOC-p-нитрофенилетилоксикарбонил, NPE-p-нитрофенилетил; Ttt-тритил; Fmoc-9-флуоренилметилоксикарбонил; THP-тетрахидропиранил; A-аденин; G-гуанин; C-цитозин; U-урацил.

## ИЗЛОЖЕНИЕ

Фосфористата киселина би могла да бъде разгледана като производно на фосфина (PH<sub>3</sub>), за разлика от фосфорната киселина, която е производно на фосфорана (PH<sub>5</sub>). Фосфонилният фосфорен атом във фосфоновата киселина се явява като много по-голям електрофил (както карбонилният въглероден атом в алдехидите е по-голям електрофил от карбоксилния въглероден атом в карбоксилните киселини) в сравнение с фосфорилния фосфорен атом във фосфорната киселина [1-8]. Поради тази причина триалкилфосфитите реагират трилион пъти по-бързо, в сравнение с триалкилфосфатите в кисела среда [3]. Освен



Фиг.1: Схема на стъпков синтез в разтвор на тетрарибонуклеотида AGCU от 5'→3' край, прилагайки модификация на Н-фосфонатната химия, с използване на 2',3'-защитени 5'-фосфонириани рибонуклеозиди като градивни единици. Vz-бензоил; NPEOC-р-нитрофенилетилоксикарбонил, NPE-р-нитрофенилетил; Trt-тритил; Fmoc-9-флуоренилметилоксикарбонил; THP = тетрахиdropиранил; А-аденин; G-гуанин; С-цитозин; U-урацил.

това фосфитната група много лесно би могла да бъде превърната във фосфатна чрез окисление. Образуването на нуклеотидна връзка при стадийния синтез се извършва при куплирането на активирана фосфонилна група с 5'-ОН или 3'-ОН група [4, 8]. При фосфонилирането се получава Н-фосфонатна диестерна връзка. Този метод има редица преимущества, като напр. това, че фосфатната група не се защитава, фосфонилирането протича много по-бързо от фосфорилирането, Н-фосфонатите са сравнително стабилни [4, 8], като по този начин биха могли да бъдат синтезирани аналози с модифицирана между-нуклеотидна връзка.

Както се вижда от схемата на Фиг.1, стъпковият синтез в разтвор на тетрарибонуклеотида AGCU е осъществен от 5'→3' края с използване на 2',3'-защитени 5'-фосфонилирани рибонуклеозиди като градивни единици. 2'-хидроксилната група беше защитена, използвайки киселинно лабилната тетрахиdropиранилна защита (устойчива от своя страна в алкална среда), докато 3'-ОН групата беше блокирана с Fmoc-група (9-флуоренилметилоксикарбонилна защитна група), лабилна в алкална и стабилна в кисела среда. Само 5'-крайният нуклеозид (бензоилираният аденозин: A<sup>Bz</sup>) беше 3',5'-защитен: хидроксилната група на 5'-края е с тритилна-, а тази при втория въглероден атом е защитена с тетрахиdropиранилна група. И двете защиты са устойчиви в алкална среда, което позволява успешното провеждане на химичния стъпков синтез в разтвор в посока от 5'→3' края. Кондензационната стъпка, позволяваща куплирането на двата мономера с образуване на Н-фосфонодиестерна връзка, позволява последващото окисление (използвайки йод в пиридин и вода или йод във водороден прекис и вода, вж. Фиг.1) до образуването на фосфодиестерна връзка. Преди следващия кондензационен стадий, 3'-ОН групата на 3'-крайния нуклеозид се освобождава от Fmoc-защитата в алкална среда (използвайки 5% диетиламин в диметилформамид). По този начин се подготвя осъществяването на следващата кондензационна стъпка със следващия 2',3'-защитен 5'-фосфонилиран рибонуклеозид (Фиг.1). Така протича нарастване на нуклеозид-фосфата до образуването на желания тетрамер, спазвайки указаната последователност на стъпките в химичния синтез. Полученият по този начин защитен тетрамер AGCU се освобождава от защитните групи. Тритилната (Trt) и тетрахиdropиранилната (THP) групи се премахват в кисела среда (5% NaHSO<sub>4</sub> в CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O, 50<sup>0</sup>C), докато защитните за нуклеобазите групи се елиминират в присъствие на силни нуклеофили като например натриев или калиев метилат, разтворени в метанол (CH<sub>3</sub>OK/ CH<sub>3</sub>OH; CH<sub>3</sub>ONa/ CH<sub>3</sub>OH). По този начин се осъществява синтезната схема на тетрарибонуклеотида в посока от 5'→3' края, използвайки съответния утвърден протокол с модификация на Н-фосфонатната химия.

Другият протокол беше реализиран, като за пример послужи стъпковият химичен синтез на същия тетрамер AGCU в разтвор, но в обратна посока: от 3'→5' края. Като градивни единици са използвани 2',5'-защитени 3'-фосфонилирани рибонуклеозиди. 2'-ОН групата беше защитена с THP-защита, а 5'-ОН – с Fmoc-защита. Стъпките са аналогични на Фиг.1, с използване на същите реактиви за окисление и за сваляне на временните, както и полу-постоянните защитни групи (Фиг.2).

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ

Обърнато-фазовите HPLC-анализи са извършени на течен хроматограф "Waters", снабден с абсорбционен детектор модел 441 при дължина на вълната 254 nm и колона Nucleosil 100-5C<sub>18</sub> (12.5 cm x 4.6 mm) за аналитични цели.

<sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C NMR спектрите са снети и обработени на Bruker Avance II+ 600MHz spectrometer, използвайки ВВО или ТВІ сондиране и изследване. Химичните отмествания са изразени в единици ppm и константите на спин-спиново взаимодействие са обозначени в Hz. Прецизните определяния на <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>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 HMBС). TLC анализите са проведени

с използване на силикагелни пластинки Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, закупени от Merck, като за индикация на петната и визуална детекция са използвани 5% разтвор на H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в метанол или етанол, а също така алкохолен разтвор на нинхидрин, както и разтвор на фосфор-молибденова киселина.

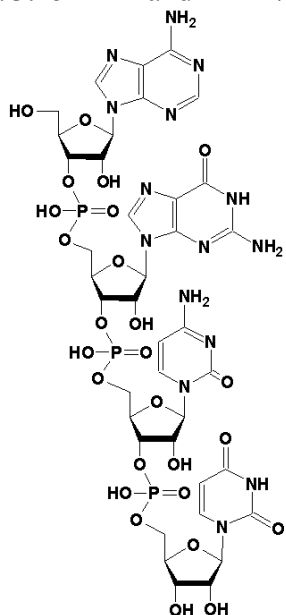
За провеждане на TLC анализите бяха използвани следните системи от разтворители: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (9:1) или (9.5:0.5). Крайните продукти бяха определени чрез елементарен анализ, използвайки автоматични анализатори: Carlo Erba Elemental Analyzer Model 1106 (Carlo Erba, Milan, Italy) и Perkin-Elmer Elemental Analyzer Model 240 (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, Connecticut).

Пълните процедури, както и опитните постановки за синтез, са описани при получаването на малките нуклеотиди: d(CCA) и на смесения тринуклеотид GTU, заедно с неговия 2'-изомер [7,9].

5'-H-A-p-G-p-C-p-U-3'-OH: AGCU:

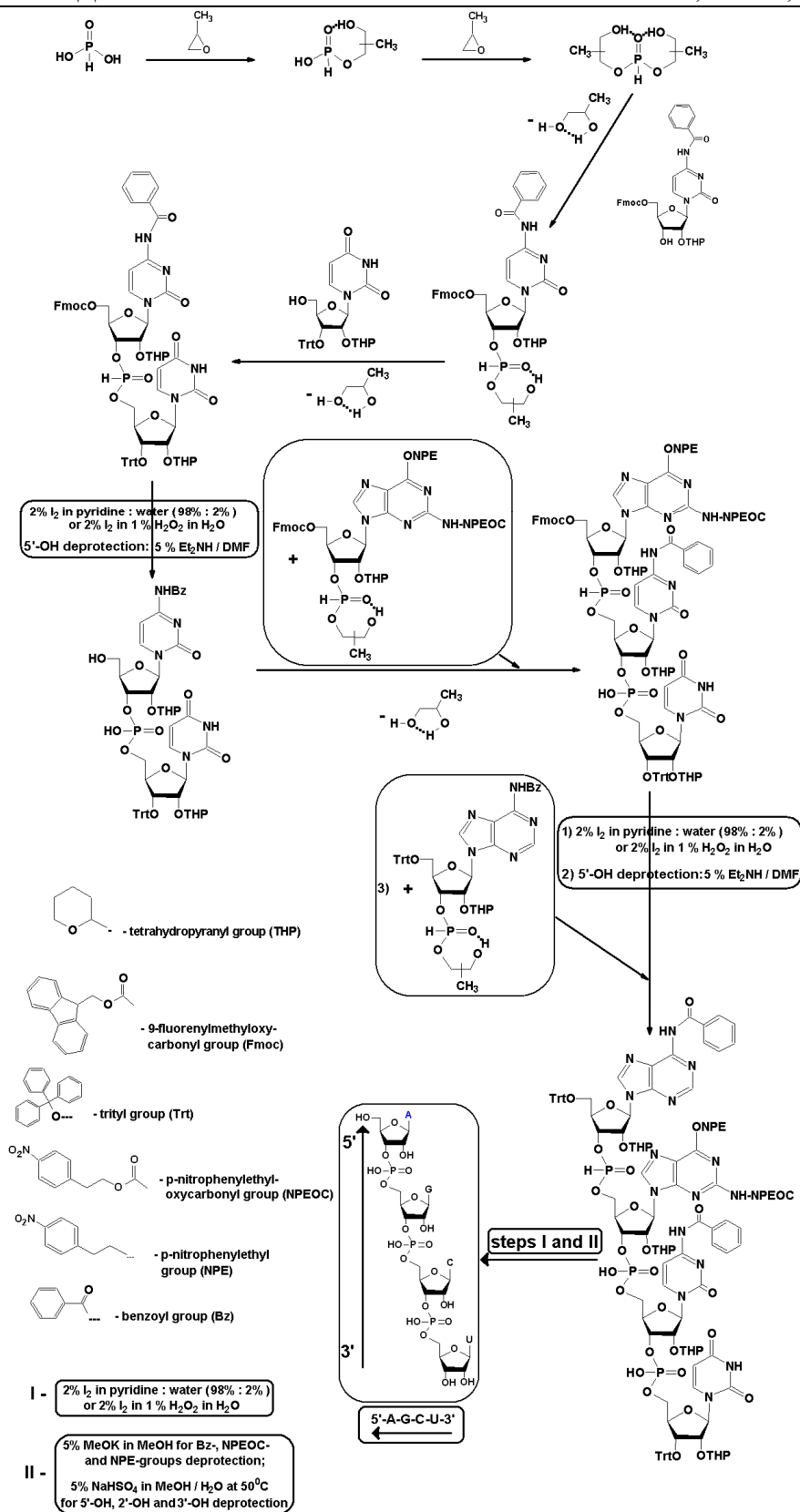
Добив: 0,327 гр. (44%). Rf-0.439. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH - 9:1), Rf-0.336. (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH - 9.5:0.5).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, 25<sup>0</sup>C): δ = 60.75 and 60.88(5'-CH<sub>2</sub>, 5'-end, Ado); 63.94 and 64.09(5'-CH<sub>2</sub>, 3'-end, Urd); 66.97, 67.10 and 67.25(5'-CH<sub>2</sub>, Cyt); 67.95, 68.08 and 68.23(5'-CH<sub>2</sub>, Guo); 68.76 and 68.89(3'-CH, 3'-end, Urd); 70.83 and 70.96(3'-CH, Cyt); 72.78 and 72.91(3'-CH, Ado); 73.45 and 73.65(2'-CH, Cyt); 73.57 and 73.77(2'-CH, Urd); 157.96(6-C, CO, Gua, Guo); 165.63(4-C, CO, Ura, Urd); 166.45(4-C, CO, Cyt, Cyt).



**Елементарен анализ:** Anal. Calculated for C<sub>38</sub>H<sub>48</sub>N<sub>15</sub>O<sub>26</sub>P<sub>3</sub>: (Mw = 1223,79 g/mol); C-37.29%, H-3.95%, N-17.17%; found: C-37.35%, H-3.91%, N-17.21%. Rt = 5,318 min. Flow rate: 0,8ml/min (CH<sub>3</sub>CN: 20mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer - 35:65).

Ado); 73.67(2'-CH, Urd); 75.88 and 76.08 (2'-CH, Guo); 77.23, 77.36 and 77.48(3'-CH, Guo); 82.37 and 82.57(4'-CH, Urd); 82.85 and 83.05(4'-CH, Ado); 86.24, 86.44 and 86.64(4'-CH, Guo); 87.96 and 88.08(1'-CH, Cyt); 88.89(1'-CH, Urd); 89.61 and 89.73(1'-CH, Guo); 91.98 and 92.10(1'-CH, Ado); 95.42(5-CH, Cyt, Cyt); 101.91(5-CH, Ura, Urd); 119.43(5-C, Ade, Ado); 119.66(5-C, Gua, Guo); 140.12(8-CH, Ade, Ado); 140.87(8-CH, Gua, Guo); 141.09(6-CH, Ura, Urd); 142.31(6-CH, Cyt, Cyt); 149.52(4-C, Ade, Ado); 151.31(2-C, CO, Ura, Urd); 151.35(4-C, Gua, Guo); 153.25(2-CH, Ade, Ado); 153.45(2-C, Gua, Guo); 155.76(6-C, Ade, Ado); 157.06(2-C, CO, Cyt, Cyt);



Фиг.2: Схема на стъпков синтез в разтвор на тетрарибонуклеотида AGCU от 3'→5' край, прилагайки модификация на Н-фосфонатната химия, с използване на 2',5'-защитени 3'-фосфонириани рибонуклеозиди като градивни единици\*. Bz-бензоил; NPEOC-р-нитрофенилетилоксикарбонил; NPE-р-нитрофенилетил; Trt-тритил; Fmoc-9-флуоренилметилоксикарбонил; THP = тетрахиdropиранил; А-аденин; G-гуанин; С-цитозин; U-урацил.

\* При 3'-крайния нуклеозид (уридин), вместо тетрахиdropиранилна защитна група (ТНР) при 2'-ОН, беше използвана и тритилна група (Trt), т.е. 2',3'-дитритилиран уридин (2'-O-Trt,3'-O-Trt Urd), тъй като и двете групи са киселинно лабилни и се свалят в еднакви условия. Това позволява от една страна спестяване на етапи на синтез (блокиране и деблокиране на тези групи), а от друга-разход на реактиви.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С настоящата работа авторът описва синтеза на тетрарибонуклеотида AGCU от 5'→3' както и от 3'→5' край, прилагайки нова оригинално разработена процедура за биомиметичен (рибозимомиметичен) стъпков химичен синтез в разтвор на къси нуклеотиди, като модификация на Н-фосфонатната химия. Методът позволява създаването на различни олигонуклеотиди при меки реакционни условия.

Синтезираните малки тетрануклеотиди са анализирани с помощта на <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР спектроскопия, както и е определен техният елементен състав.

Създадената от автора модификация на Н-фосфонатната химия, позволява получаването на малки нуклеотиди в разтвор и внедряването на метода за олигонуклеотиден синтез в промишлени мащаби, които биха послужили като ценни съединения във фармацията и медицината.

### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Ваурямов, S.G. Научни трудове на Русенски университет -2011, том 50, серия 9.1, 19 – 28. Русе, 2011 г.
- [2] Ваурямов, S.G. Научни трудове на Русенски университет -2012, том 51, серия 9.1, 164 – 168. Русе, 2012 г.
- [3] Westheimer, H., S. Huang, S. Govitz. J.Amer.Chem.Soc., 110 (1988), 181.
- [4] Stanislav G. Bayryamov and Dancho L. Danalev. Proceedings of the 33<sup>rd</sup> European Peptide Symposium, European Peptide Society, 2014, PEPTIDES' 2014, pp. 219-220.
- [5] Devedjiev, I.T., Bairyamov, S.G., Videva, V.S. Heteroatom Chemistry. 2008, 19, 252.
- [6] Stanislav Bayryamov, Dancho Danalev, Nikolay Vassilev. Proceedings of the 30<sup>th</sup> European Peptide Symposium, 2009, 1-03-157, 130-131.
- [7] Stanislav Bayryamov, Dancho Danalev, Nikolay Vassilev. Phosphorus, Sulfur and Silicon and Related Elements. 2011, 186 (2), 338-344.
- [8] Dancho L. Danalev, Stanislav G. Bayryamov and Nikolay G. Vassilev. Proceedings of the 33<sup>rd</sup> European Peptide Symposium, European Peptide Society, 2014, PEPTIDES' 2014, pp.118-119.

### За контакти:

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