

Химичен стъпков синтез в разтвор на тетрануклеотида d(AGCT) от 5'→3' както и от 3'→5' край, прилагайки модификация на Н-фосфонатната химия

Станислав Байрямов

Chemical stepwise synthesis in solution of tetranucleotide d(AGCT) from 5'→3', as well as 3'→5' end, applying a modification of the H-phosphonate chemistry: In this paper author describes the synthesis of tetra-2'-deoxyribonucleotide: d(AGCT) from 5'→3' and 3'→5' end, applying a modification of the H-phosphonate chemistry. The stepwise synthesis was realized, using 3'-O-protected 5'-O-phosphorylated as well as 5'-O-protected 3'-O-phosphorylated 2'-deoxyribonucleosides as structural units, depending on the direction in the synthesis strategy. The synthesis protocol will allow for improving of the large-scale solution-phase preparation of small nucleotides, as well as for development of the convenient solid-phase oligodeoxyribonucleotide synthesis.

Key words: H-phosphonate chemistry, oligodeoxyribonucleotide stepwise synthesis, solution-phase synthesis, methyl oxirane (1,2-propylene oxide), H-phosphonic acid (phosphorous acid), DNA, RNA.

ВЪВЕДЕНИЕ

Нуклеозидният, нуклеотидният и олигонуклеотидният синтез намират широко приложение във фармацевтичната индустрия при получаването на противотуморни препарати с различно значение. С настоящата работа авторът предлага оригинална процедура за рибозимомиметичен синтез на тетрануклеотида d(AGCT) от неговия 5'→3' както и от 3'→5' край, използвайки химията на метилоксирана/фосфористата киселина при меки условия, като модификация на Н-фосфонатния метод за олигонуклеотиден синтез. Чрез своето усъвършенстване, въведеният метод би могъл да послужи за индустриалното получаване на къси нуклеотиди (ди-, три-, тетра-, пента- и хексамери) в разтвор, както и като метод в твърдофазния синтез за получаването на молекули с по-големи размери.

ИЗЛОЖЕНИЕ

В предишните публикации [7,9], авторът описва синтеза на тринуклеотидите dCdCdA [d(CCA)] и GTU от 3'→5' край, прилагайки модификация на Н-фосфонатната химия, с използване на 5'-О-защитени 3'-О-фосфонилирани 2'-деоксирибонуклеозиди и 5'-О-защитени 2'/3'-О-фосфонилирани рибонуклеозиди като градивни единици [7], както и от 5'→3' края с използването на 3'-О-защитени 5'-О-фосфонилирани 2'-деоксирибонуклеозиди и 2',3'-О-защитени 5'-О-фосфонилирани рибонуклеозиди като структурни елементи [9]. С настоящата работа се акцентира върху синтеза на тетрадеоксирибонуклеотида d(AGCT) в двете направления и с използване на съответните защитени от единия край и активирани от другия фосфонилирани 2'-деоксирибонуклеозиди.

При осъществяване на синтеза от 5'→3' край, първоначално се фосфонилира 5'-ОН групата на 3'-защитения нуклеозид (в случая 2'-деоксигуанозин). Като реагенти за фосфонилиране са използвани метилоксиран (изопропиленов окис) и Н-фосфонова киселина (Фиг.1). Под влияние на Н-фосфоновата (Н-фосфориста) киселина оксирановият пръстен при изопропиленоксида се отваря с едновременно образуване на 2-хидроксиизопропил Н-фосфонат и след това бис-2-хидроксиизопропил Н-фосфонат, който се явява активният синтетичен еквивалент, носещ Н-фосфонатния синтон, фосфонилиращ 5'-ОН групата на 3'-защитения 2'-деоксигуанозин [1-14]. За защитна група на 3'-ОН при 2'-деоксигуанозина беше избрана 9-флуоренилметилоксикарбонилна защита (Fmoc), лабилна в алкални условия (отстраняваща се чрез базично елиминиране). За защита на аминогрупата при C2 на гуанина (нуклеобазата) беше избрана р-нитрофенилметилоксикарбонилна (NPEOC-), а за хидроксилната група при C6 на гуанина - р-нитрофенилетилна (NPE-)

защитни групи, отстраняващи се също в алкална среда в резултат на базично елиминиране.

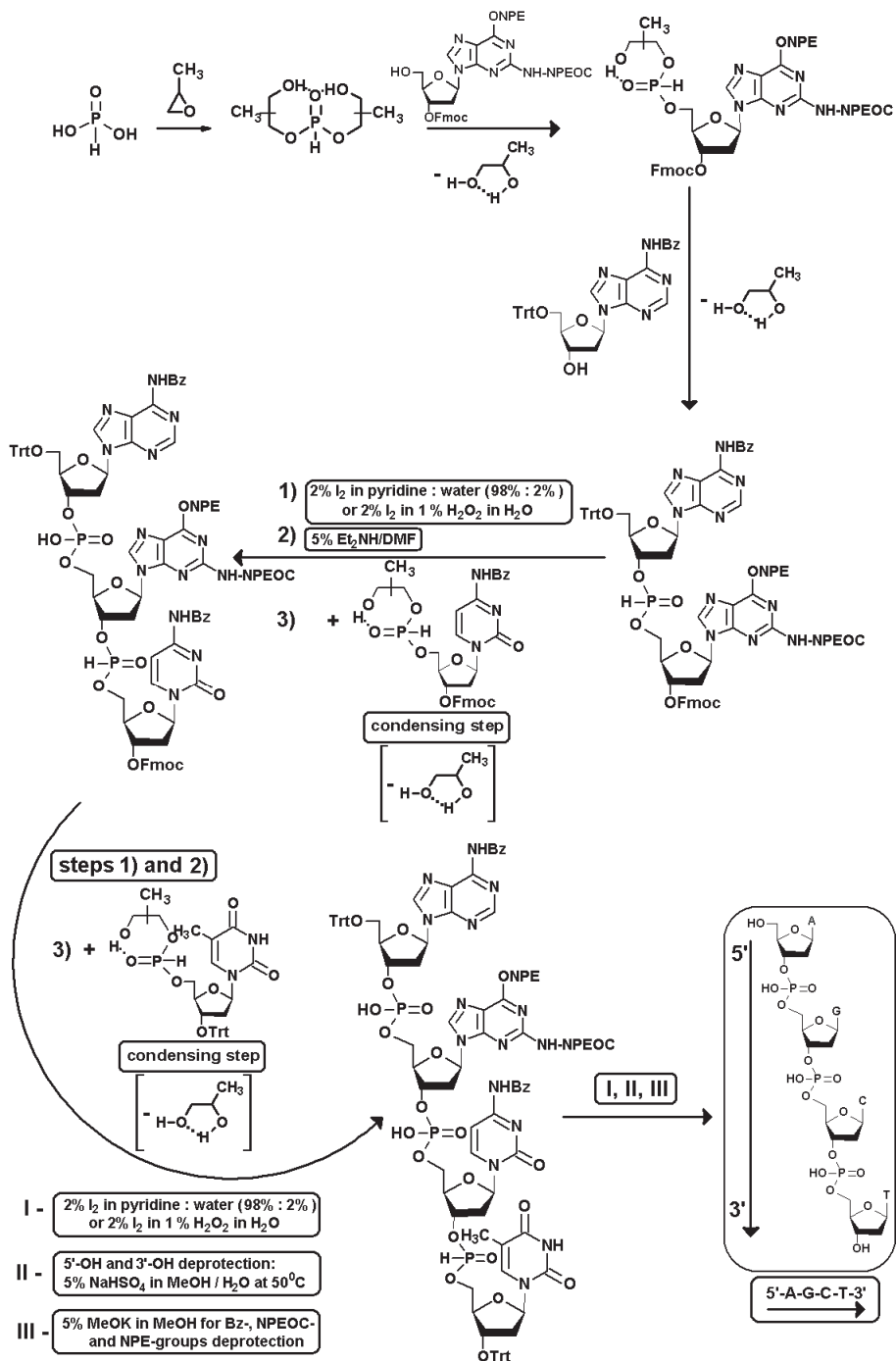
По този начин синтезираната се структурна единица участва в кондензационна реакция (посредством преестерификация) с 5'-O-Trt-dA^{Bz}. Образуваният се Н-фосфонилиран динуклеозид търпи окисление до образуването на фосфодиестер с последващо деблокиране на 3'-края и нова кондензация в посока 5'→3'-край с 3'-защитен 5'-фосфонилиран 2'-деоксирибонуклеозид (Фиг.1). Окислението с йод се извършва на всеки етап от създаване на връзка между два 2'-деоксирибонуклеозида с цел – да се предотврати нуклеофилна атака от диетиламина при премахването на Fмос-групата. По-нататък нарастването на веригата продължава, следвайки аналогичните стъпки, като крайното деблокиране на защитения тетра-2'-деоксирибонуклеотид се осъществява, следвайки процедурите II и III (Фиг.1).

На фиг.2 е показан синтезът на d(AGCT) от 3'→5' край. За целта беше приложена опитната процедура за синтез на тринуклеотиди [7], като вместо 3'-защитен 5'-фосфонилиран 2'-деоксирибонуклеозид, беше използван 5'-защитен 2'-деоксирибонуклеозид, с последващо фосфонилиране на неговия 3'-край и прилагането му като структурна единица при синтеза. Първият нуклеозид, който беше фосфонилиран на неговия 3'-край и използван като структурна единица е 5'-OTrt-2'-dCyd^{Bz}. Неговата кондензация с 3'-O-защитен тимидин дава 5'-O-, 3'-O-дизащитен ди-2'-деоксирибонуклеозид-Н-фосфонат. Окислението до фосфатна група тук се осъществява в края на синтезната процедура (при получаването на тетра-2'-деоксирибонуклеотида), а не на всеки етап, както е в първата процедура. Това се дължи на факта, че поради киселинното отстраняване на тритилната защита при 5'-края, не е необходимо предварително окисление на Н-фосфонатната група до фосфатна. По-нататъшните стъпки на синтезния протокол са показани на схемата на фиг.2. С нарастването на нуклеотида от 3'→5' край, което се реализира стъпка по стъпка се получава защитения тетра-2'-деоксирибонуклеотид, който след деблокиране на функционалните групи води до получаването на свободния d(AGCT). При анализ на получените съединения с помощта на ЯМР-спектроскопията се доказва идентичността на продуктите, чрез сравняване на ¹H и ¹³C NMR спектрите, които са аналогични с тези на получените крайни продукти, използвайки предишния протокол на фосфонилиране на 5'-края на 3'-защитения 2'-деоксирибонуклеозид.

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 100-5C₁₈ (12.5 cm x 4.6 mm) за аналитични цели.

¹H и ¹³C NMR спектрите са снети и обработени на Bruker Avance II+ 600MHz spectrometer, използвайки ВВО или ТВI сондиране и изследване. Химичните отмествания са изразени в единици ppm и константите на спин-спиново взаимодействие са обозначени в Hz. Прецизните определяния на ¹H и ¹³C NMR спектрите са извършени чрез изчисляване на 2D хомоядрената корелация (COSY), DEPT-135 и 2D обрнатите (противоположните) детектирани хетероядрени (C–H) корелации (HSQC and HMBC). TLC анализите са проведени с използване на силикагелни пластинки Kieselgel 60 F254, 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.



Фиг.1: Схема на стъпков синтез в разтвор на тетра-нуклеотида d(AGCT) от 5'→3' край, прилагайки модификация на Н-фосфонатната химия, с използване на 3'-защитени 5'-фосфонилирани 2'-деоксирибонуклеозиди като градивни единици. Vz-бензоил; NPEOC-р-нитрофенилетилоксикарбонил, NPE-р-нитрофенилетил; Trt-тритил; Fmoc-9-флуоренилметилоксикарбонил; А-аденин; G-гуанин; С-цитозин; Т-тимин.

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

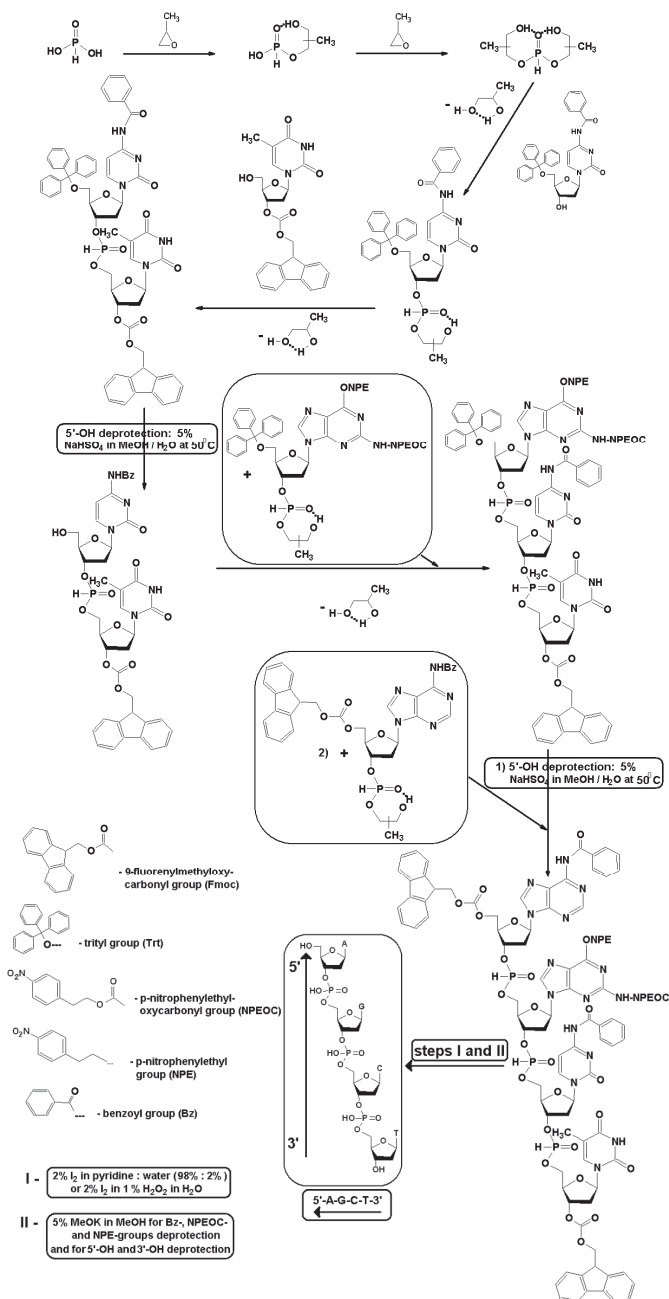
5'-dA-p-dG-p-dC-p-dT-3'-OH: d(AGCT):

Добив: 0,279 гр. (37%). Rf-0.526. (CH₂Cl₂ : MeOH - 9:1), Rf-0.387. (CH₂Cl₂ : MeOH - 9.5:0.5). ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆, 25°C): δ = 11.72(5-CH₃, Thy, Tyd); 35.82 and 35.98(2'-CH₂, 2'-dAdo); 38.48(2'-CH₂, Tyd); 38.86 and 39.06(2'-CH₂, 2'-dCyd); 40.81 and 41.01(2'-CH₂, 2'-dGuo); 62.65 and 62.78(5'-CH₂, 5'-end, 2'-dAdo); 67.31, 67.44 and 67.59(5'-CH₂, 2'-dCyd); 67.63 and 67.77(5'-CH₂, 2'-dTyd); 68.24, 68.37 and 68.52(5'-CH₂, 2'-dGuo); 70.43 and 70.55(3'-CH, 3'-end, Tyd); 75.37, 75.49 and 75.62(3'-CH, 2'-dCyd); 78.09 and 78.21(3'-CH, 2'-dAdo); 78.97 and 79.10(3'-CH, 2'-dGuo); 83.17(1'-CH, 2'-dAdo); 84.16 and 84.36(4'-CH, 2'-dAdo); 84.80(1'-CH, Tyd); 85.14 and 85.34(4'-CH, Tyd); 86.72, 86.92 and 87.12(4'-CH, 2'-dGuo); 87.07, 87.27 and 87.47(4'-CH, 2'-dCyd); 87.94 and 88.06(1'-CH, 2'-dCyd); 88.09 and 88.21(1'-CH, 2'-dGuo); 96.38(5-CH, Cyt, 2'-dCyd); 111.42(5-C, Thy, Tyd); 119.52(5-C, Gua, 2'-dGuo); 120.08(5-C, Ade, 2'-dAdo); 137.40(6-CH, Thy, Tyd); 140.46(8-CH, Ade, 2'-dAdo); 140.86(8-CH, Gua, 2'-dGuo); 142.81(6-CH, Cyt, 2'-dCyd); 150.92(4-C, Ade, 2'-dAdo); 151.36(4-C, Gua, 2'-dGuo); 151.51(2-C, CO, Thy, Tyd); 152.25(2-CH, Ade, 2'-dAdo); 154.12(6-C, Ade, 2'-dAdo); 154.15(2-C, Gua, 2'-dGuo); 157.16(2-C, CO, Cyt, 2'-dCyd); 158.16(6-C, CO, Gua, 2'-dGuo); 166.23(4-C, CO, Thy, Tyd); 166.44(4-C, Gua, 2'-dGuo).

Елементарен анализ: Anal. Calculated for C₃₉H₅₀N₁₅O₂₂P₃: (Mw = 1173,82 g/mol); C-39.91%, H-4.29%, N-17.90%; found: C-39.85%, H-4.37%, N-17.81%. Rt = 7,687 min. Flow rate: 0,8ml/min (CH₃CN : 20mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ buffer - 40:60).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С настоящата работа авторът описва синтеза на тетра-2'-деоксирибонуклеотида d(AGCT) 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. Тъй като пътят на нуклеозидното фосфонилиране е предшестван от киселинно-катализиран процес на отваряне на оксирановия пръстен с участието на Н-фосфоновата (фосфористата киселина), вследствие на това се образува бис-(2-хидроксиизопропил)-Н-фосфонат, явяващ се в случая реактивният фосфонилиращ синтетичен еквивалент. Увеличената електрофилност при Р-атома от Н-фосфонатния синтон се дължи на наличието на две свободни хидроксилни групи на бета-позиция спрямо естерната връзка.



Фиг.2: Схема на стъпков синтез в разтвор на тетрануклеотида d(AGCT) от 3'→5' край, прилагайки модификация на Н-фосфонатната химия, с използване на 5'-защитени 3'-фосфонилирани 2'-деоксирибонуклеозиди като градивни единици. А-аденин; G-гуанин; С-цитозин; Т-тимин

В случая се прилага свойството на 2-ОН групата (разположена на 2-ро място спрямо естерната), да се проявява като електрофилен катализатор, което е съпроводено с напускане на 1,2-диола като нуклеофуг при безводни реакционни условия. Свойството на бис-(2-хидроксиизопропил)-Н-фосфоната е използвано като модел на реакцията, катализирана от големите рибозими (от група I, и група II, рибонуклеаза Р, както и сплайсеозомните ирони). По този начин, чрез провеждането на тези рибозимомиметични реакции би могло да се докаже как са работили рибозимите и *пре*-РНК-ензимите, като първични катализатори при синтеза на жизненоважните молекули в древния РНК-свят.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Videva, V.S., Bairyamov, S.G., Devedjiev, I.T. Bulg. Chem. Commun. 2007, 39, 276.
- [2] Devedjiev, I.T., Bairyamov, S.G., Videva, V.S. Heteroatom Chemistry. 2008, 19, 252.
- [3] Байрямов, S.G., Байрямов, N.G., Даналев, D. L. & Вассилев, N. G. Unpublished results.
- [4] Stanislav Байрямов, Dancho Danalev, Nikolay Vassilev. Proceedings of the 30th European Peptide Symposium, 2009, 1-03-157, 130-131.
- [5] Байрямов, S.G., Научни трудове на Русенския университет, 2010, том 49, серия 9.1, 41 – 48
- [6] Stanislav Байрямов, Dancho Danalev, Nikolay Vassilev. Phosphorus, Sulfur and Silicon and Related Elements. 2011, 186 (2), 338-344.
- [7] Байрямов, S.G., Научни трудове на Русенския университет, 2011, том 50, серия 9.1, 19 – 28
- [8] Байрямов, S.G., Научни трудове на Русенския университет, 2011, том 50, серия 9.1, 39 – 45
- [9] Байрямов, S.G., Научни трудове на Русенския университет, 2012, том 51, серия 9.1, 164 – 168
- [10] Байрямов, S.G. Научни трудове на Русенския университет, 2012, том 51, серия 9.1, 191 – 194
- [11] Байрямов, S.G., Научни трудове на Русенския университет, 2012, том 51, серия 9.1, 220 – 224
- [12] Байрямов, S.G., Научни трудове на Русенския университет, 2013, том 52, серия 10.1, 172 – 177
- [13] Dancho L. Danalev, Stanislav G. Байрямов and Nikolay G. Vassilev. Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium, European Peptide Society, 2014, PEPTIDES' 2014, pp.118-119.
- [14] Stanislav G. Байрямов and Dancho L. Danalev. Proceedings of the 33rd European Peptide Symposium, European Peptide Society, 2014, PEPTIDES' 2014, pp. 219-220.

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.

Докладът е рецензиран