

Особенности синтеза P-NH₂ олигонуклеотидов по адаптированной методике на основе стандартного амидофосфитного протокола

Малова Е.*, Пышная И., Мещанинова М., Пышный Д.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

* malova.ev.an@gmail.com

Ключевые слова: амидофосфатные производные олигодезоксирибонуклеотидов; автоматический синтез; реакция Штаудингера; оптимизация протокола синтеза

Мотивация и цель: В последние десятилетия молекулярная биология и медицинская химия нераздельно связаны с использованием синтетических олигонуклеотидов (ON) [1, 2]. Для изменения нуклеазоустойчивости или эффективности связывания с комплементарными ДНК или РНК особый интерес вызывают модифицированные по сахаро-фосфатному остову ON, в частности фосфат-модифицированные аналоги [3, 4]. Их широкое использование ограничивается возможностями стандартного автоматического твердофазного синтеза. Среди фосфат-модифицированных ON можно выделить N-незамещенные амидофосфатные аналоги, или P-NH₂ олигонуклеотиды. Являясь изоструктурными природным фосфодиэфирным нуклеиновым кислотам, они обладают способностью формировать устойчивые комплексы с комплементарной последовательностью ДНК/РНК при сниженной ионной силе раствора. Однако, планомерное использование P-NH₂ аналогов нуклеиновых кислот в качестве объектов и/или инструментов в молекулярной биологии и биомедицине ограничено сложностью их синтеза. На протяжении около 40 лет ведется поиск эффективных синтетических схем получения P-NH₂ олигонуклеотидов. В большинстве работ за основу взят H-фосфонатный протокол синтеза ON, включающий этап окислительного амидирования (напр., [5, 6]). Однако подходы, с использованием H-фосфонатной химии, не показали высоких выходов целевого продукта. Гораздо позднее был предложен метод постсинтетической модификации боранфосфонатных олигодезоксинуклеотидов посредством йод-зависимого замещения при атоме фосфора [7]. Подход, характеризуется высокими выходами, но основан на использовании специфической химии, в настоящее время коммерчески недоступной. Несмотря на количество работ, посвященных синтезу и исследованию свойств P-NH₂ олигонуклеотидов, дальнейшего развития данные аналоги не получили. Целью данной работы являлось создание адаптированной методики получения P-NH₂ аналогов, основанной на амидофосфитном протоколе синтеза ON, в качестве более простой и доступной альтернативы существующим подходам.

Методы и алгоритмы: Для синтеза P-NH₂ аналогов за основу был взят стандартный, широко используемый в настоящее время протокол амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов. Введение P-NH₂ модификации осуществляли на стадии окисления с использованием азиды, (9-флуоренил)-метоксикарбонилиазида (FmocN₃), по реакции Штаудингера. Последующее

формирование N-незамещенного амидофосфатного фрагмента в составе олигонуклеотида осуществляли посредством удаления Fmoc-группы при обработке сильным основанием. Полученный по оптимизированной методике набор моно- и бис-модифицированных октамерных олигонуклеотидов использовали для исследования термодинамических свойств P-NH₂ аналогов в составе комплементарных НК-комплексов в условиях пониженной ионной силы раствора методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала.

Результаты: В ходе оптимизации методики первоначальное предположение о возможности постсинтетического формирования N-незамещенного амидофосфата было опровергнуто в связи с лабильностью промежуточного Fmoc-N-замещенного фрагмента в условиях синтетического цикла. В связи с чем, в разрабатываемый протокол была внедрена дополнительная стадия отщепления флуоренильной группы, следующая за каждой стадией окисления по реакции Штаудингера. Указанная последовательность стадий позволила достигнуть не менее 80 % конверсии для каждого цикла модификации. Отсутствие количественной конверсии в модифицированных фрагмент связано с долей неполного окисления по реакции Штаудингера. В настоящее время проводится поиск причин, препятствующих полному окислению фосфитного компонента органическим азидом. Продемонстрировано отсутствие явной зависимости выхода P-NH₂-олигонуклеотидов как от положения P-NH₂-звена в цепи, так и от нуклеозидного состава модифицируемого фрагмента. С помощью разработанного протокола синтезирован набор моно- и бис-модифицированных октадезоксирибонуклеотидов для детального исследования термической стабильности комплементарных ДНК/ДНК комплексов в различных буферных условиях. Значения температур плавления в условиях высокой ионной силы раствора (1 М NaCl, pH 7.2) согласуются с ранее полученными в литературе [6] и свидетельствуют о снижении термостабильности комплекса ДНК в среднем на 1.3 °С при введении одного P-NH₂-звена. При уменьшении ионной силы раствора дестабилизирующий эффект P-NH₂-модификации достоверно снижается, что дополнительно подтверждает электронейтральный статус вводимого амидофосфатного звена.

Выводы: Разрабатываемая методология для синтеза P-NH₂ аналогов олигонуклеотидов на основе стандартного амидофосфитного протокола синтеза олигонуклеотидов позволяет получать с хорошими выходами моно- и бис-модифицированные последовательности ON. Введение большего числа модифицированных звеньев сопряжено с большими потерями олигонуклеотидного материала и требует дополнительной оптимизации синтетического процесса. Результаты исследования термической стабильности комплексов с P-NH₂ модифицированными цепями продемонстрировало потенциал использования данных аналогов в ситуациях подразумевающих применение растворов с пониженной ионной силой раствора.

Финансирование: Исследование поддержано Российским научным фондом (№ 21-64-00017).

Features of the synthesis of P-NH₂ oligonucleotides using an adapted method based on the standard phosphoramidite protocol

Malova E.*, Pyshnaya I., Meschaninova M., Pyshnyi D.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* malova.ev.an@gmail.com

Key words: phosphoramidate derivatives of oligodeoxyribonucleotides; automated synthesis; Staudinger reaction; synthesis protocol optimization

Motivation and Aim: In recent decades, molecular biology and medicinal chemistry have been inextricably linked to the use of synthetic oligonucleotides (ON) [1, 2]. To modify nuclease stability or binding efficiency to complementary DNA or RNA, sugar-phosphate modified ON, in particular phosphate-modified analogs, are of particular interest [3, 4]. Their wide application is limited by the possibilities of standard automated solid-phase synthesis. Among phosphate-modified ON we can distinguish N-unsubstituted phosphoramidate analogs, or P-NH₂ oligonucleotides. Being isostructural with respect to natural phosphodiester nucleic acids, they have the ability to form stable complexes with complementary DNA/RNA sequence at reduced ionic strength of solution. However, the systematic use of P-NH₂-analogs of nucleic acids as objects and/or tools in molecular biology and biomedicine is limited by the complexity of their synthesis. The search for efficient synthetic schemes for the preparation of P-NH₂ oligonucleotides has been going on for about 40 years. In most studies, the H-phosphonate protocol for the synthesis of ON including an oxidative amidation step has been taken as a basis (e. g., [5, 6]). However, approaches using H-phosphonate chemistry did not show high yields of the target product. Much later, a method for the post-synthetic modification of borphosphonate oligodeoxynucleotides by iodine-dependent substitution at the phosphorus was proposed [7]. The approach is characterized by high yields, but is based on the use of specific chemistry, currently commercially unavailable. Despite the large number of works devoted to the synthesis and study of the properties of P-NH₂ oligonucleotides, these analogs have not been further developed. The aim of this work was to develop an adapted methodology for the preparation of P-NH₂ analogs based on the ON phosphoramidite synthesis protocol as a simpler and more affordable alternative to existing approaches.

Methods and Algorithms: For the synthesis of P-NH₂-analogs, a standard, currently widely used protocol for the phosphoramidite synthesis of oligonucleotides was taken as a basis. The introduction of the P-NH₂ modification was carried out in the oxidation step using the azide, (9-fluorenyl)-methoxycarbonylazide (FmocN₃), via the Staudinger reaction. Subsequent formation of an N-unsubstituted phosphoramidate moiety in the oligonucleotide was accomplished by removal of the Fmoc group by strong base treatment. A set of mono- and bis-modified octameric oligonucleotides obtained by the optimized method was used to study the thermodynamic properties of P-NH₂ analogues as part of complementary nucleic acid complexes under conditions of reduced ionic strength of solution by thermal denaturation with optical signal registration.

Results: During the optimization of the methodology, the initial assumption about the possibility of post-synthetic formation of N-unsubstituted phosphoramidate was refuted

due to the lability of the intermediate Fmoc-N-substituted fragment under synthetic cycle conditions. Therefore, an additional cleavage step of the fluorenyl group following each oxidative step of the Staudinger reaction was introduced into the developed protocol. The above sequence of steps allowed achieving a conversion of at least 80 % for each modification cycle. The lack of quantitative conversion in the modified fragments is due to the fraction of incomplete oxidation by the Staudinger reaction. The reasons preventing the complete oxidation of the phosphite component by the organic azide are searched for. It is shown that there is no obvious dependence of the yield of P-NH₂-oligonucleotides both on the position of the P-NH₂ link in the chain and on the nucleoside composition of the modified fragment. Using the developed protocol, a set of mono- and bis-modified octadeoxyribonucleotides was synthesized for a detailed study of the thermal stability of complementary DNA/DNA complexes under various buffer conditions. The values of melting temperatures under conditions of high ionic strength of the solution (1 M NaCl, pH 7.2) agree with those previously obtained in the literature [6] and indicate an average decrease in the thermostability of the DNA complex by 1.3 °C upon introduction of a single P-NH₂ linkage. When the ionic strength of the solution is reduced, the destabilizing effect of the P-NH₂-modification decreases significantly, which further confirms the electroneutral status of the introduced phosphoramidate linkage.

Conclusion: The developed methodology for the synthesis of P-NH₂-analogs of oligonucleotides based on the standard phosphoramidite protocol for oligonucleotide synthesis allows to obtain mono- and bis-modified ON-sequences with good yields. The introduction of a larger number of modified links is associated with large losses of oligonucleotide material and requires additional optimization of the synthetic process. The results of the study of thermal stability of complexes with P-NH₂-modified chains showed the possibility of using these analogs in situations involving the use of solutions with reduced ionic strength of the solution.

Funding: The study is supported by Russian Science Foundation (No. 21-64-00017).

Список литературы/References

1. Egli M., Manoharan M. Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(6):2529-2573
2. Green M.R., Sambrook J. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Protoc.* 2019;2019(6):436-456
3. Gołębiewska J., Stawinski J. Boranephosphonates. Unraveling chemistry of the P-BH₃ functional group. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat Elem.* 2021;197(5-6):480-486. doi 10.1080/10426507.2021.1990922
4. Stetsenko D., Pyshnyi D., Kupryushkin M. Modified oligonucleotides and methods for their synthesis. Patent WO2016028187A1. 2016
5. Iyer R.P., Devlin T., Habus I., Yu D., Johnson S., Agrawal S. Oligonucleoside phosphoramidates from N-pent-4-enoyl nucleoside H-phosphonates. *Tetrahedron Lett.* 1996;37(10):1543-1546
6. Peyrottes S., Vasseur J.J., Imbach J.L., Rayner B. Replacement of the phosphodiester backbone of oligodeoxynucleotide analogues by non-ionic phosphoramidate (P-NH₂). *Nucleosides Nucleotides.* 1997;16(7-9):1551-1554
7. Paul S., Roy S., Monfregola L., Shang S., Shoemaker R., Caruthers M.H. Oxidative substitution of boranephosphonate diesters as a route to post-synthetically modified DNA. *J Am Chem Soc.* 2015;137(9):3253-3264