



**UNIWERSYTET
IM. A. MICKIEWICZA
W POZNANIU
WYDZIAŁ CHEMII**

Michał Gładysz

**Acykliczne analogi oligonukleotydów otrzymywane metodą
chemii „Click”**

Praca przedstawiona
Radzie Naukowej Wydziału Chemii
Uniwersytetu im. A. Mickiewicza
celem uzyskania stopnia naukowego
doktora nauk chemicznych

Promotor:
Prof. UAM dr hab. Jan Milecki

Poznań 2015

*Panu Profesorowi Janowi Mileckiemu
serdecznie dziękuję za wsparcie oraz
przekazaną wiedzę i umiejętności*

*Wszystkim Pracownikom
Pracowni Spektrochemii Organicznej oraz
Zespołu Dydaktycznego Chemii Organicznej i Bioorganicznej
dziękuję za okazaną pomoc i życzliwą atmosferę*

Summary of the doctoral dissertation:

Acyclic oligonucleotides analogues obtained via Click Chemistry

Copper(I) Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition strongly influenced on DNA-based synthesis of novel oligonucleotides derivatives. Possibility of creating new kind of chain linkage, 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole replacement of native phosphodiester, devoid of negative charge and nuclease resistant, appears to be extremely interesting. This allows to design new class of nucleic acid analogues, similar in its DNA-mimicking properties to PNA's.

The aim of presented doctoral dissertation was to develop a synthesis pathway for azide and alkyne building blocks, which were used in synthesis of acyclic nucleosides analogues active in CuAAC reaction. The project was based on acyclic nucleoside mimics structures in order to simplify synthesis chain and take advantage of only necessary reactive sites. Good results were achieved with synthesis of adenine acyclic analogue with alkyne as well as with azide moiety, and thymidine acyclic analogue with azide moiety. Then CuAAC reaction was carried out, resulting in two acyclic dinucleotide analogues bearing triazole linkages. In order to apply synthesised dinucleotide analogues in solid-phase phosphoramidite oligonucleotide automatic synthesis, both of them were functionalized with DMT protecting group and phosphoramidite moiety. This provided dinucleotides analogues which were building blocks suitable to place at the 5' end of elongated oligodeoxynucleotide chain, as well in the middle of synthesized DNA chain. Two series of 12-mer oligodeoxynucleotides containing both types of acyclic dinucleotide modifications at the 5'-end or in the middle of the strand were synthesized. Products were purified with HPLC or electrophoresis, and their influence on DNA duplex stability was measured, by thermodynamic analysis. In the case of triazole linkage between rigid ribose moieties, the length of the triazole linker and the six-bond backbone periodicity has a crucial influence on duplex stability. DNA duplex thermodynamic analysis allowed to measure the influence of an acyclic backbone with triazole linker on stability of 12-mer oligodeoxynucleotides, depending on localization of modification in synthesized DNA chains.

Selected substrates were also analyzed as potential anticancer agents (their IC₅₀ parameter was measured). All of structures were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR or MALDI TOF MS analysis.

SPIS TREŚCI

I. WSTĘP	5
II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	9
III. CZĘŚĆ LITERATUROWA	11
1. CHEMIA "CLICK"	11
2. ZASTOSOWANIE CHEMII "CLICK" W MODYFIKOWANIU KWASÓW NUKLEINOWYCH	14
2.1. Modyfikacje części zasady azotowej kwasu nukleinowego	15
2.2. Modyfikacje części cukrowej kwasu nukleinowego.....	30
2.3. Modyfikacje szkieletu kwasu nukleinowego	34
2.4. Biosprzężenia	40
IV. DYSKUSJA WYNIKÓW	41
1. SYNTEZA ALKINOWEGO BLOKU BUDULCOWEGO.....	41
1.1. Synteza 2-fenylo-1,3-dioksan-5-olu (44).....	41
1.2. Synteza 2-fenylo-5-(prop-2-ynyl-1-oksy)-1,3-dioksanu (46).....	42
1.3. Synteza 2-(prop-2-yn-1-oksy)-propan-1,3-diolu (49).....	43
1.4. Synteza 3-dimetoksytrytylo-2-(prop-2-yn-1-oksy)-propan-1-olu (50).....	44
1.5. Synteza 2-(prop-2-yn-1-oksy)-3-(<i>tert</i> -butylodifenylosililo)-propan-1-olu (52).....	46
1.6. Synteza 2-(prop-2-yn-1-oksy)-3-(<i>tert</i> -butylodifenylosililo)-1-tosylo-propanu (54)	47
2. SYNTEZA AZYDOWEGO BLOKU BUDULCOWEGO	49
2.1. Synteza 2-(azydometylo)oksiranu (55).....	49
3. WYKORZYSTANIE OTRZYMANYCH BLOKÓW BUDULCOWYCH W SYNTEZIE ACYKLICZNYCH ANALOGÓW NUKLEOZYDÓW.....	51
3.1. Synteza acyklicznych analogów nukleozydów w reaktorze mikrofalowym.	52

3.2. Synteza acyklicznych analogów nukleozydów metodą klasyczną.....	53
4. REAKCJA TYPU „CLICK” I PRZYGOTOWANIE SUBSTRATÓW DO AUTOMATYCZNEJ SYNTEZY OLIGODEOKSYNUKLEOTYDÓW.....	56
4.1. Odblokowanie alkinowego analogu nukleozydowego	56
4.2. Trytylowanie odblokowanego alkinowego analogu nukleozydu.....	57
4.3. Sprzęganie typu „Click” pomiędzy alkinem i azydkiem	58
4.4. Wprowadzenie układu amidofosforynowego do cząsteczki dinukleotydu.....	61
5. BADANIA AKTYWNOŚCI PRZECIWNOWOTWOROWEJ	63
6. ZAUTOMATYZOWANA SYNTEZA OLIGODEOKSYNUKLEOTYDÓW NA PODŁOŻU STAŁYM	66
6.1. Synteza nici wzorcowych 71C i 72C	69
6.2. Synteza nici modyfikowanych na końcu 5’ – 71A i 72A	69
6.3. Synteza nici modyfikowanych w środku łańcucha (pozycja 6 i 7) – 71B i 72B	71
6.4. Synteza nici komplementarnych 71 i 72	72
6.5. Synteza nici modyfikowanych w środku i na końcu 5’ łańcucha – 71D i 72D	73
7. ANALIZA I ROZDZIAŁY HPLC OTRZYMANYCH OLIGODEOKSYNUKLEOTYDÓW	75
8. POMIARY TEMPERATUR TOPNIENIA I PEŁNEJ TERMODYNAMIKI DUPLEKSÓW.....	78
8.1. Analiza dupleksów wzorcowych – pozbawionych modyfikacji.....	78
8.2. Analiza dupleksów z modyfikacją na końcu 5’ łańcucha	79
8.3. Analiza dupleksów z modyfikacją w środku łańcucha	80
V. PODSUMOWANIE.....	81
VI. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	85

1. UWAGI OGÓLNE	85
1.1. Odczynniki	85
1.2. Rozpuszczalniki organiczne.....	85
1.3. Chromatografia cienkowarstwowa i kolumnowa	86
1.4. Badania aktywności biologicznej.....	86
1.5. Zautomatyzowana synteza DNA	87
1.6. Wysokosprawna chromatografia cieczowa.....	87
1.7. Pomiary temperatur topnienia i pełnej termodynamiki dupleksów	88
1.8. Pomiary spektralne.....	88
2. SYNTEZA ALKINOWEGO BLOKU BUDULCOWEGO.....	90
2.1. Synteza 2-fenylo-1,3-dioksan-5-olu (44).....	90
2.2. Synteza 2-fenylo-5-(prop-2-ynyl-1-oksy)-1,3-dioksanu (46)	90
2.3. Synteza 2-(prop-2-ynyl-1-oksy)-propan-1,3-diolu (49).....	91
2.4. Synteza 3-dimetoksytrytylo-2-(prop-2-ynyl-1-oksy)-propan-1-olu (50).....	91
2.5. Synteza 2-(prop-2-ynyl-1-oksy)-3-(<i>tert</i> -butylodifenylosililo)-propan-1-olu (52).....	92
2.6. Synteza 2-(prop-2-ynyl-1-oksy)-3-(<i>tert</i> -butylodifenylosililo)-1-tosylo-propanu (54)	93
3. SYNTEZA AZYDOWEGO BLOKU BUDULCOWEGO	95
3.1. Synteza 2-(azydometylo)oksiranu (55).....	95
4. PROCEDURA SYNTEZY ACYKLICZNYCH ANALOGÓW NUKLEOZYDOWYCH	96
4.1. Procedura syntezy w reaktorze mikrofalowym.....	96
4.2. Procedura syntezy klasycznej	97
4.3. Dane spektralne otrzymanych acyklicznych analogów nukleozydów.....	98

5. MODYFIKACJA ZASAD PIRYMIDYNOWYCH.	99
5.1. Synteza N ⁴ -benzoiocytozyny (61)	99
5.2. Synteza N ³ -benzoiotyminy (62).....	99
6. REAKCJA TYPU „CLICK” I PRZYGOTOWANIE SUBSTRATÓW DO AUTOMATYCZNEJ SYNTEZY OLIGODEOSKYNUKLEOTYDÓW.	100
6.1. Odblokowanie alkinowego analogu nukleozydowego (63).....	100
6.2. Trytylowanie odblokowanego alkinowego analogu nukleozydu (64).....	101
6.3. Procedura sprzęgania typu „Click” pomiędzy alkinem i azydkiem.....	101
7. BADANIA AKTYWNOŚCI BIOLOGICZNEJ	106
7.1. Zastosowane kultury bakteryjne	106
7.2. Analiza cytotoksyczności In vitro.....	106
8. ZAUTOMATYZOWANA SYNTEZA DNA	108
9. ANALIZA I ROZDZIAŁY HPLC OTRZYMANYCH OLIGODEOKSYNUKLEOTYDÓW	111
10. ANALIZA I ROZDZIAŁY ELEKTROFORETYCZNE OLIGODEOKSYNUKLEOTYDÓW 71D I 72D	115
11. POMIARY TEMPERATUR TOPNIENIA I TRWAŁOŚCI TERMODYNAMICZNEJ DUPEKSÓW.....	116
VII. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	119
VIII. LITERATURA.....	123

I. Wstęp

Życie zapisane jest w genach. W niemal wszystkich żywych organizmach magazynem informacji genetycznej jest DNA – kwas 2'-deoksyrybonukleinowy. Układ podwójnej helisy dwóch polimerycznych komplementarnych nici, zbudowany jest z mniejszych elementów zwanych nukleotydami. Każdy nukleotyd składa się z heterocyklicznej zasady azotowej (purynowej – adeniny lub guaniny, lub pirymidynowej – cytozyny lub tyminy), połączonej z pierścieniem cukru (pentozy – 2'-deoksy-D-rybofuranozy) oraz reszty fosforanowej. Wiadomość genetyczna zapisana jest w sekwencji nukleotydów połączonych ze sobą wiązaniem fosfodiesterowym. Ta cegiełka budulcowa, jeśli pozbawi się ją reszty fosforanowej, nazywana jest nukleozydem. Większość nukleozydów w duplesie DNA przyjmuje konformację *anti* wiązania N-glikozydowego, jednocześnie charakteryzując się konfiguracją β anomerycznego atomu węgla. Wszystkie te czynniki wpływają na właściwy układ sekwencji DNA, która jest interpretowana przez RNA sprawujące transkrypcyjną oraz translacyjną rolę. Przy każdym podziale komórkowym musi zostać zreplikowany pełny genom. Replikacja to niespotykany dokładny proces, podczas którego sporadycznie zdarzają się pomyłki i zmiana sekwencji w tworzonej kopii DNA. Uszkodzenie DNA może również być spowodowane czynnikami zewnętrznymi, takimi jak:

- substancje chemiczne (np. składniki dymu tytoniowego);
- promieniowanie jonizujące;
- światło ultrafioletowe.

Jeśli mutacje nie zostaną wykryte i naprawione przez organizm gospodarza, mogą zostać przekazane następnym pokoleniom, co ostatecznie prowadzi do zmian w funkcjonowaniu białek i między innymi powstawania nowotworów.

DNA posiada zdolność naprawy według kilku różnych mechanizmów, w zależności od rodzaju występujących uszkodzeń. Niestety nie zawsze są one skuteczne i nienaprawiona mutacja może przetrwać do następnego cyklu replikacyjnego. W zależności od rodzaju mutacji, może ona zostać wpisana na stałe w genom gospodarza. Może mieć to negatywny wpływ na procesy transkrypcji oraz translacji, powodując powstawanie białek nieaktywnych, jak również szkodliwych w procesach metabolicznych organizmu. Procesy replikacji DNA, transkrypcji oraz translacji zachodzą zarówno w komórkach zdrowych, jak i w komórkach

nowotworowych. Chęć pokonania nowotworów, choroby cywilizacyjnej XXI wieku, stała się silnikiem napędowym dla chemii medycznej, poszukiwania nowych związków chemicznych będących aktywnymi lekami w terapii przeciwnowotworowej. Małe cząsteczki mają zdolność wchodzenia w interakcje z uszkodzoną nicią DNA na kilka sposobów:

- poprzez wiązanie w małej bruzdzie DNA;
- stabilizację dupleksu przez wniknięcie między parę komplementarnych zasad;
- tworzenie wiązań kowalencyjnych z nukleofilowymi grupami funkcyjnymi DNA przez silnie elektrofilowe cząsteczki;
- rozrywanie struktury łańcuchowego DNA.

Leki będące przedstawicielami powyższych grup, różnią się od siebie strukturalnie oraz mechanizmem działania [1].

Inną grupą leków, mniej agresywnych a jednocześnie wysoce selektywnych i dobrze przyswajanych, są analogi nukleozydów. Związki tego typu mogą być tworzone na wiele różnych sposobów, w zależności od rodzaju wprowadzanej modyfikacji, jak również w zależności od tego czy modyfikacji ulega część cukrowa czy zasadowa nukleozydu. Po roku 2001 zaczęto wykorzystywać technikę chemii „Click” do tworzenia nowych pochodnych i efektywnego powiększania biblioteki związków farmakologicznie czynnych. Większość powstających prac dotyczy modyfikacji części zasadowej nukleozydów, rzadsze są doniesienia związane z modyfikacją polianionowej struktury szkieletu oligonukleotydowego. Do tej pory w Pracowni Spektrochemii Organicznej prowadzone były głównie badania dotyczące znakowania izotopowego oligonukleotydów. W późniejszych pracach zespołu przebadana została możliwość znakowania fluorescencyjnego, za pomocą Luminarozyny – która może zostać wprowadzona do oligonukleotydów, za pomocą automatycznej syntezy na podłożu stałym. Przeprowadzono także próby znalezienia takich soli N-(puryn-6-yl)pirydynowych, w których pierścień rybozowy został zastąpiony acyklicznym podstawnikiem, umożliwiającym dalszą modyfikację i przyłączenie do struktur o znaczeniu biologicznym.

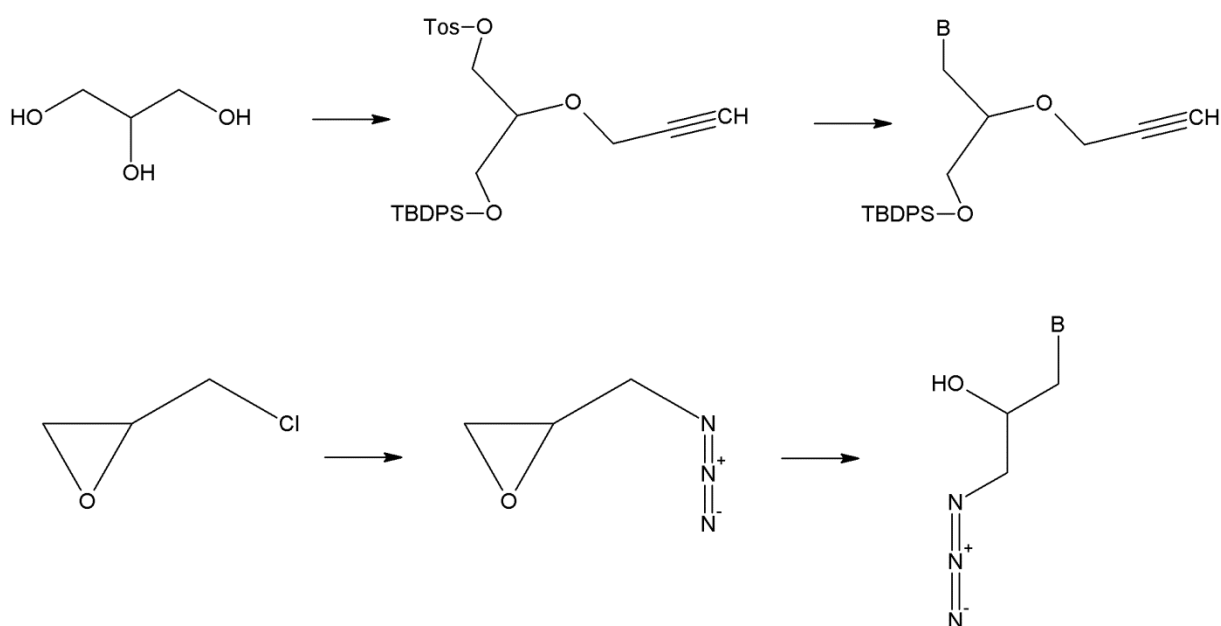
W mojej pracy badawczej postanowiłem sprawdzić wpływ acyklicznych analogów nukleozydów, które w toku badań wprowadziłem do struktury dwunastomeru DNA, na stabilność oligomeru. Chemia „Click” daje możliwość zastosowania substytutu dla wiązania fosfodiesterowego, w postaci elektrycznie obojętnej i stabilnej w warunkach fizjologicznych układu triazolowego. W prowadzonych na Świecie badaniach, udało się

utworzyć stabilny dziesięciomer (połączony takimi wiązaniami) zbudowany wyłącznie z reszt tymidyny [2], jak również wykazać korzystny wpływ połączenia międzynukleotydowego o łącznej długości 6 wiązań [3]. Nie rozpatrywano natomiast wpływu uproszczenia cząsteczki poprzez zamianę części rybozowej na acykliczny podstawnik. Podjąłem próbę wprowadzenia łącznika triazolowego do cząsteczki dinukleotydu w oparciu o acykliczny podstawnik, z jednoczesnym wydłużeniem połączenia międzynukleotydowego. Zsyntetyzowane analogi dinukleotydów wykorzystałem w procesie zautomatyzowanej syntezy oligodeoksynukleotydów na podłożu stałym, otrzymując 12-mery o takiej samej sekwencji, ale zmienionym położeniu wprowadzonej modyfikacji. Badania termodynamiki dla dupleksów DNA pozwoliły ocenić jaki wpływ na trwałość łańcucha ma wprowadzona przeze mnie modyfikacja.

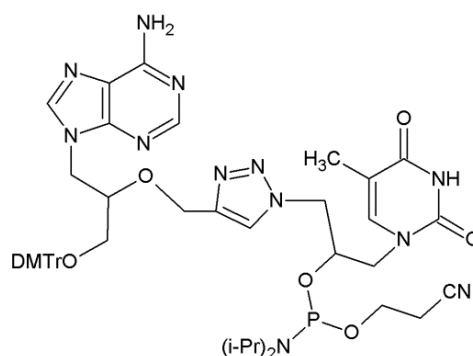
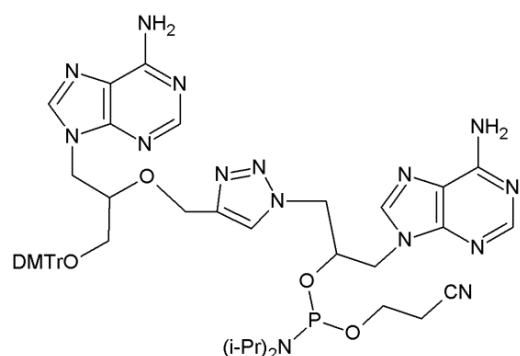
Badania nad tą klasą analogów otwierają możliwość prowadzenia dalszych prób i doboru właściwych modyfikacji w celu zwiększenia aktywności w terapii antysensownymi oligonukleotydami. Terapia tego typu umożliwia zablokowanie wirusowego materiału genetycznego przed dostaniem się do komórek gospodarza oraz umożliwia jego całkowitą eliminację. Z tego względu jest to bardzo interesujący i dający szerokie możliwości terapeutyczne, kierunek badań biologiczno-chemicznych.

II. Założenia i cel pracy

Celem, jaki postawiłem w pierwszym etapie mojej pracy badawczej, było opracowanie syntezy acyklicznych bloków budulcowych, posiadających podstawnik alkinowy lub azydkowy, aktywnych w reakcji typu „Click” z utworzeniem układu triazolowego. Założyłem, że wprowadzenie acyklicznej struktury imitującej pierścień cukrowy w cząsteczce nukleozydu, będzie dużym ułatwieniem, eliminującym konieczność stosowania złożonych blokad. Synteza pochodnej alkinowej była pięcioetapowa i wymagała rozpatrzenia strategii stosowania różnych grup ochronnych. Synteza pochodnej alkinowej została możliwie, maksymalnie uproszczona. Otrzymane bloki budulcowe poddałem próbom sprzęgania z zasadami purynowymi i pirymidynowymi w reakcji N-alkilowania.



Kolejnym celem mojej pracy było przeprowadzenie reakcji cykloaddycji katalizowanej jonami miedzi(I) pomiędzy alkinem i azydkiem (CuAAC), a następnie taka modyfikacja cząsteczek uzyskanych dinukleotydów, żeby wykazywały jak największą aktywność podczas syntezy oligodeoksynukleotydów metodą automatycznej syntezy DNA na podłożu stałym. W czterech etapach uzyskałem analogi dinukleotydów połączonych układem triazolowym, których aktywność i stabilność porównywałem w dalszej syntezie.

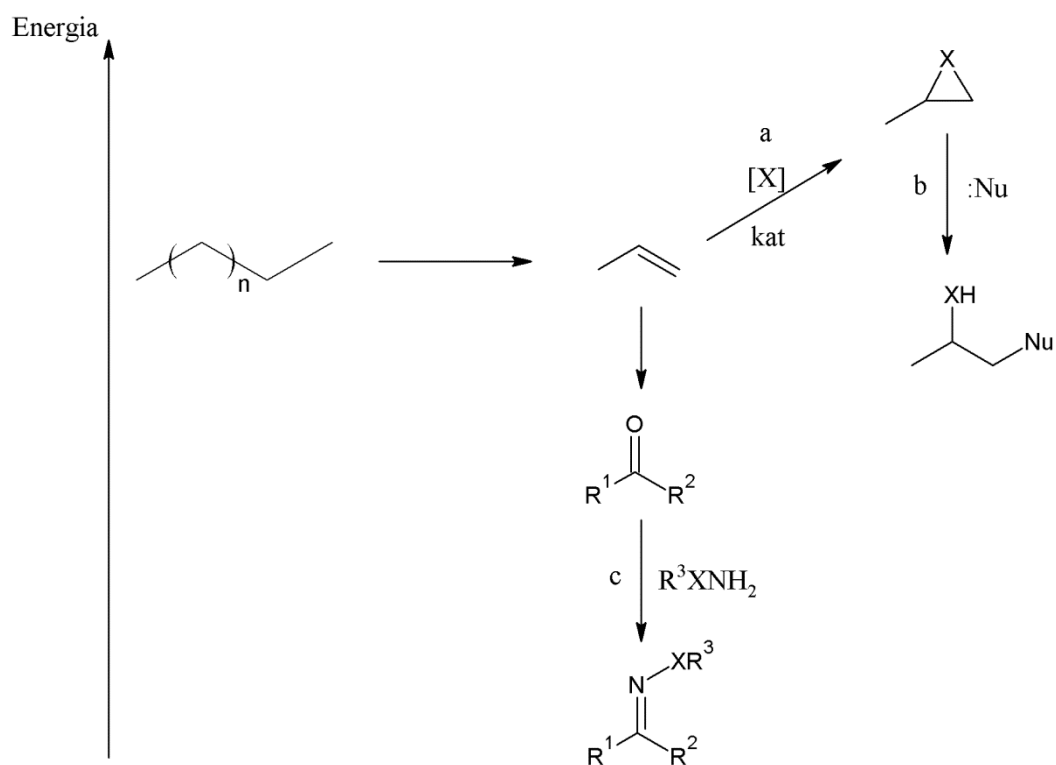


Ostatnim celem moich badań syntetycznych było utworzenie łańcuchów 12-merów DNA zawierających modyfikowany analog acyklicznego dinukleotydu na końcu-5', lub w środku łańcucha. Zgodnie z sugestiami literaturowymi, acykliczna modyfikacja o długości połączenia większej niż sześć wiązań, powinna mieć destabilizujący wpływ na trwałość łańcucha [3]. W ostatnim etapie mojej pracy, przeprowadziłem pomiary temperatur topnienia dupleksów modyfikowanych acyklicznymi analogami w celu potwierdzenia postawionej tezy. Obserwowałem wpływ położenia modyfikowanego dinukleotydu na trwałość dupleksów DNA.

III. Część literaturowa

1. Chemia "Click"

Od odkrycia przez profesorów Meldala i Sharplessa w 2001 roku, katalitycznego wpływu jonów miedzi (I) na reakcje 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena, minęło już prawie 15 lat. Reakcja CuAAC (Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition) stała się klasycznym przykładem reakcji typu "Click" (**Rysunek 1**).



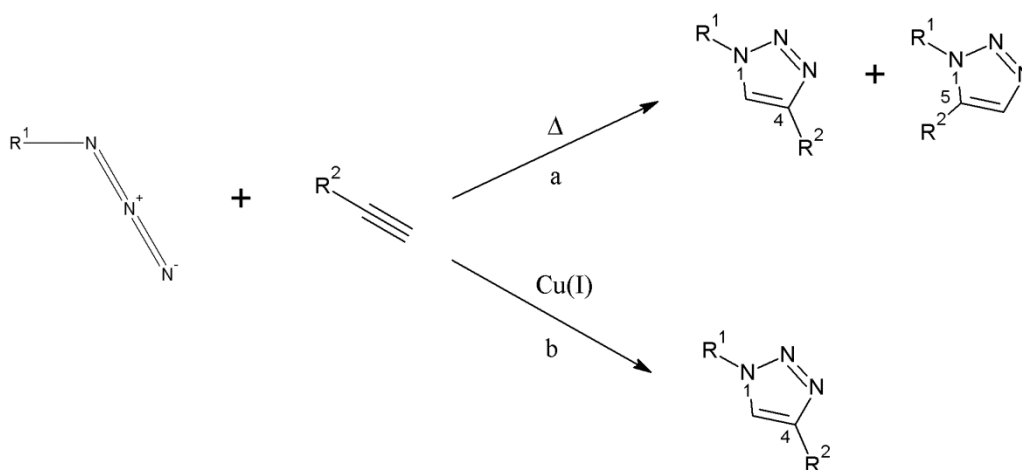
Rys.1 Inne reakcje typu "Click" - (a) Reakcje addycji do wiązania podwójnego, (b) nukleofilowe otwarcie naprężonego pierścienia i (c) reakcje typu niealdolowego z karbonylem [4]

Największą zaletą reakcji tego typu jest ich różnorodność, szybkość zajścia, prostota prowadzenia reakcji i szeroki wachlarz zastosowań [5-8]. Ta właśnie reakcja, pomiędzy azydkiem i terminalnym alkinem, stała się kluczem do produkcji nowych materiałów [9,10]

oraz bibliotek związków o potencjalnej aktywności biologicznej [6]. Reakcja CuAAC może być stosowana w biotransformacji żywych komórek ze względu na możliwość wielokierunkowych modyfikacji warunków jej prowadzenia, wysoką wydajność zachodzącego sprzężania azydku z alkinem i fizjologiczną bierność substratów reakcji [11]. Nie bez znaczenia jest również kontrola regio- jak i stereospecyficzności triazolowego produktu [4]. Ponadto na korzyść stosowania metody CuAAC wpływają następujące cechy:

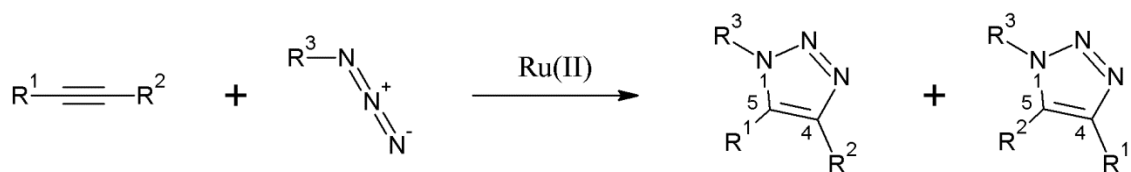
- Grupy alkinowe i azydkowe mogą zostać przyłączone do biocząsteczek bez istotnego zaburzenia ich biofizycznych właściwości.
- Azydki i nieaktywne alkiny są praktycznie całkowicie niereaktywne względem grup funkcyjnych naturalnie występujących w kwasach nukleinowych czy białkach, reagują tylko ze sobą.
- Układ jednostki triazolowej jest bardzo stabilny i nie wykazuje toksyczności.

W przypadku reakcji pomiędzy azydkiem i terminalnym alkinem (**Schemat 1**) inicjowanej termicznie, czas reakcji ulega znacznemu wydłużeniu i otrzymuje się mieszaninę regioizomerów 1,4- i 1,5-dipodstawionych 1,2,3-triazoli. Kataliza jonami miedzi(I) powoduje zwiększenie szybkości reakcji 10^6 razy oraz regioselektywny jej przebieg do produktu 1,4-dipodstawionego 1,2,3-triazolu [8].



Schemat 1 Reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddykcji Huisgena inicjowana termicznie (a) oraz katalizowana jonami miedzi(I) (b) [12]

W przypadku reakcji katalizowanej związkami kompleksowymi rutenu(II) reakcja terminalnego alkinu z azydkiem również przebiega regioselektywnie (**Schemat 2**). Produktem reakcji RuAAC (Ruthenium Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition) jest 1,5-dipodstawiony 1,2,3-triazol, możliwa jest również reakcja cykloaddycji między azydkiem i alkinem wewnętrznym, która prowadzi do 1,4,5-tripodstawionych 1,2,3-triazoli. Reakcje tego typu zachodzą szybko i z dużą wydajnością [13-15].



Schemat 2 Otrzymywanie 1,4,5-tripodstawionych 1,2,3-triazoli w obecności kompleksów rutenu (II)

2. Zastosowanie Chemii "Click" w modyfikowaniu kwasów nukleinowych

W toku poszukiwań nowych farmaceutyków i narzędzi biotechnologicznych, przeprowadza się liczne i wielokierunkowe modyfikacje kwasów nukleinowych i ich oligomerów. W przypadku oligonukleotydów modyfikacje mogą służyć osłabieniu, niektórych kłopotliwych cech wynikających z ich budowy- na przykład polianionowej struktury szkieletu oraz ich podatności do rozszczepiania przez nukleazy [16]. Wprowadzenie modyfikacji może spowodować pojawienie się nowych zastosowań biologicznych cząsteczki kwasu nukleinowego. Związki tej klasy znajdują zastosowania w diagnostyce molekularnej, między innymi do syntezy mikromacierzy DNA [17-19] , sond molekularnych [20,21], antysensownych oligonukleotydów (ASO - antisense oligonucleotide) [22,23] i krótkich fragmentów dwuniciowego RNA służących wyciszeniu ekspresji genów (siRNA - short-interfering RNA) [24-26]. Modyfikacje kwasów nukleinowych są wciąż projektowane, syntezowane i badane jako substancje aktywne w terapiach przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych, jak i substancje regulujące ekspresję genów. Przeciwwirusowe analogi nukleozydów (ANA - antiviral nucleoside analogue) i antysensowne oligonukleotydy są handlowo dostępne i stosowane do zwalczania chorób wirusowych oraz ekspresji wadliwych genów w chorych komórkach [27,28]. Natomiast badania nad efektywnością i możliwością zastosowania siRNA w celach farmaceutycznych nadal trwają [29-32]. Innymi przykładami zastosowania biologicznie aktywnych pochodnych kwasów nukleinowych jest otrzymywanie syntetycznych rybozymów [33], unikalnych aptamerów [34] i oligonukleotydów formujących potrójną nić (TFO - triplex forming oligonucleotides) [35].

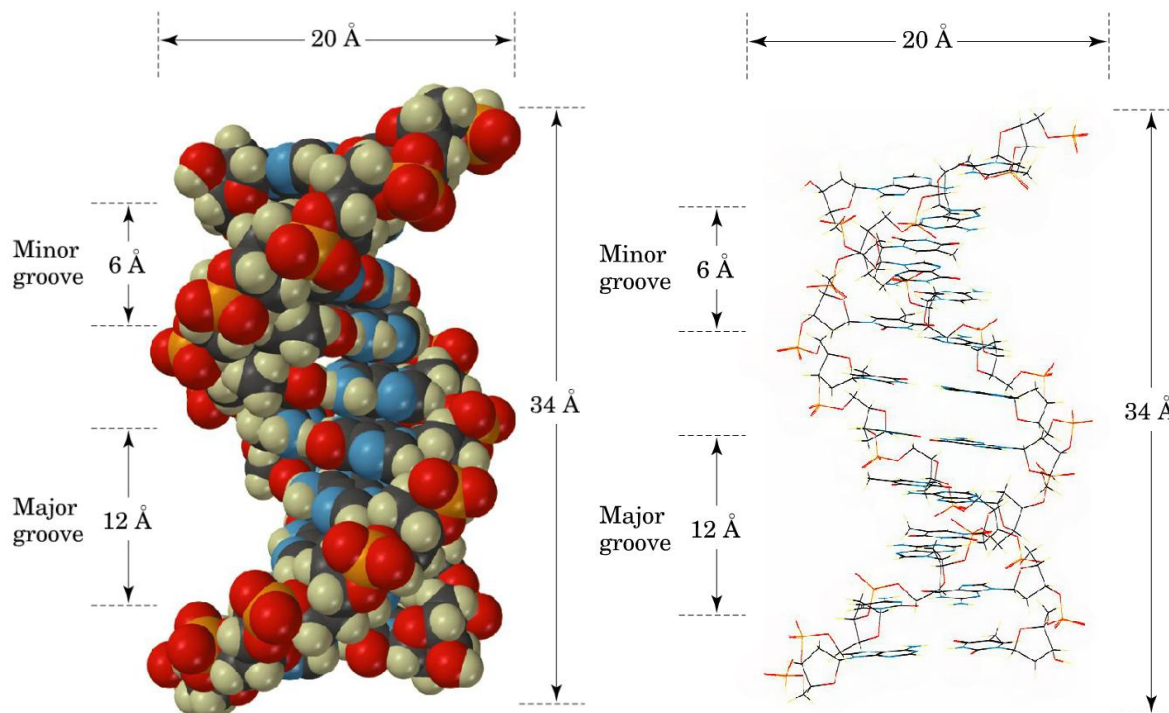
Kwasy nukleinowe mogą być modyfikowane na trzy główne sposoby, co wynika z ich budowy. Możliwe są modyfikacje części cukrowej nukleotydu - cząsteczki rybozy lub deoksyrybozy, modyfikacje nukleotydowej zasady azotowej - adeniny, guaniny, cytozyny, tyminy lub uracylu oraz modyfikacje fragmentu fosfodiesterowego będącego międzynukleotydowym łącznikiem. Znanych jest wiele metod wprowadzania modyfikacji w każdej z części nukleotydu, coraz szerzej stosowana jest również chemia "Click".

Śledząc literaturę z ostatnich lat, można wyciągnąć wniosek, że większość modyfikacji typu "Click" wprowadzanych jest we fragmencie zasady azotowej nukleozydu [36]. Najczęściej przeprowadza się znakowanie fluoroforowe lub izotopowe dla obrazowania molekularnego [37-40], formuje połączenia między nićmi oligonukleotydów [41-43], wytwarza

bio-połączenia z cząsteczkami transportującymi w terapiach z użyciem kwasów nukleinowych [44], a nawet syntetyzuje się nowe analogi całej części zasady azotowej nukleotydu [45-48]. Natomiast mniejsza jest liczba prac dotyczących zmian naturalnej struktury szkieletu oligonukleotydowego, co wynika przede wszystkim z konieczności zastosowania złożonej i wieloetapowej strategii syntezy [49]. Głównym problemem w zastosowaniu analogów oligonukleotydów jako substancji terapeutycznych, jest ich polianionowa struktura wynikająca z obecności fosfodiesterowego łącznika [24,26,32]. Chemia "Click" może zaproponować substytut dla układu fosfodiesterowego, układ triazolowy jest elektrycznie obojętny i stabilny w warunkach fizjologicznych. Większość wprowadzanych modyfikacji we wszystkich trzech kluczowych fragmentach kwasów nukleinowych, ma za zadanie zwiększenie kompatybilności w warunkach biologicznych z jednoczesnym zmniejszeniem toksyczności tych związków.

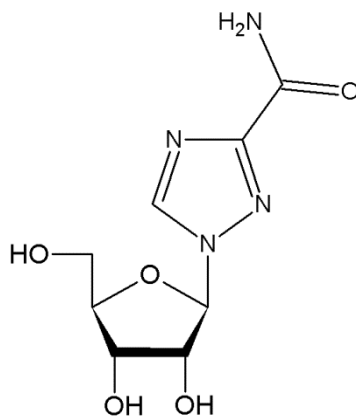
2.1. Modyfikacje części zasady azotowej kwasu nukleinowego

Zasady azotowe są najczęściej modyfikowanymi fragmentami kwasów nukleinowych. Wynika to z obecności w ich strukturze centrów aktywnych chemicznie, krótszych dróg wprowadzania modyfikacji oraz różnorodności w funkcjonalności otrzymywanych pochodnych [39,50]. Analogi zawierające zmodyfikowaną część zasadową mogą zostać włączone w łańcuch oligonukleotydu w postaci amidofosforynowego bloku budulcowego z wykorzystaniem zautomatyzowanego procesu [51]. W ten sam sposób można włączyć analogi zawierające modyfikacje części cukrowej lub szkieletu, do łańcucha oligonukleotydu. Przewagą w przypadku modyfikacji części zasady azotowej, jest możliwość włączenia analogu w środku łańcucha oligonukleotydowego, a nie tylko na jego końcach [52]. Ponadto modyfikowane zasady azotowe mogą zostać sterycznie wpasowane w dużą i małą bruzdę w dupleksach DNA i RNA (**Rysunek 2**), bez zakłócania bezpośrednich oddziaływań Watsona-Cricka [50,53]. W niektórych przypadkach modyfikacja tego typu zwiększa dokładność hybrydyzacji krótkich modyfikowanych fragmentów DNA i RNA, uniemożliwiając niewłaściwe sparowanie [38,47]. Możliwe jest nawet kontrolowanie aktywności tak modyfikowanych analogów oligonukleotydów w procesie wyciszania wadliwych genów, poprzez modyfikacje termodynamiki parowania ich zasad [54].



Rys.2 Struktura dwuniciowego DNA (duża i mała bruzda) - <http://chemistry.brookscole.com/mcmurry6e>

Z wykorzystaniem chemii "Click" najczęściej modyfikuje się pozycje 7-aza lub deaza i N⁹ adeniny lub guaniny, egzocykliczną grupę aminową 2-N guaniny i egzocykliczną grupę aminową 6-N adeniny. W przypadku heterocykli pirymidynowych, najczęściej modyfikowane są pozycje C5, egzocykliczna grupa aminowa 4-N cytozyny i pozycja N³. Modyfikacja pozycji C5 w zasadach pirymidynowych i pozycji 7-deaza w zasadach purynowych pozwala wykorzystać przestrzeń dużej bruzdy dupleksów RNA i DNA oraz nie wpływa niekorzystnie na naturalne parowanie się zasad. Ta strategia pozwala na przyłączanie dużych cząsteczek w celu badań strukturalnych, fluorescencyjnej wizualizacji bądź transportu cząsteczek [40,55,56]. Poza modyfikacją naturalnie występujących zasad azotowych, triazole wykorzystano jako substytut tej właśnie części cząsteczki nukleotydu (**Rysunek 3**) [57]. Wśród analogów nukleozydów tej grupy, można wskazać wykazujące działanie przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe [58-60].



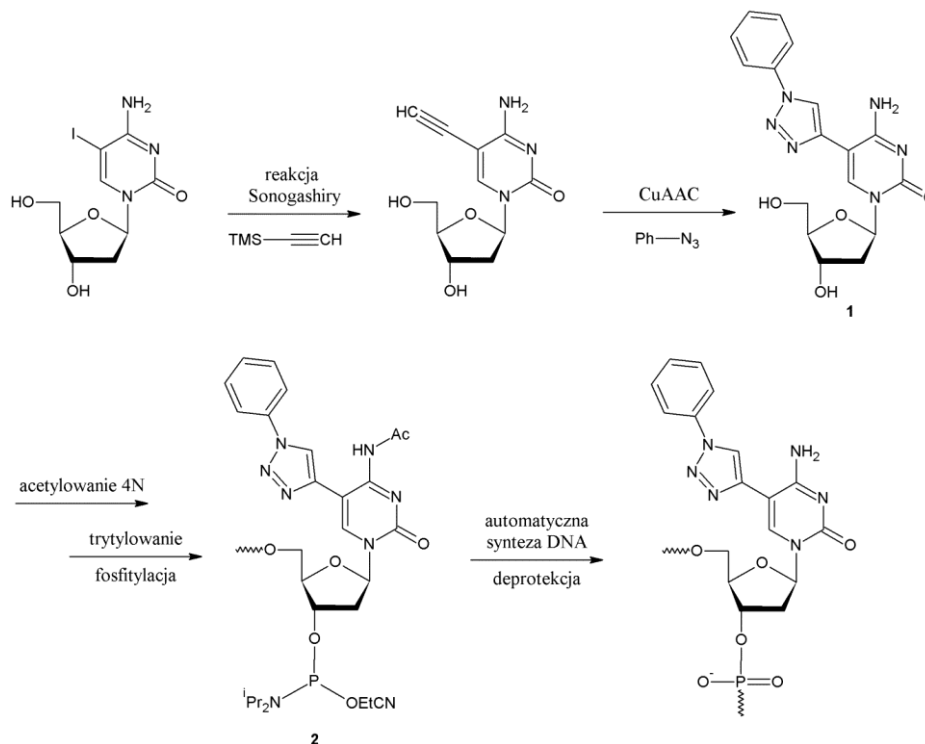
Rys.3 Rybawiryna - lek przeciwwirusowy stosowany w zakażeniach wirusami RSV (*Respiratory Syncytial Virus*) i HCV (Wirus Zapalenia Wątroby typu C)

2.1.1. Antysensowne oligonukleotydy (ASO) i siRNA

Antysensowne oligonukleotydy to jednoniciowe fragmenty DNA (ssDNA - single-stranded DNA), które odnajdują i hybrydują komplementarnie ze specyficznymi transkryptami macierzystego RNA (mRNA - messenger RNA) w komórkach. Ograniczają w ten sposób ekspresję niepożądanych struktur białkowych [61-63]. Ponadto dupleks ASO:RNA może aktywować enzym rybonukleazę H (RNase H), która rozkłada transkrypt RNA lub fizycznie inhibuje jego właściwą translację. Obecnie trwają badania nad zwiększeniem odporności ASO na degradację enzymatyczną z jednoczesnym zwiększeniem stabilności interakcji DNA:RNA [64]. Nielsen wraz z zespołem zdecydował się na przyłączenie ugrupowań hydrofobowych i aromatycznych w pozycji C5 zasad pirymidynowych, wykorzystując układ triazolowy [65]. Te i inne badania pokazały, że wpasowanie grup hydrofobowych w przestrzeń dużej bruzdy DNA może zwiększyć stabilność dupleksów, poprzez oddziaływania steryczne [66,67]. Samo ugrupowanie triazolowe wpływa korzystnie na stabilność dupleksów, z powodów sterycznych jak i z uwagi na możliwość tworzenia wiązania wodorowego z atomem wodoru przy węglu C5 niemodyfikowanej zasady pirymidynowej [65,68,69].

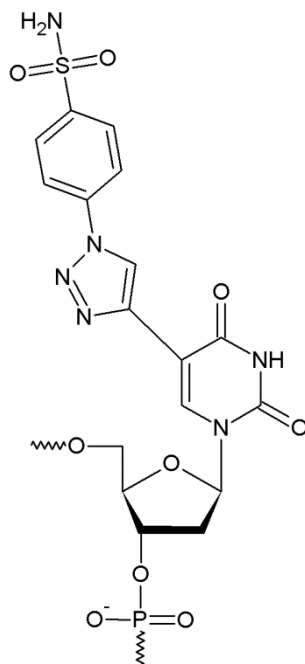
W badaniach potwierdzających te właściwości otrzymano, wychodząc z C5-jodo cytydyny, analog cytydyny **1**, który przekształcono w amidofosforynowy blok budulcowy **2** (**Schemat 3**). Następnie zsyntezowano kilka sekwencji DNA zawierających analog cytydyny, jak również podobną strukturę 5-(fenylotriazolo)urydyny. Po przeprowadzeniu testów stabilności

różnych dupleksów zawierających pochodne 5-(fenylotriazolo)pirymidynowe, stwierdzono że pochodna urydyny lepiej oddziaływała z RNA lub dupleksem DNA, jako oligonukleotyd tworzący trójniciowe DNA (TFO - triplex-forming oligonucleotide) [68].



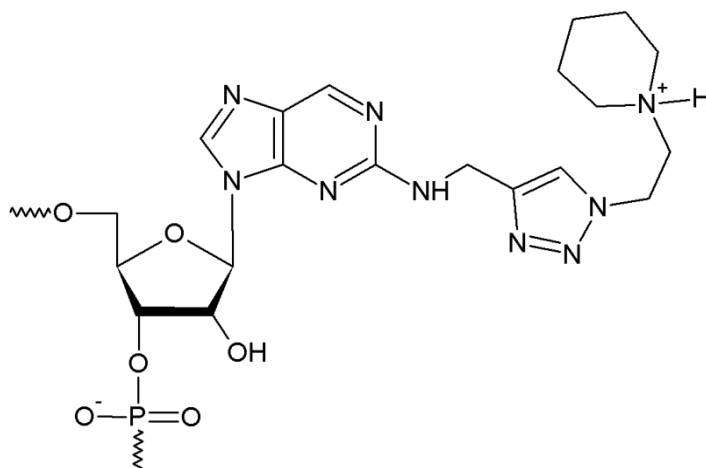
Schemat 3 Synteza układu z modyfikacją w pozycji C5, zwiększającą stabilność dupleksu DNA

W podobnych badaniach otrzymano łańcuchy DNA zawierające zasady pirymidynowe modyfikowane w pozycji C5 grupą triazolo-benzenosulfonoamidową, takie jak związek **3** na **rysunku 4**. Te modyfikowane struktury również silnie hybrydowały z RNA [67]. W obu przypadkach zaobserwowano zwiększoną stabilność dupleksów wynikającą z oddziaływań sterycznych modyfikacji w pozycji C5.



Rys.4 Struktura związku 3 wykorzystywanego terapii antysensownej

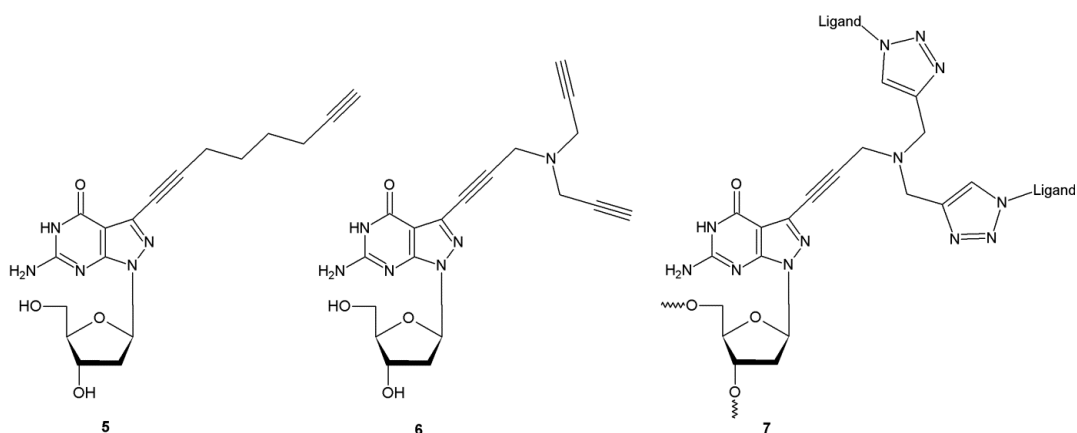
siRNA to dwuniciowe RNA o długości około 21 par zasad, w którym jedna nić jest aktywna (przewodnia) i odpowiada za selektywne rozszczepianie transkryptów mRNA [25]. Powszechne są próby modyfikowania struktur siRNA w celu zredukowania ich skłonności do wiązania białek nie będących częścią interferowanego szlaku RNA (RNAi) [70]. Białka wiążące się z tym dwuniciowym RNA (dsRNA - double strand RNA) w sposób zależny od sekwencji łańcucha, oddziałują głównie poprzez małą bruzdę struktury dwuniciowej [71,72]. Beal wraz z zespołem zaproponował modyfikacje rejonu małej bruzdy dupleksu RNA za pomocą analogu nukleotydu purynowego **4**, który został włączony zarówno do nici przewodniej jak i nici nieaktywnej w celu wpłynięcia na zdolność wiązania RNA – białko (**Rysunek 5**). Okazało się, że aktywność wyciszania niechcianych genów nie została zmniejszona, ale również przy modyfikacji nici nieaktywnej zredukowano wiązanie siRNA z deaminazą adenozykową (ADAR1) uczestniczącą w metabolizmie puryn [73].



Rys.5 Struktura związku 4 wykorzystywanego w terapii antysensownej

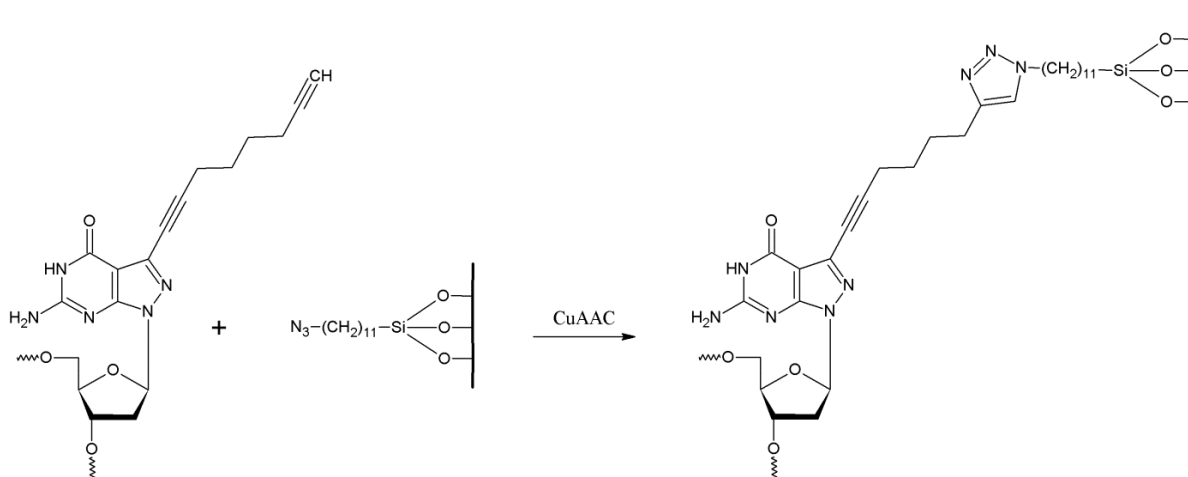
2.1.2. Nanomateriały bazujące na oligonukleotydach

W poszukiwaniu nowych materiałów i tworzeniu bibliotek nanomateriałów, chemicy mogą wykorzystać możliwości jakie daje chemia CuAAC. Seela i jego grupa badawcza przebadali niektóre potencjalne zastosowania nanomateriałów opartych na DNA zawierającym ugrupowanie triazolowe. Możliwe jest ich zastosowanie jako substancji przenoszących leki [44] i do nanoznakowania powierzchni stałych. Zespół Seeli sfunkcjonalizował pozycję 7-deaza 2'-deoksyguanozyny alkilowymi łącznikami o różnej długości zawierającymi terminalne mono- lub diacetylenki (związki 5 i 6 na rysunku 6).



Rys.6 Struktury analogów 8-aza-7-deazaguanozyny z podstawnikiem alkinowym.

Po przyłączeniu związku **5** w postaci amidofosforynu do końca 5' lub w centralnym regionie syntetyzowanego oligonukleotydu, doszło do połączenia typu "Click" z podłożem krzemowym sfunkcjonalizowanym azydkiem (**Schemat 4**) [74].



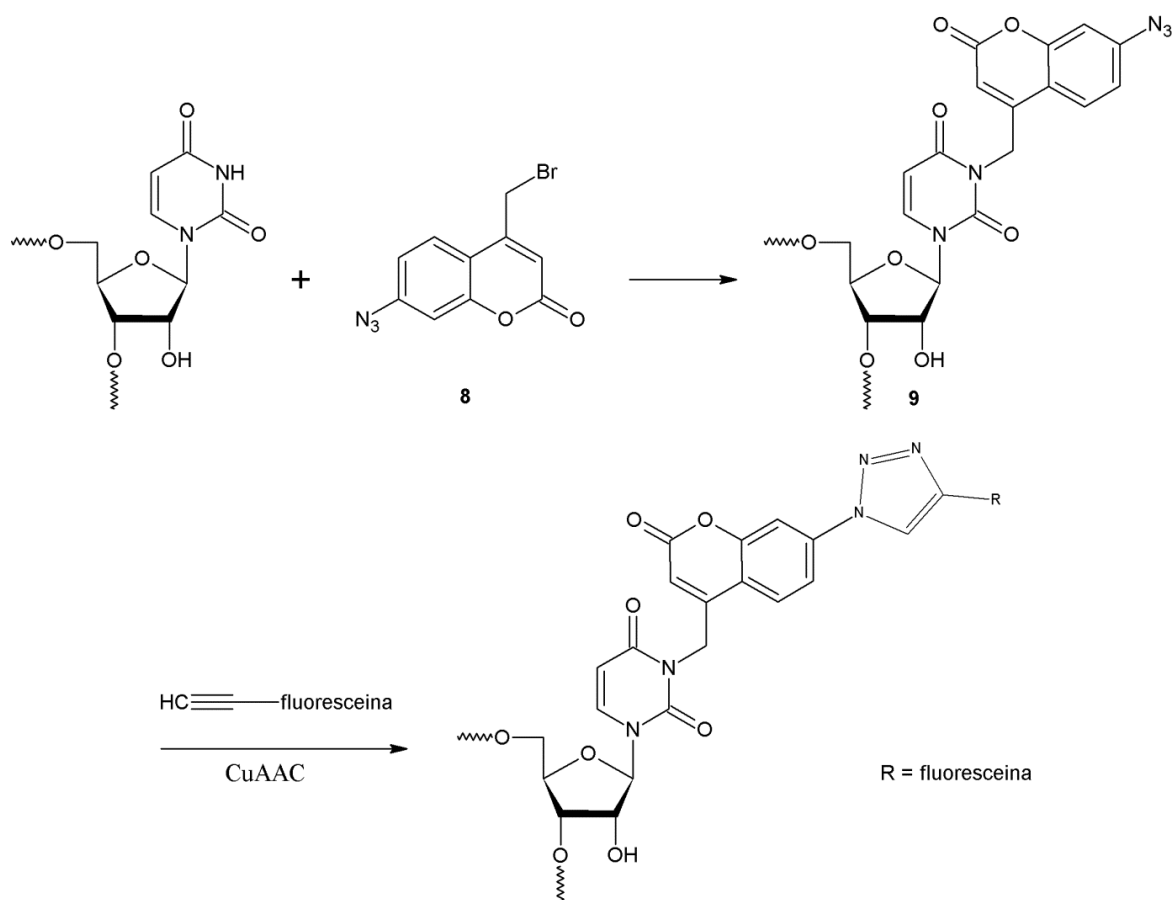
Schemat 4 Wykorzystanie pochodnych 7-deaza 2'-deoksyguanozyny w celu związywania DNA z podłożem krzemowym.

Immobilizowane oligonukleotydy formowały samoistnie wzory w zależności od położenia analogów deoksyguanozyny. Znaczenie miały siły wewnątrz- i międzymolekularne takie jak interakcje między fragmentem fosfodiesterowym i zasadą azotową nukleotydu, interakcje steryczne zasady i triazolu oraz hydrofobowość alkilowych połączeń [68,75]. Seela i jego grupa badawcza kontynuowali funkcjonalizowanie związku **6** przez reakcje podwójnej cykloaddycji typu "Click", wykorzystując w tym celu różne pochodne zawierające grupę azydkową (AZT, PEG-N₃, azydek benzyłu) - co miało wpływ na zdolność transportu leków przez zmodyfikowany produkt **7**.

2.1.3. Określanie struktury

Wiele różnych grup funkcyjnych znajduje zastosowanie w określaniu struktury i funkcji związków opartych na DNA lub RNA. Helm ze swoją grupą badawczą przeprowadził post-syntetyczne znakowanie łańcucha oligonukleotydu chromoforem (N3BC, **8**) opartym na

strukturze kumaryny (**Schemat 5**) [76]. Jest to podejście nowatorskie w przeciwieństwie do najszerszej stosowanej metody włączania odpowiednio sfunkcjonalizowanego analogu nukleotydu do budowanego łańcucha oligonukleotydu.

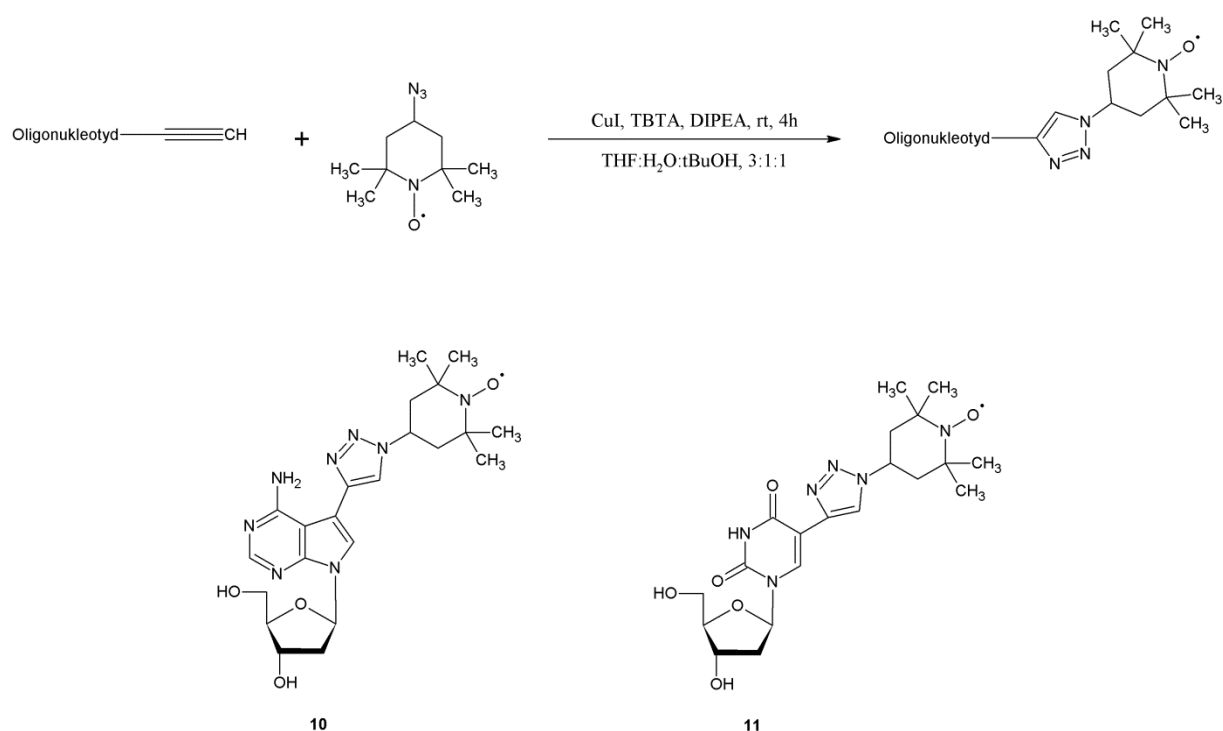


Schemat 5 Alkilowanie urydyny specyficznie w pozycji N³ za pomocą N3BC

Chromofor N3BC został otrzymany w pięcioetapowym procesie, którego substratem początkowym był 3-aminofenol. Ogólna wydajność przeprowadzonych reakcji wyniosła 44%. Okazało się, że otrzymany związek reagował specyficznie z pozycją N³ w urydynie (9) zawartej w badanej sekwencji RNA. Wykazywał też, analogicznie do kumaryny, pasmo wzbudzenia o długości fali 320 nm. Następnie tak zmodyfikowane RNA można poddać reakcji z fluoroforem sfunkcjonalizowaną grupą alkinową, dzięki wolnej grupie azydkowej w cząsteczce N3BC [36].

Do badań złożonych struktur i konformacji oligomerów DNA i RNA w środowisku biologicznym, stosuje się spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) połączonego z SDLS (site-directed spin labeling) [77]. W celu wykorzystania tej metody,

grupa badawcza Seeli zastosowała chemię "Click" do modyfikacji cząsteczek DNA i RNA zawierających sfunkcjonalizowane alkinem analogi purynowe **10** i pirymidynowe **11**. Modyfikacja polegała na sprzęganiu z rodnikiem nitroksylowym 4-azydo-TEMPO (rodnik tlenowy 4-azydo-2,2,6,6-tetrametylopiperydyn-1-oksyl) będącym znacznikiem spinu (**Schemat 6**) [55,78]. Był to pierwszy przykład tego typu modyfikacji służącej analizie struktury za pomocą EPR.



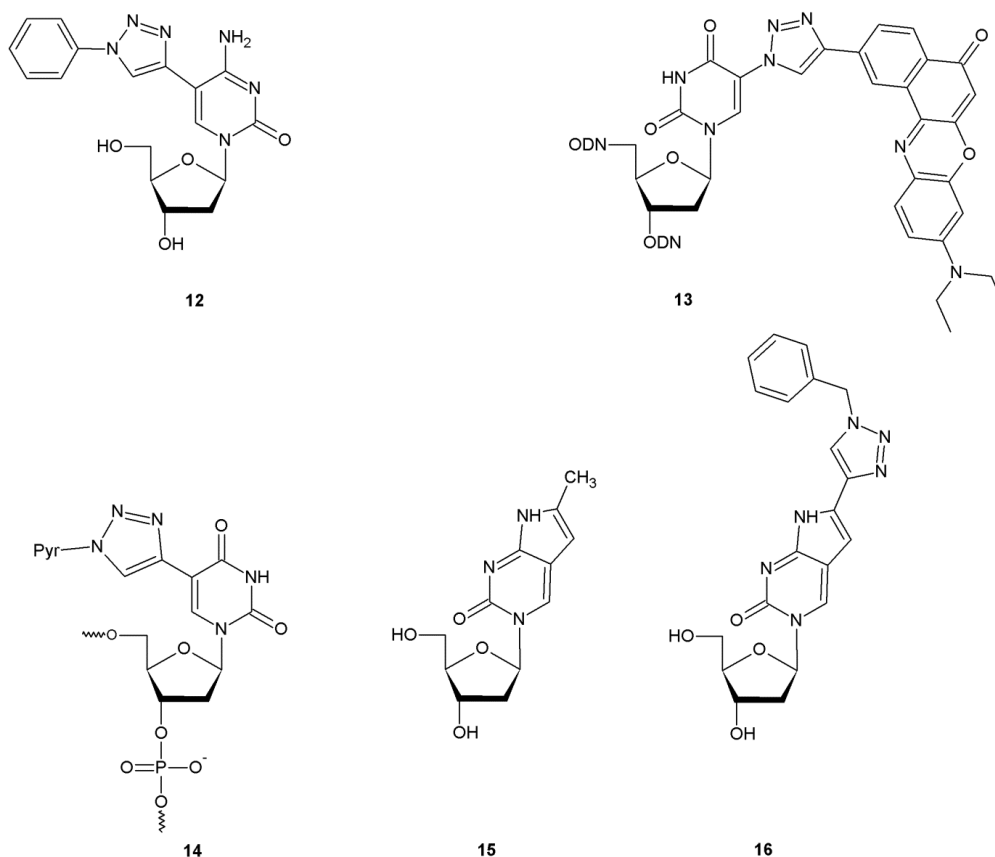
Schemat 6 Postsyntetyczne znakowanie oligonukleotydu za pomocą 4-azydo-TEMPO oraz przykładowe struktury purynowego i pirymidynowego mimika

2.1.4. Znakowanie fluorescencyjne

Przylączenie fluorescencyjnych znaczników do zasad azotowych [38,40,56] lub włączenie zasady nukleinowej w strukturę fluorofora jako jego integralnej części [39,52,79] jest powszechną techniką znakowania oligonukleotydów. Od kiedy nauczyliśmy się tworzyć związki specyficznym hybrydujące z cząsteczką docelową badanego białka lub oligonukleotydu, możemy zbierać dane wizualizujące na czym polega proces tej właśnie

hybrydyzacji, lub jaka jest zależność aktywności badanego związku od jego struktury [38,76]. Zastosowanie reakcji CuAAC znacznie upraszcza proces przyłączania fragmentu fluorescencyjnego do badanych związków (**Rysunek 7**).

Ciekawym przykładem fluorofora jest analog cytydyny **12**, który powstał w wyniku reakcji CuAAC bloku budulcowego C5-etynylocytydyny z azydkiem, przy czym żaden z reagentów nie jest faktycznym fluoroforem [39]. Innym przykładem jest przyłączenie fluorofora - Czerwieni Nilu, za pomocą układu triazolowego, w pozycji C5-urydyny (**13**). W tym przypadku w pierwszej kolejności pochodna C5-jodopyrimidynowa została wprowadzona do łańcucha oligonukleotydu, a następnie poprzez reakcję z azydkiem sodu doprowadzono do podstawienia atomu jodu. Umożliwiło to przyłączenie barwnika w reakcji CuAAC [56]. Żeby wykryć obecność polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP - single-nucleotide polymorphism) za pomocą fluorescencji, Hrdlicka wraz z zespołem wykorzystali reakcje CuAAC i przyłączyli piren poprzez układ triazolowy w pozycji C5 urydyny. Tak otrzymany związek **14** wykazywał obecność polimorfizmu przez obniżenie wydajności kwantowej fluorescencji w obecności zmienionej sekwencji [38].



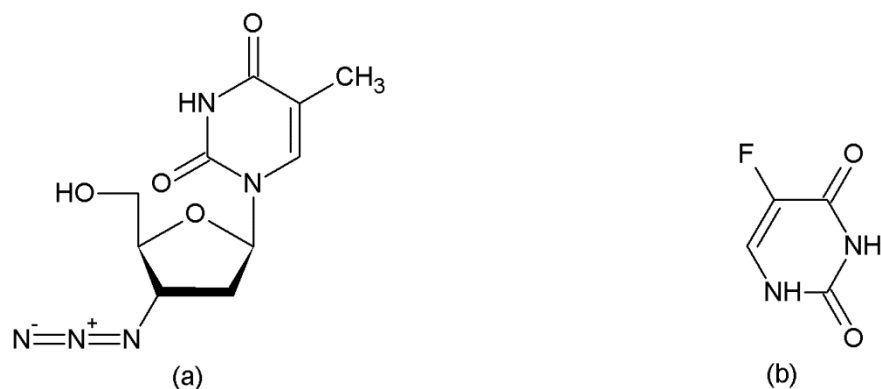
Rys.7 Struktury analogów nukleozydów zawierających układ triazolowy, o właściwościach fluorescencyjnych

Seela i jego grupa otrzymali alternatywną pochodną pirolo-deoksycytydyny **15**, modyfikowaną przez układ triazolowy **16**. Tak syntezowany produkt wykazywał dziesięciokrotnie większą wydajność kwantową fluorescencji [47]. Porównując działanie tego związku z analogiem urydyny (**14**), modyfikowanym w pozycji C5 triazolo-pirenem otrzymanym przez Hrdlicka, stwierdzono, że związek **16** ulega silnemu wygaszeniu fluorescencji przy hybrydyzacji z prawidłową sekwencją. Natomiast w obecności zmienionej sekwencji zwiększa się wydajność kwantowa jego fluorescencji. Związek **16** jest substytutem deoksycytydyny w łańcuchu oligonukleotydu, w związku z czym wygaszenie fluorescencji jest największe przy parowaniu z deoksyguanozyną. Wydajność kwantowa fluorescencji stopniowo wzrasta w zależności od parowanej zasady- $dG < dT < dA < dC$.

2.1.5. Poszukiwanie substancji przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych

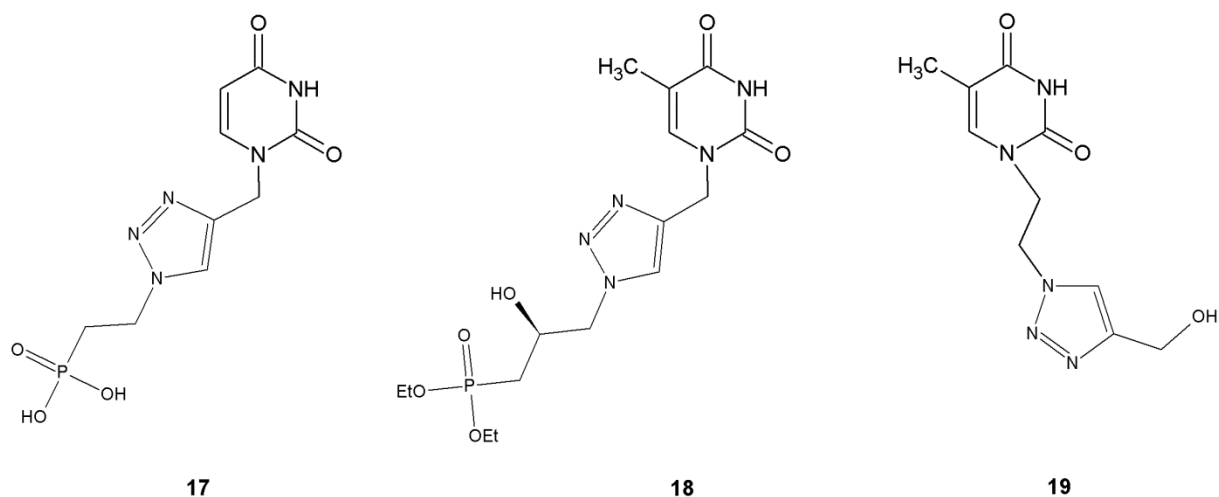
Modyfikowane nukleozydy już od wielu lat znane są ze swoich właściwości przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych. Związki takie jak AZT, 5-fluorouracyl czy Ribawiryna są komercyjnymi lekami stosowanymi na całym świecie (**Rysunek 8**). Zastosowanie reakcji CuAAC umożliwia tworzenie bibliotek nowych modyfikacji o potencjalnym działaniu przeciwwirusowym i przeciwnowotworowym [80]. O możliwości tworzenia wielu pochodnych nukleozydów wykazujących aktywność leczniczą, decydują wspomniane na wstępie bardzo korzystne właściwości łącznika triazolowego i chemii "Click" [4,6,7,11]:

- Azydki i alkiny selektywnie reagują ze sobą.
- Azydki i grupy alkinowe są nieaktywne względem innych obiektów w środowisku biologicznym.
- Produkt reakcji cyklizacji to stabilny i nietoksyczny w warunkach biologicznych 1,4-dipodstawiony układ 1,2,3-triazolu.



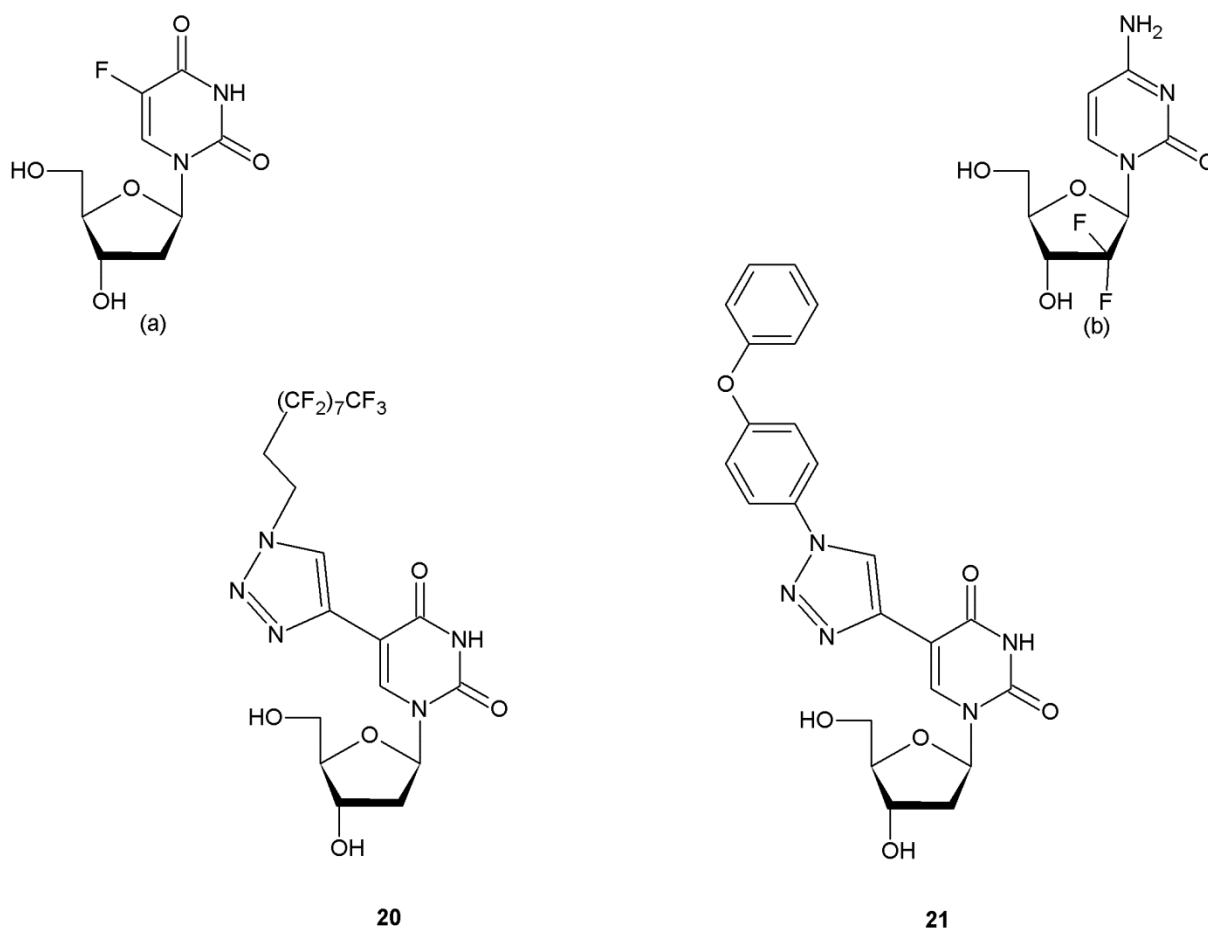
Rys.8 Struktura AZT (a) - leku przeciwwirusowego anti-HIV i 5-fluorouracylu (b) - leku przeciwnowotworowego

Substancje będące aktywnymi anti-patogenami należą do grupy acyklicznych fosfonianów nukleozydów (ANP- acyclic nucleoside phosphonate). Występujący naturalnie cukrowy pierścień furanozy jest w nich zastąpiony przez łańcuch alkilowy, łączący fosfonian z pozycją N¹ zasady pirymidynowej lub pozycją N⁹ zasady purynowej (**Rysunek 9**). Przedstawicielami tej klasy są związki **17**, wykazujący aktywność przeciwko wirusowi HCV (Hepatitis C Virus - Wirus Zapalenia Wątroby typu C) [31] oraz **18**, o potencjalnym działaniu przeciwwirusowym [81]. Przykładem acyklicznego analogu N¹-pirymidyny pozbawionego reszty fosfonianowej jest związek **19**, zaprojektowany jako czynnik przeciwwirusowy, wykazujący właściwości przeciwutleniacza.



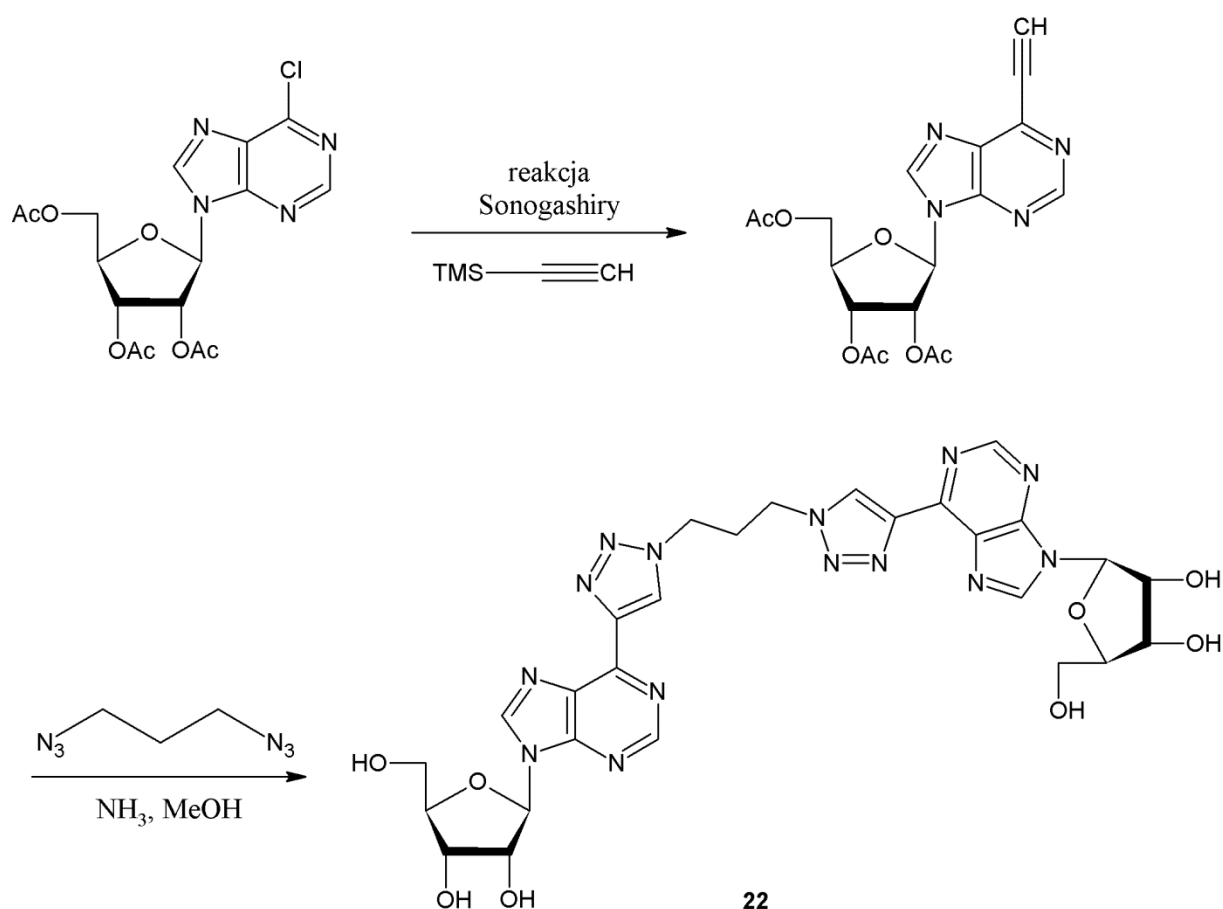
Rys.9 Struktury związków o właściwościach przeciwwirusowych

Inną grupą modyfikowanych nukleozydów o aktywności przeciwnowotworowej są fluorowane analogi, takie jak 5-fluorouracyl, 5-fluorodeoksyurydyna czy Gemcytabina. Skuteczność tych leków zainspirowała do badań polegających na otrzymywaniu bibliotek związków fluorowanych zawierających układ triazolowy i testowaniu ich aktywności przeciwwirusowej (**Rysunek 10**) [58,82]. Modyfikując pozycję C5 układów 2'-deoksyprymidynowych [39,65] uzyskano pochodne zawierające jednostkę triazolu podstawionego perfluorodecyłem, takie jak związek **20**. Pochodne tego typu wykazują właściwość inhibicji wzrostu komórek rakowych [58]. Agrofoglio wraz z zespołem również opracowali bibliotekę pochodnych modyfikowanych w pozycji C5. Jeden z uzyskanych związków (**21**) wykazuje aktywność przeciw wirusom DNA, ale również jest aktywny przeciwnowotworowo w stopniu porównywalnym z 5-fluorouracylem [59].



Rys.10 Struktury leków przeciwnowotworowych - 5-fluorodeoksyurydyny (**a**) i Gemcytabiny (**b**) oraz związków **20** i **21**, również aktywnych przeciwnowotworowo

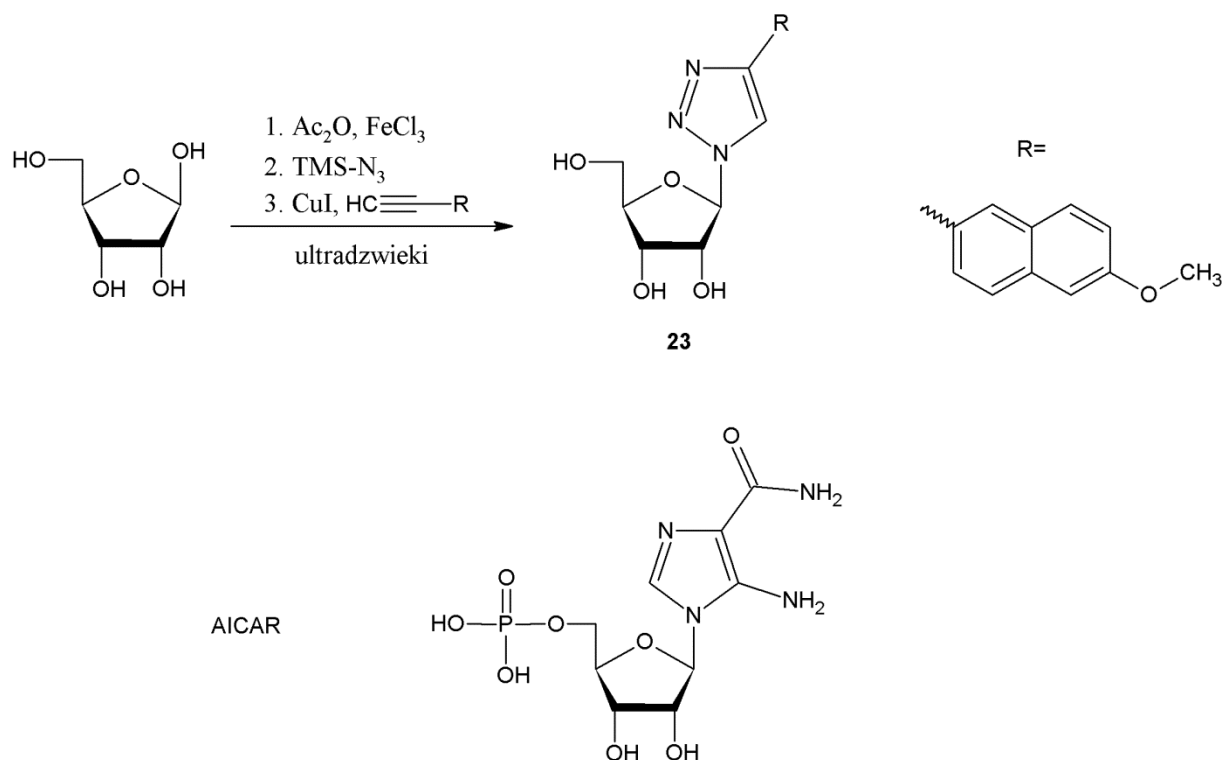
Mathew wspólnie z innymi autorami opracował syntezę analogów nukleozydów purynowych zawierających układ triazolowy. Substratem reakcji była pochodna 6-chloropuryny, którą wykorzystano w krzyżowym sprzężeniu Sonogashiry z acetylenem chronionym trimetylosililem. W rezultacie uzyskano analog nukleozydu posiadający podstawnik alkinowy w pozycji C6 zasady azotowej. Kolejnym etapem było sprzężanie z azydkiem w reakcji typu CuAAC co doprowadziło do otrzymania kilku pochodnych takich jak dimer homopurynowy **22** (Schemat 7). Związki tego typu mogą służyć jako agoniści lub antagoniści receptorów adenozynowych, co wskazuje, że mogą być badane jako związki wiodące w poszukiwaniu substancji wykazujących aktywność leczniczą [83].



Schemat 7 Synteza dinukleozydu z łącznikiem triazolowym w części zasadowej

Kolejnym rodzajem modyfikacji jest substytucja części zasadowej nukleozydu, czyli substytucja w pozycji 1'-furanozy. Istnieje kilka przykładów aktywnych biologicznie cząsteczek imitujących naturalne nukleozydy, ale zawierających pięcioczłonowy pierścień układu triazolowego w pozycji 1'-furanozy [84]. Praktyczną metodą wprowadzania układu

triazolowego okazała się synteza z wykorzystaniem ultradźwięków. Reakcję prowadzi się w jednym naczyniu (reakcja typu "one-pot") w obecności jonów żelaza (III) jako katalizatora, użycie ultradźwięków skraca czas reakcji z godzin do minut, jednocześnie powodując zwiększenie wydajności całego procesu (**Schemat 8**). Produkt reakcji **23** skraca czas życia komórek K562 przewlekłej białaczki szpikowej (CML - chronic myelogenous leukemia) o 93% w porównaniu ze znanym inhibitorem AICAR skracającym ten czas o 35%.



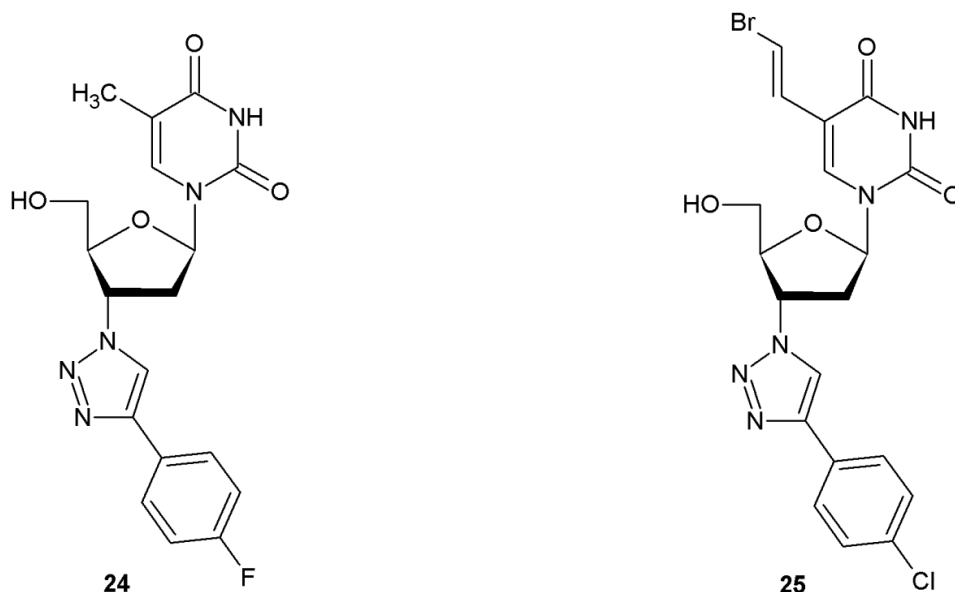
Schemat 8 Synteza mimików nukleozydów w ultradźwiękach oraz struktura AICAR

2.2. Modyfikacje części cukrowej kwasu nukleinowego

Modyfikacje części cukrowej nukleozydów służą przede wszystkim poszukiwaniom nowych leków przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych. Zastosowania tego typu struktur są podobne jak w przypadku modyfikacji w części zasad azotowych lub modyfikacji szkieletu. Ograniczeniem w przypadku tego typu zmian struktury jest niewielka ilość miejsc aktywnych w części cukrowej mogących ulec modyfikacji [85,86]. Modyfikacje wprowadzane w pozycjach C3' i C5' są stosowane w przypadku cząsteczek monomerów lub dimerów, ewentualnie w przypadku terminalnego nukleotydu łańcucha DNA lub RNA [87-92]. Modyfikacja w pozycji C2' umożliwia wprowadzenie analogu nukleotydu w środek syntetyzowanego łańcucha oligonukleotydu [93-95]. Wykorzystanie reakcji CuAAC umożliwia tworzenie bibliotek związków z różnorodnymi modyfikacjami, zawierających łącznik triazolowy.

2.2.1. Modyfikacje części cukrowej w pozycji C3'

Bardzo popularną strategią przy wprowadzaniu modyfikacji w pozycji C3' furanozy jest wykorzystywanie cząsteczki AZT jako substratu reakcji CuAAC [87]. Ponieważ AZT jest komercyjnie dostępna, tego prekursora można użyć w reakcji z różnymi pochodnymi alkinowymi otrzymując produkty o wielu odmiennych zastosowaniach. Errikson wraz z zespołem otrzymał w ten sposób między innymi związek **24 (Rysunek 11)**, będący inhibitorem kinazy tymidynowej 1 (TK1). Enzym ten odpowiedzialny jest za etap inicjujący replikację DNA, ograniczający szybkość całego procesu, w przypadku linii komórek rakowych ulega on nadmiernej ekspresji [96,97].



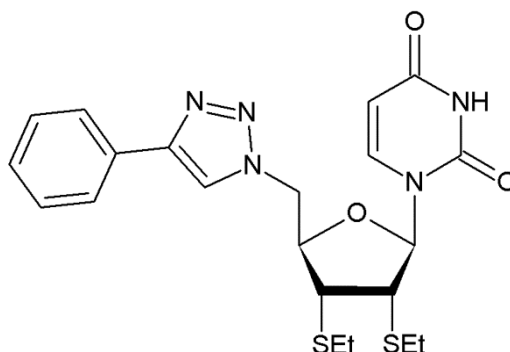
Rys.11 Struktury związków 24 i 25

Van Celenbergh wraz z zespołem w podobny sposób otrzymał analogi nukleozydów z dodatkowym podstawnikiem 2-bromowinylovym w pozycji C5 zasady azotowej [88]. Przykładem jest związek **25** (Rysunek 11), będący selektywnym inhibitorem kinazy tymidynowej 2 (TK2), należącej do grupy enzymów - kinaz deoksyrybonukleinowych (dNK). Kinaza tymidynowa 2 odpowiedzialna jest za fosforylację deoksynukleotydów (dNTP) w procesie replikacji mitochondrialnego DNA [98]. Celem badań było zrozumienie mechanizmu wywoływania toksyczności mitochondrialnego DNA przez nukleozydowe terapie przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe.

2.2.2. Modyfikacje części cukrowej w pozycji C5'

Analogi nukleozydów modyfikowane azydkiem lub alkinem w pozycji C5' rybozy mogą zostać przyłączone na końcu 5' syntetycznego oligonukleotydu. Daje to możliwość dalszej modyfikacji z użyciem reakcji CuAAC w celu polepszenia zdolności komplementarnej hybrydyzacji łańcucha, możliwości jego dostarczenia czy potencjału cytotoksycznego [91]. Wu wraz z zespołem przebadali serię urydyn, tymidyn i cytydyn modyfikowanych triazolem w pozycji C5', pod kątem właściwości przeciwnowotworowych [89]. Związek **26** wykazał znaczną aktywność cytotoksyczną przeciwko trzem z czterech przebadanych linii komórek

rakowych, przewyższając sześciokrotnie aktywność 5'-fluorouracylu, będącego substancją porównawczą w badaniu (**Rysunek 12**).

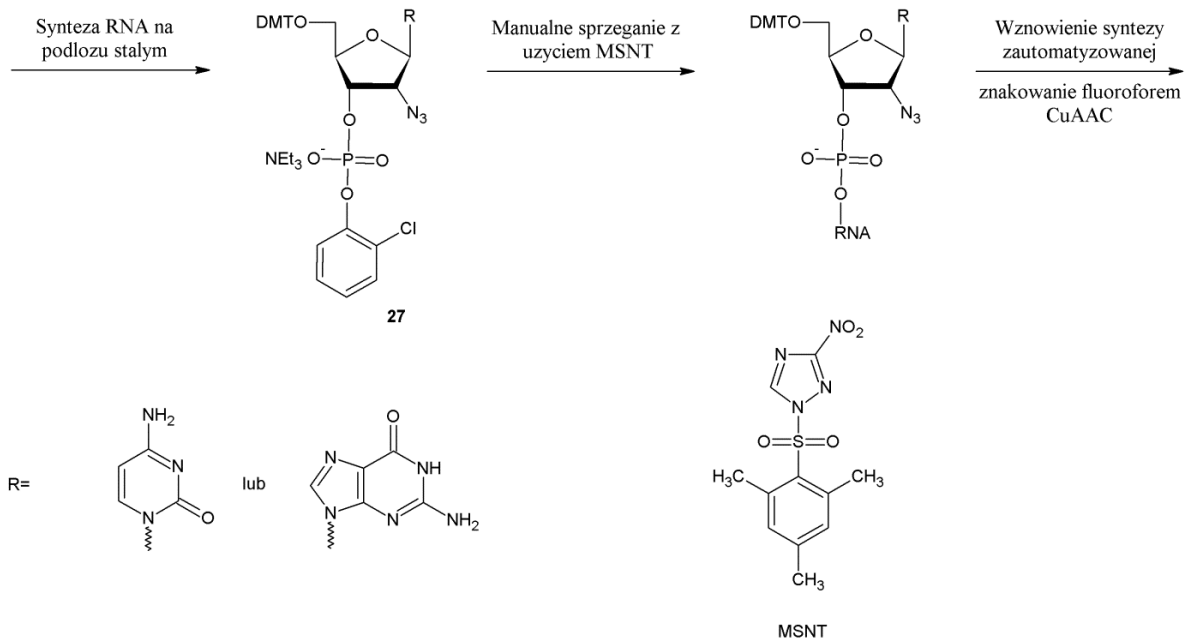


Rys.12 Analog urydyny **26**, modyfikowany w pozycji C5'

2.2.3. Modyfikacje części cukrowej w pozycji C2'

W przeciwieństwie do analogów nukleozydów modyfikowanych w pozycjach C3' i C5', związki modyfikowane w pozycji C2' mogą być włączone w dowolnej pozycji syntetycznego oligonukleotydu. Jest to wynikiem tego, że pozycja C2' nie uczestniczy w tworzeniu połączeń fosforanowych między nukleotydami, a zatem w wydłużaniu łańcucha. Fauster wspólnie z innymi autorami opracowała analogi cytydyny i guanozyny modyfikowane w pozycji C2' grupą azydkową [93]. Problemem utrudniającym ich użycie jest niekompatybilność azydków w technice amidofosforynowej syntezy oligonukleotydów. W obecności atomu fosforu (III) azydki są podatne na redukcję Staudingera, zachodzącą pod warunkiem że grupa amidofosforynowa i azydkowa występują w tym samym monomerze [99]. Dlatego w większości przypadków modyfikacji oligonukleotydu za pomocą reakcji CuAAC, wprowadza się do łańcucha nukleotydy zawierające podstawnik alkinowy. Pomimo tych ograniczeń Fauster wykazała, że analogi nukleotydów modyfikowane w pozycji C2' grupą azydkową są kompatybilne w procesie zautomatyzowanej syntezy oligonukleotydu. Diester **27** został włączony w określonej pozycji tworzonej nici oligonukleotydu techniką triestrową PV, przy pomocy aktywatora 1-(mezytyleno-2-sulfoniano)-3-nitro-1,2,4-triazolu MSNT (**Schemat 9**) [93, 100]. Kontynuowanie zautomatyzowanej syntezy z użyciem amidofosforynów nie wpłynęło negatywnie na wolną grupę azydkową w zmodyfikowanym

nukleotydzie. Otrzymany w zautomatyzowanym procesie azydowany siRNA może zostać oznaczony fluoroforem. Taka strategia syntezy umożliwi uniwersalne znakowanie struktury DNA i RNA.



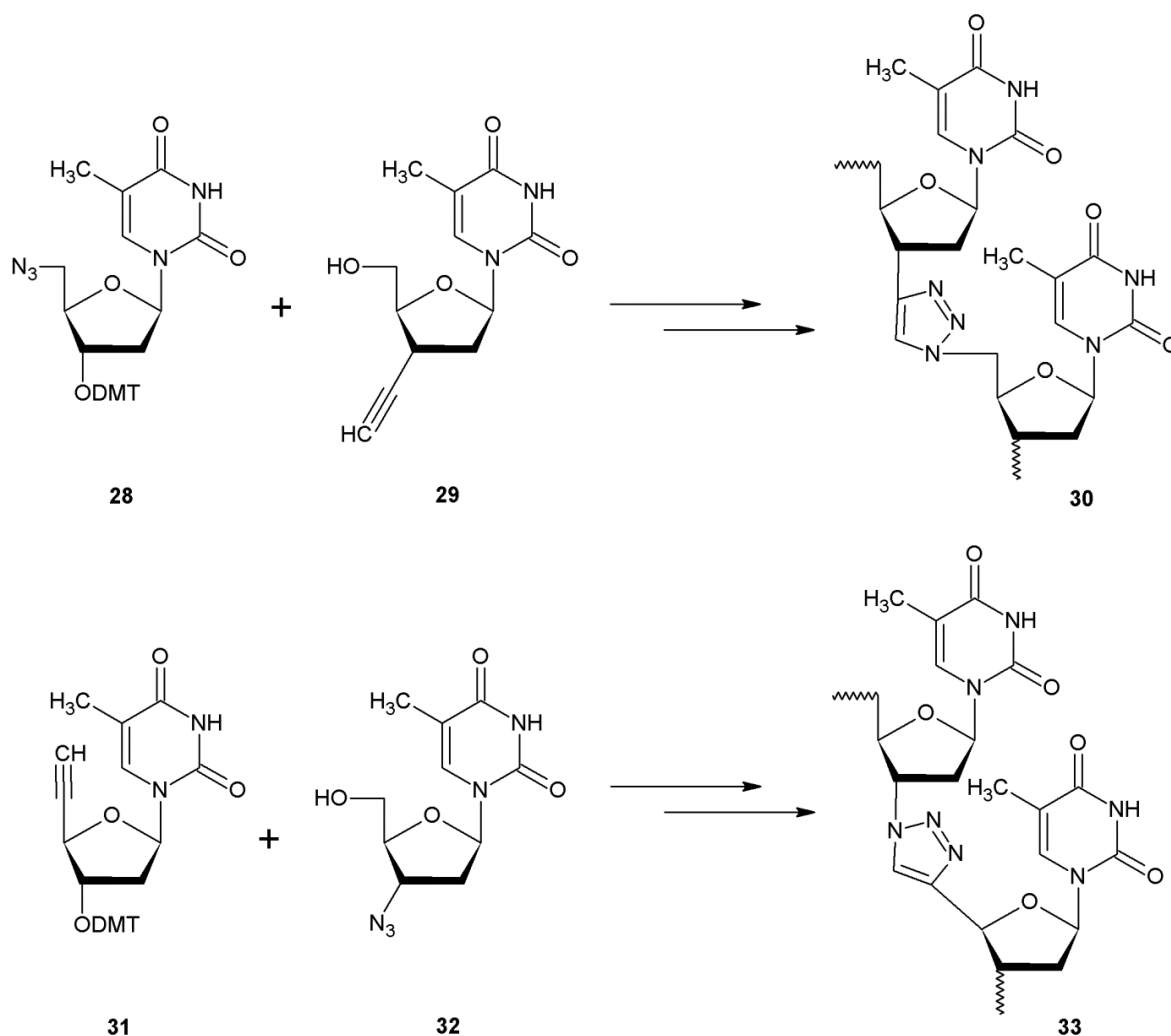
Schemat 9 Synteza RNA metodą amidofosforynową w obecności wolnej grupy azydkowej w pozycji C2' oraz struktura MSNT

2.3. Modyfikacje szkieletu kwasu nukleinowego

Wprowadzanie modyfikacji w szkielecie kwasu nukleinowego jest bardzo korzystne z punktu widzenia zachowania lub zwiększenia aktywności siRNA lub antysensownych oligonukleotydów. Stosując tego typu przekształcenia możliwe jest wytworzenie wielogałęziowych oligonukleotydów i syntetycznych genów. Limitem długości dla syntetycznego oligonukleotydu jest w przybliżeniu sto zasad, przy wykorzystaniu tradycyjnych technik syntezy DNA i RNA, takich jak synteza amidofosforynowa na podłożu stałym [101]. W celu pominięcia limitu długości łańcucha udało się utworzyć nową klasę oligonukleotydów z modyfikowanym szkieletem, w których 1,4-dipostawiony-1,2,3-triazol stanowi internukleotydowe połączenie [33,102]. Korzyścią płynącą z wykorzystania oligonukleotydów połączonych układem triazolowym, jest ich odporność na rozszczepienie przez endo- i egz nukleazy, co zwiększa możliwości zastosowania tych związków w środowisku fizjologicznym [5,11,26].

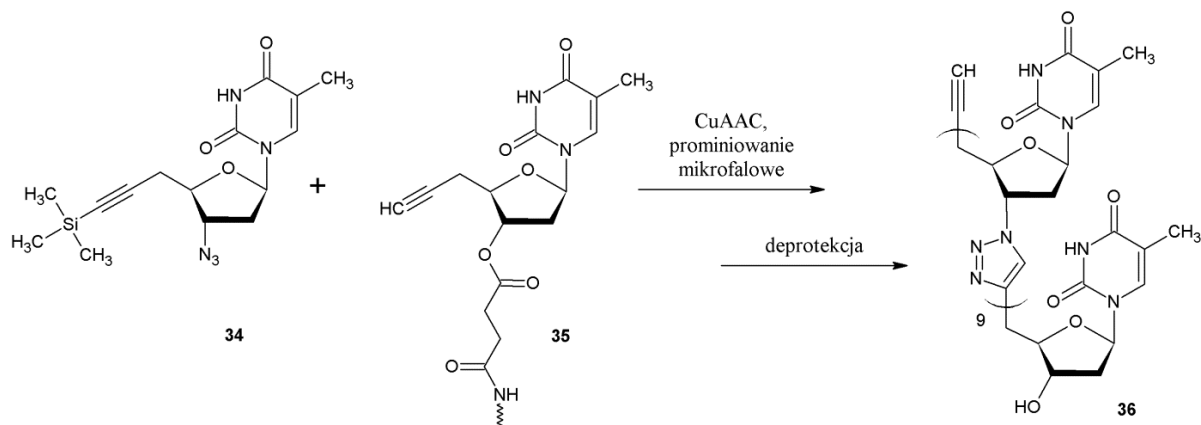
2.3.1. Modyfikacje szkieletu DNA

W zakresie modyfikacji szkieletu DNA przeprowadzono istotne modyfikacje struktury, polegające na zamianie naturalnie występującego połączenia fosfodiesterowego na układ triazolowy. Dondoni wspólnie z innymi autorami użył analogów nukleozydów posiadających podstawnik alkinowy **29** i **31** oraz analogów nukleozydów z ugrupowaniem azydkowym **28** i **32**, otrzymano dwa typy struktur DNA o triazolowym szkielecie **30** i **33** (**Schemat 10**). Otrzymane produkty różnią się ilością atomów w zmodyfikowanym szkielecie. Otrzymano również modelową cząsteczkę trimeru składającego się z trzech nukleozydów tymidynowych połączonych ugrupowaniem triazolowym [103].



Schemat 10 Synteza analogu DNA z nienaturalnym triazolowym szkieletem

Koncepcja takiej modyfikacji szkieletu DNA została rozwinięta przez Isobe i jego zespół. Zaprojektowano i zsyntezowano nowy analog DNA połączonego układem triazolowym (^{TL}DNA - triazole-linked DNA) wykorzystując reakcję CuAAC. Sposób w jaki został otrzymany ten analog oligonukleotydu jest wysoce selektywny i efektywny, co powinno umożliwić przeprowadzenie reakcji w większej skali. Pochodna azydkowa **34** i alkinowa **35** przereagowały dając chronione oligomery, które w wyniku deprotekcji dały produkt **36** (**Schemat 11**). Otrzymany produkt może okazać się przydatny, z perspektywy badania struktury i aktywności biologicznej oligonukleotydów, z powodu sztywnego szkieletu bogatego w elektrony π co daje możliwość koordynacji metalu [2].

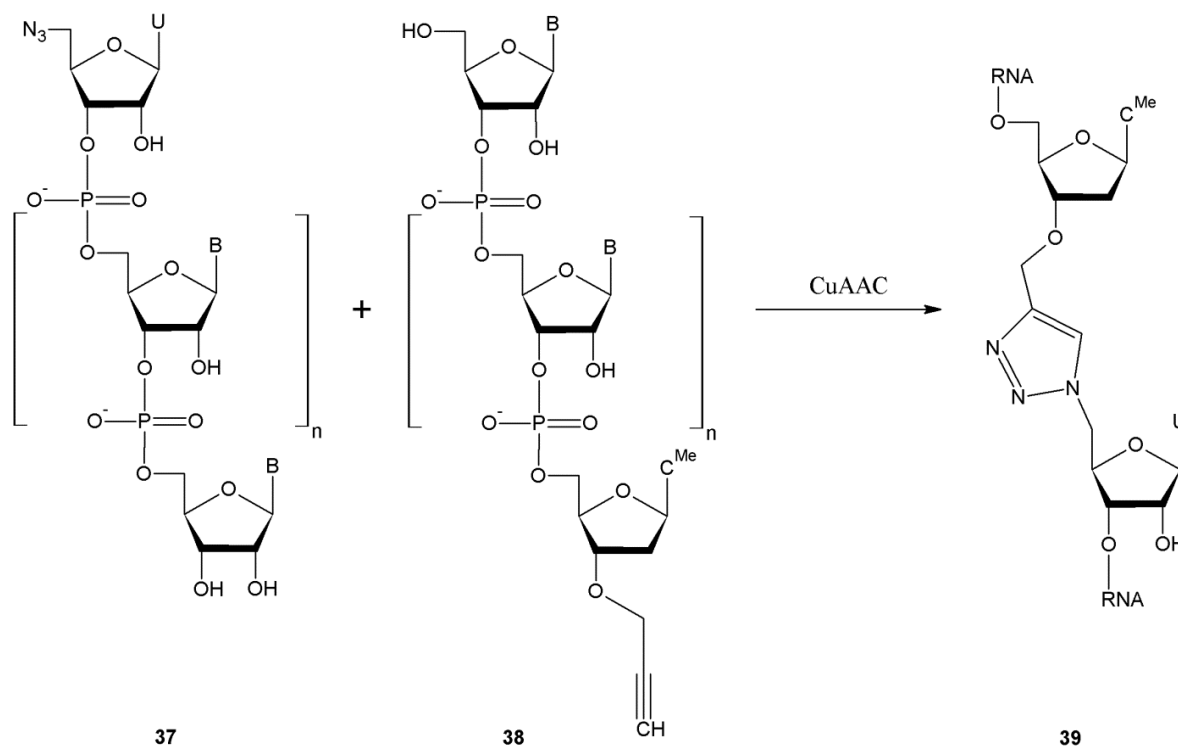


Schemat 11 Katalizowana promieniowaniem mikrofalowym synteza 10-meru analogu ^{TL}DNA

Otrzymany w ten sposób analog oligonukleotydu jest rozpuszczalny w wodzie do stężenia 7 μ mol/l, przy czym rozpuszczalność zwiększa się w obecności acetonitrylu. Temperatura topnienia dupleksu utworzonego przez produkt z nicią naturalnego komplementarnego DNA wynosi 61°C. Jest to wartość znacznie wyższa od temperatury topnienia dupleksu utworzonego przez dwie naturalne nici DNA (dA₁₀.dT₁₀), która wynosi 20°C. Autorzy sugerują, że korzystny wpływ na trwałość otrzymanego dupleksu, ma występująca w szkielecie analogu i powtarzająca się odległość sześciu wiązań pomiędzy łącznikami triazolowymi. Większa długość triazolowego fragmentu szkieletu, zdaje się destabilizować dwuniciową strukturę. Udało się również przeprowadzić zbieżną syntezę analogu oligonukleotydu o siedmiu i ośmiu jednostkach [104]. W jednym naczyniu przeprowadzono (one-pot synthesis) odblokowanie pochodnej alkinowej chronionej układem silylowym i sprzężanie typu CuAAC dwóch oligomerów. Analogi nukleotydów tego typu będą mogły konkurować z kwasem peptydonukleinowym (PNA) jeśli zostanie opracowana metoda syntezy ^{TL}DNA o mieszanej sekwencji, to znaczy oligomery będą zawierać wszystkie cztery zasady nukleinowe Watsona i Cricka w zadanej sekwencji.

2.3.2. Modyfikacje szkieletu RNA

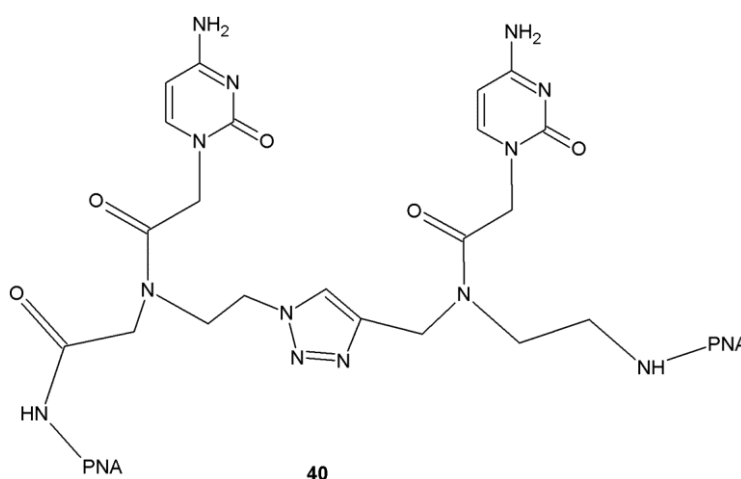
Podobnie jak w przypadku modyfikacji szkieletu DNA, badania nad RNA skupiają się na zamianie naturalnie występującego łącznika fosfodiesterowego na układ triazolowy. El-Sagheer i Brown przeprowadzili łączenie typu "Click" mniejszych polimerów rybo- i deoksyrybonukleotydowych sfunkcjonalizowanych podstawnikami alkinowymi lub azydkowymi. Reakcja CuAAC spełniała tu rolę enzymu ligazy. W tych eksperymentach udało się otrzymać serie katalitycznie aktywnych RNA lub DNA:RNA złożonych struktur rybozymów typu Hairpin i Hammerhead o długości około 100 nukleotydów [33]. Hybryda **39** została utworzona w wyniku reakcji CuAAC pomiędzy terminalnymi alkinem i azydkiem, umieszczonymi na końcach 3' lub 5' wolnych nici DNA lub RNA (**Schemat 12**). W wyniku reakcji substratu **37** - 5'-azydourudyny z substratem **38** - 3'-propargilo-2'-deoksycytydyny, otrzymano modyfikowane rybozimy typu Hairpin i Hammerhead wykazujące aktywność względem cząsteczek docelowych. Właściwości te świadczą o potencjalnej kompatybilności oligonukleotydów o zmodyfikowanym przez triazol szkielecie z naturalnymi kwasami nukleinowymi i związkami o aktywności biologicznej.



Schemat 12 Otrzymywanie hybryd DNA-RNA przy pomocy reakcji CuAAC

2.3.3. Pozostałe modyfikacje szkieletu kwasu nukleinowego

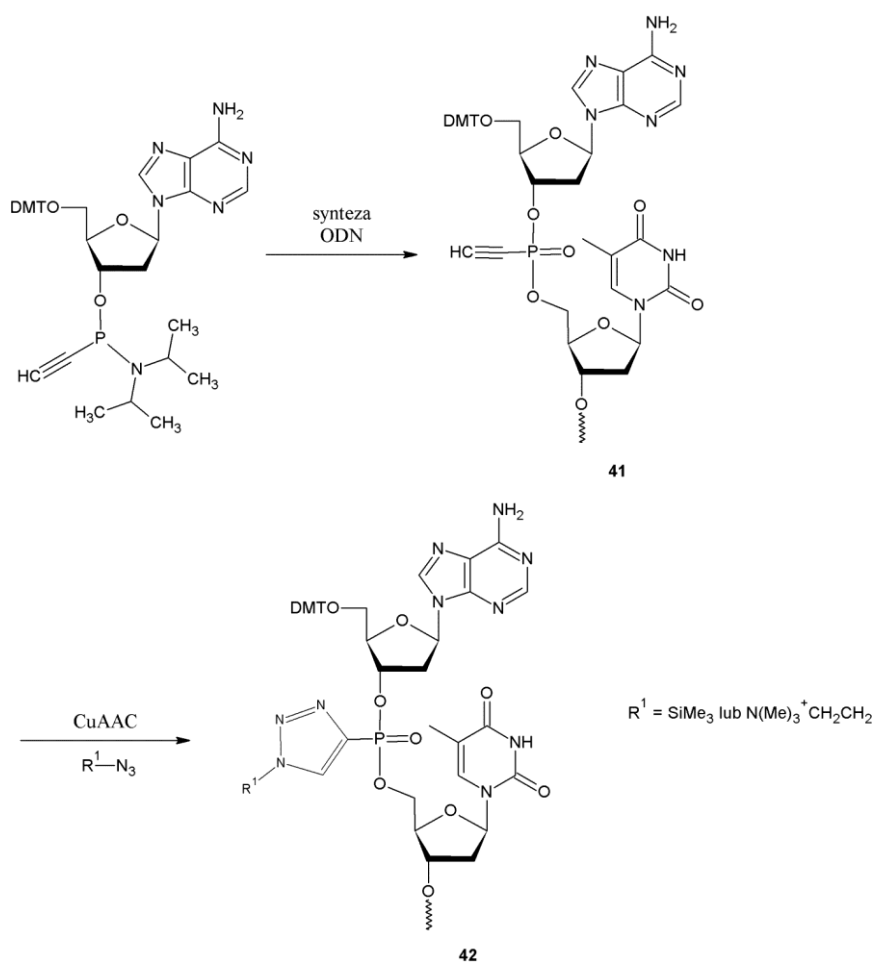
Grupa badawcza Winssingera dokonała substytucji łącznika amidowego w kwasie peptydonukleinowym (PNA - struktura imitująca oligonukleotyd, składająca się z powtarzających się jednostek N-(2-aminoetylo)glicyny), przez łącznik triazolowy [105]. Oligomery PNA posiadające terminalną grupę azydkową zostały otrzymane w standardowej procedurze Fmoc [106], następnie przeprowadzono ich sprzężanie w reakcji CuAAC z różnymi monomerami alkinowymi. W głównym produkcie, dimerze **40**, modyfikacja w postaci łącznika triazolowego miała niewielki wpływ na zdolność hybrydizacji modyfikowanej nici PNA i dokładność sekwencji syntetyzowanej nici (**Rysunek 13**). Te wyniki wskazują, że grupa triazolowa jest odpowiednim zamiennikiem łącznika amidowego w PNA, co można wykorzystać do sprzężania struktur PNA w reakcji CuAAC.



Rys.13 Struktura PNA łączonego układem triazolowym **40**

Krishna i Caruthers opracowali połączenie internukleotydu 1,2,3-triazolofosfonianowego (TP), w którym ugrupowanie 1,2,3-triazolowe związane jest przez heterocykliczny atom węgla C4 z układem fosfonianowym [49]. Otrzymane połączenia 1,2,3-triazolofosfoniano-internukleotydu **42** są tworzone w procesie dwuetapowym. W pierwszym kroku wprowadzono połączenie internukleotydu zawierające ugrupowanie alkinowe **41**, wykorzystując klasyczną metodę amidofosforynową. W drugim etapie wykorzystano reakcję CuAAC z wybranymi azydkami tworząc układ triazolowy, jeszcze przed odłączeniem

syntetyzowanego oligonukleotydu od podłoża stałego (**Schemat 13**). W ten właśnie sposób udało się otrzymać chimery oligonukleotydowe zbudowane z 16-23 merów, zawierające do sześciu modyfikacji 1,2,3-triazolofosfonianowych jak i innych modyfikacji [107]. Dalsze badania pozwoliły stwierdzić, że tak modyfikowane układy są wysoce odporne na działanie egzonukleaz. Pomiary temperatury topnienia uwidocznily niewielką destabilizację przy hybrydyzacji tak modyfikowanego oligonukleotydu z komplementarnym RNA. Fluorescencyjnie znakowany oligonukleotyd zbudowany z 16 zasad i dwóch połączeń typu 1,2,3-triazolofosfonianowego, został z sukcesem wychwycony przez komórki ssaka podczas transfekcji. Ta metodologia wykorzystania chemii "Click" daje możliwość prowadzenia wielu istotnych modyfikacji szkieletu oligonukleotydu, bez ryzyka zmniejszenia zdolności produktu do hybrydyzacji z komplementarnym łańcuchem DNA lub RNA.



Schemat 13 Synteza łącznika internukleotydowego 1,2,3-triazolofosfonianowego

2.4. Biosprężenia

Modyfikacje tego typu polegają na generowaniu połączeń pomiędzy cząsteczką oligonukleotydu i wybranymi strukturami biologicznymi. Takie połączenia zmieniają właściwości wyjściowego oligonukleotydu, przykładowo możliwe jest zwiększenie zdolności transportu syntetycznych oligonukleotydów do określonych komórek czy tkanek, poprzez przyłączenie do nich cząsteczek białek, lipidów czy cukrów. Z kolei fluorescencyjne znakowanie syntetycznych oligonukleotydów umożliwia nam śledzenie jaką funkcję sprawują i jak się zachowują w układach biologicznych [108]. Wiele barwników jest wprowadzanych post-syntetycznie do struktury DNA czy RNA, po czym przeprowadza się deprotekcję [109]. We wszystkich tych celach zastosowanie chemii CuAAC okazało się bardzo praktyczne, ze względu na niezawodność sprzęgania, wydajność procesu i stabilność substratów jak i produktów w środowisku biologicznym.

Pomimo tylu możliwych zastosowań chemii CuAAC w modyfikacji oligonukleotydów, dużym utrudnieniem jest niemożliwość stosowania katalizy jonami miedzi (I) w organizmach żywych z powodu ich toksyczności. Jony miedzi mogą powodować uszkodzenia DNA i RNA co ostatecznie prowadzi do przerywania ich nici [110]. Z tego powodu prowadzone są badania nad niekatalizowaną wersją reakcji. Dotychczasowe poszukiwania skupiają się wokół zastosowania nietoksycznych pochodnych cyklooktynu, które mogą ulegać reakcji SPAAC (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition) - katalityczny wpływ ma naprężenie struktury cyklooktynu i niepotrzebna jest obecność jonów miedzi (I) [111,112].

Procesy funkcjonalizacji kwasów nukleinowych w celu poszukiwania nowych właściwości biologicznych jak i rozwój nowych nanomateriałów dobrze rokują na przyszłość. Reakcja typu katalizowanej jonami miedzi (I) cykloaddycji Huisgena [3+2] okazała się bardzo wydajnym narzędziem, w porównaniu do klasycznych metod modyfikacji kwasów nukleinowych. Selektywne sprzęganie azydków z alkinami z utworzeniem 1,4-regioizomeru w szerokim spektrum warunków daje bardzo wiele możliwości prowadzenia modyfikacji DNA i RNA. Jeśli dodamy do tego ilość modyfikowalnych pozycji w strukturze kwasów nukleinowych, otrzymujemy praktycznie nieskończone możliwości kreacji nowych biopolimerów, leków przeciwwirusowych i struktur wyciszających wadliwe geny.

IV. Dyskusja wyników

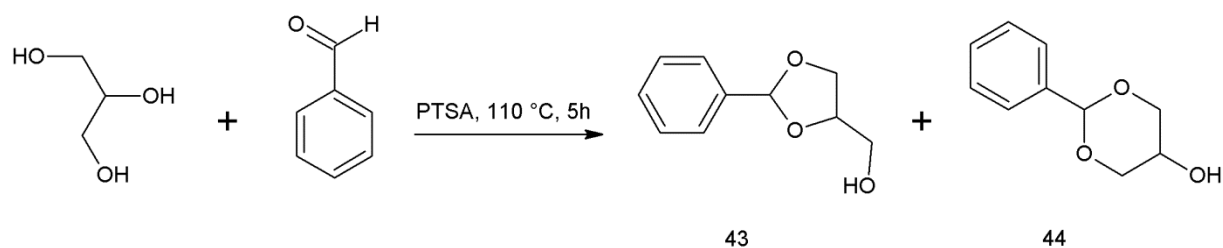
W mojej pracy badawczej, zamiast modyfikować złożone układy nukleozydowe, przyjąłem strategię syntezy bloków budulcowych *de novo* z możliwie prostych substratów. W pierwszej kolejności przeprowadziłem reakcje otrzymywania bloków posiadających grupę funkcyjną azydkową lub alkinową, żeby następnie przeprowadzić próby syntezy acyklicznych analogów nukleozydów o różnych zasadach azotowych. W następnym etapie pracy wprowadziłem grupy blokujące odpowiednie w procesie zautomatyzowanej syntezy oligodeoksynukleotydów na podłożu stałym. Przeprowadziłem reakcje typu „Click” otrzymując układy dinukleotydydowe, które włączyłem do łańcucha 12-meru DNA podczas syntezy automatycznej. W ostatnim etapie przeprowadziłem oczyszczanie nici oligomerów na HPLC i wykonałem testy stabilności i trwałości dupleksów DNA posiadających modyfikowane nici.

1. Synteza alkinowego bloku budulcowego

W pierwszej kolejności przeprowadziłem próby syntezy bloku budulcowego posiadającego alkinową grupę funkcyjną. Udało mi się otrzymać spodziewany produkt z zadowalającą wydajnością w pięcioetapowym szeregu reakcji.

1.1. Synteza 2-fenylo-1,3-dioksan-5-olu (44)

Cząsteczkę gliceryny poddałem reakcji blokowania za pomocą aldehydu benzoowego w obecności kwasowego katalizatora (**Schemat 14**). Reakcję prowadziłem w toluenie z użyciem nasadki azeotropowej.



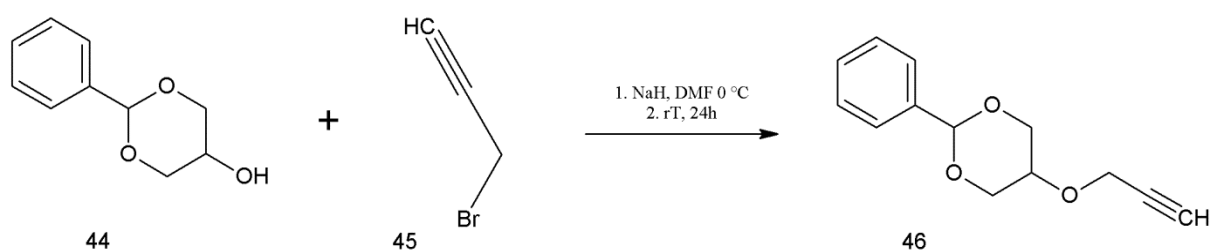
Schemat 14

Proces przebiegał tak długo, aż z mieszaniny reakcyjnej przestała wydzielać się woda, którą odprowadzałem z układu reakcyjnego dzięki nasadce Deana-Starka. Mieszaninę reakcyjną zobojętniłem za pomocą roztworu wodorotlenku potasu, a po ekstrakcji uzyskałem mieszaninę dwóch produktów w fazie organicznej. W przypadku blokowania 1,2,3-trioli zastosowanie grupy ochronnej izopropylidenowej prowadzi do pochodnej 1,2-dipodstawionej. Natomiast użycie grupy ochronnej benzylidenowej prowadzi również do otrzymania 1,3-acetalu. Zgodnie z literaturą [113,114] konkurencyjnym produktem jest związek **43** a produktem, który mnie interesował, był powstający z mniejszą wydajnością związek **44**. Związek **44** krystalizował z mieszaniny toluen-heksan (w stosunku objętościowym 5:3) po mocnym ochłodzeniu w zamrażarce. Osad po odsączeniu i przemyciu heksanem przechowywałem w lodówce.

Związek znany jest w literaturze i został przebadany spektroskopowo [113]. Wykonana przeze mnie analiza ^1H NMR potwierdziła zgodność z opisem literaturowym, potwierdzając właściwą identyfikację produktu.

1.2. Synteza 2-fenylo-5-(prop-2-ynyl-1-oksy)-1,3-dioksanu (**46**)

Produkt wcześniejszej reakcji (**44**) poddałem reakcji z bromkiem propargilu, wykorzystując metodę alkilowania soli sodowej, powstającej w wyniku reakcji z wodorkiem sodu. W pierwszym etapie reakcji do ochłodzonego roztworu substratu (**44**) w DMF, dodawałem ostrożnie wodorek sodu. W drugiej części dodałem bromku propargilu (**45**) do mieszaniny reakcyjnej i kontynuowałem syntezę w temperaturze pokojowej przez prawie dobę (**Schemat 15**).



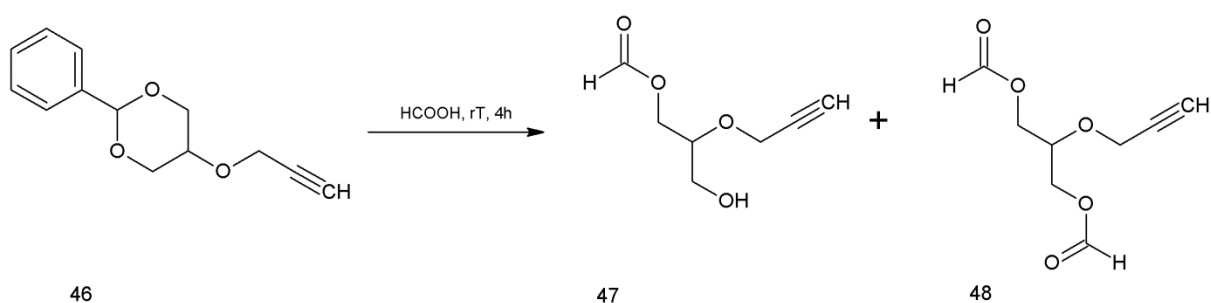
Schemat 15

Mieszaninę poreakcyjną rozdzielałem chromatograficznie, uzyskując produkt **46**, który zidentyfikowałem za pomocą metod spektroskopowych ^1H NMR oraz ^{13}C NMR.

W widmie protonowym widoczny jest multiplet przy 2,43 ppm pochodzący od terminalnego atomu wodoru grupy alkinowej. Drugim potwierdzeniem wprowadzenia grupy propargilowej jest widoczny dublet dubletów przy 4,09 ppm. Obecność blokady benzylidenu potwierdzają multiplety przy 7,35 ppm i 7,50 ppm, pochodzące od grupy fenylowej.

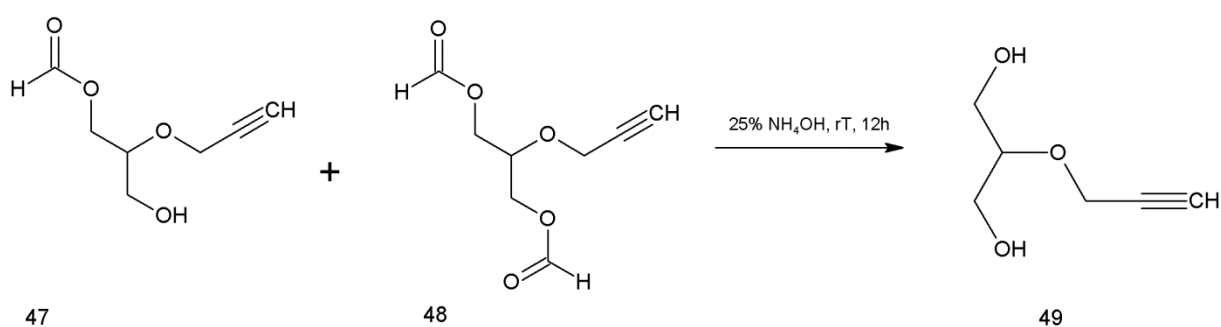
1.3. Synteza 2-(prop-2-yn-1-oksy)-propan-1,3-diolu (**49**)

W kolejnym etapie syntezy związek **46** poddałem reakcji zdjęcia blokady benzylidenu. Tego typu acetale rozszczepiane są w procesie hydrolizy kwasowej. Reakcję prowadziłem w roztworze kwasu mrówkowego, tak długo aż na płytce TLC substrat reakcji nie był już widoczny. W mieszaninie poreakcyjnej, oprócz produktu odblokowanego, obecne były dodatkowe związki. Założyłem, że są to produkty reakcji mono- (**47**) i diestryfikacji (**48**) pożądanego związku z kwasem mrówkowym (Schemat 16).



Schemat 16

W drugiej części procesu odblokowania przeprowadziłem, w związku z tym, hydrolizę powstałych estrów umieszczając mieszaninę produktów w stężonym roztworze amoniaku (**Schemat 17**). Po 12 godzinach na płycie TLC nie było już widocznych śladów zestyfikowanych związków, jedynym produktem była odblokowana cząsteczka posiadająca alkinowy podstawnik (**49**).



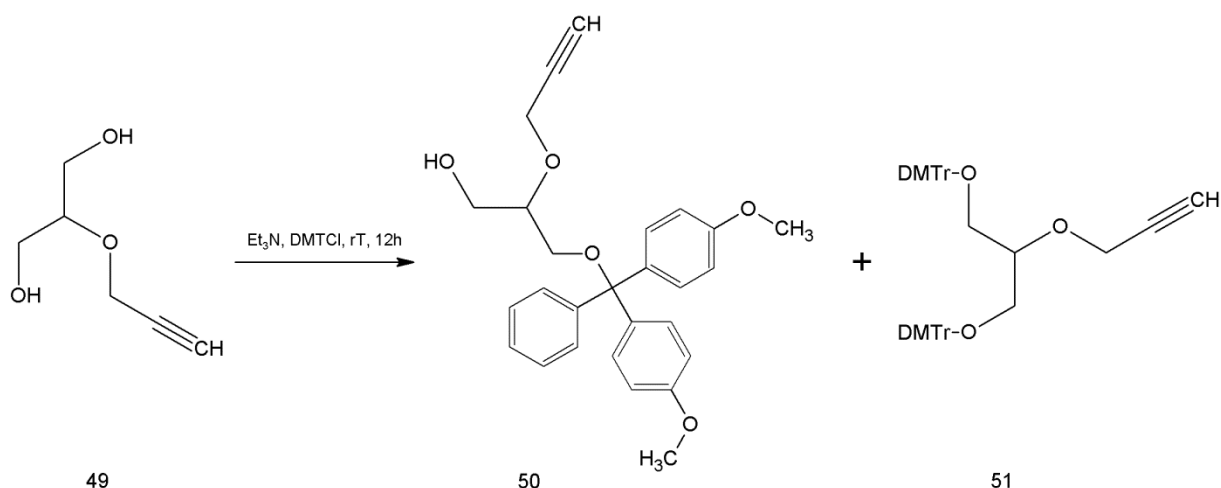
Schemat 17

Strukturę związku potwierdziłem wykonując analizę ¹H NMR. W widmie protonowym nadal obecne są sygnały pochodzące od grupy propargilowej (2,93 ppm i 4,11 ppm), natomiast nie można zaobserwować pików od blokady benzyliidowej. Odblokowanym grupom hydroksylowym przypisałem tryplet przy 1,34 ppm.

1.4. Synteza 3-dimetoksytrytylo-2-(prop-2-yn-1-oksy)-propan-1-olu (50)

Dużym problemem na tym etapie syntezy była konieczność zablokowania jednej z dwóch równoważnych pierwszorzędowych grup hydroksylowych w cząsteczce substratu (**49**). Postanowiłem zastosować grupę ochronną o dużej objętości przestrzennej, żeby wykorzystać mniejszą tendencję związku do ulegania dipodstawieniu ze względów sterycznych. Pierwszym pomysłem było użycie blokady dimetoksytrytylowej, której wprowadzenie było

celowe ze względu na dalszą syntezę i ostateczne zastosowanie tak zmodyfikowanego bloku budulcowego w syntezie oligodeoksynukleotydu. Próbne syntezы prowadziłem w zmniejszonej skali by ograniczyć zużycie odczynnika blokującego (**Schemat 18**). Nie udało mi się otrzymać wyłącznie monopodstawionego produktu (**50**), konkurencyjnie powstał również produkt dipodstawiony (**51**). Nieprzereagowany substrat jest na tyle polarnym związkiem, że odzyskanie go po zakończonej reakcji, wymagało ekstrakcji z fazy wodnej specjalnie przygotowaną fazą organiczną – chloroform/izopropanol w stosunku objętościowym 3:1. Znaczna ilość odczynnika – chlorku dimetoksytrytylu, była używana na stworzenie niepożądanego związku dipodstawionego. Nie potwierdziło się założenie, że zawada przestrzenna wyhamuje reakcję dipodstawienia.



Schemat 18

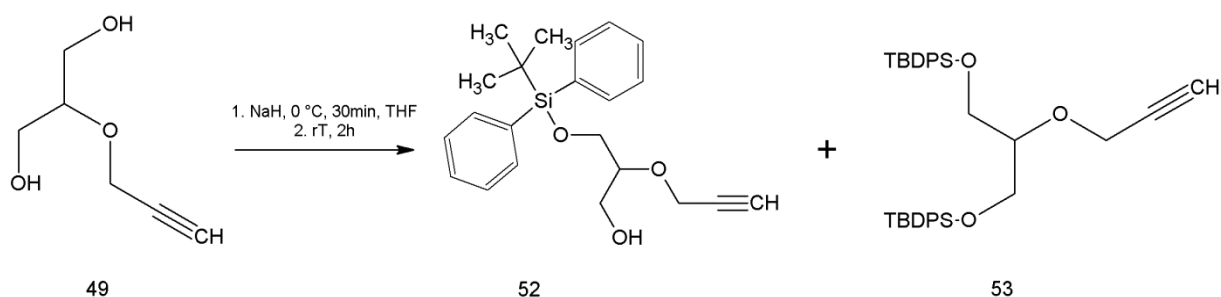
Ponieważ reakcje próbne wykazały powstawanie pożądanego produktu z niewysoką wydajnością, postanowiłem wykorzystać inną grupę ochronną.

Struktury produktów określiłem analizując widma ^1H NMR. Dla interesującego mnie produktu monopodstawionego (**50**) uzyskałem potwierdzenie wprowadzenia grupy ochronnej dimetoksytrytylowej, w postaci rozległego multipletu w zakresie 7,47-6,76 ppm. Obecny w tej blokadzie grupom metoksyłowym przypisałem singlet przy 3,79 ppm. Obecność ugrupowania propargilowego potwierdza tryplet przy 2,43 ppm, pochodzący od terminalnego atomu wodoru, oraz dwa dublety dubletów przy 4,24 ppm i 4,34 ppm.

Masę molową związku potwierdziłem w oparciu o widmo ESI MS, w którym obecne są sygnały jonu molekularnego odpowiadające masie związku **50** o m/z 455 $(M+Na)^+$ i 471 $(M+K)^+$ w zakresie jonów dodatnich.

1.5. Synteza 2-(prop-2-yn-1-oksy)-3-(*tert*-butylodifenylosililo)-propan-1-olu (**52**)

Z powodu niskiej wydajności reakcji monopodstawienia grupą dimetoksytrytylową w pozycji pierwszorzędowej grupy hydroksylowej, postanowiłem przetestować inną przestrzennie obszerną grupę blokującą. W drugiej próbie selektywnej ochrony grupy hydroksylowej zastosowałem układ *tert*-butylodifenylosililowy (**Schemat 19**).



Schemat 19

W pierwszym etapie aktywowałem cząsteczkę substratu, przez utworzenie soli sodowej, powstającej w wyniku reakcji z wodorkiem sodu (w stosunku molowym substratów 1:1, w temperaturze 0°C). Następnie wprowadzałem do układu chlorek *tert*-butylodifenylosililowy i kontynuowałem reakcję przez około dwie godziny – do osiągnięcia przez układ temperatury pokojowej. Ta reakcja również przebiega z utworzeniem dwóch konkurencyjnych produktów, ale w tym przypadku wydajność produktu monopodstawienia (**52**) jest wyższa niż w przypadku reakcji trytylowania. Dłuższy czas prowadzenia reakcji powodował powstanie produktu dipodstawionego (**53**) w większej ilości, co było widoczne podczas kontroli przebiegu reakcji za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Wymagało to zoptymalizowania warunków reakcji i ustalenia najkorzystniejszego momentu zakończenia

syntezy. Optymalny był czas prowadzenia reakcji, wynoszący dwie godziny. Stosunek ilości powstałego monopodstawionego produktu do konkurencyjnego związku dipodstawionego oraz nieprzereagowanego substratu, był wtedy najbardziej korzystny. Z wydajnością reakcji względem produktu monopodstawionego wynoszącą 53%.

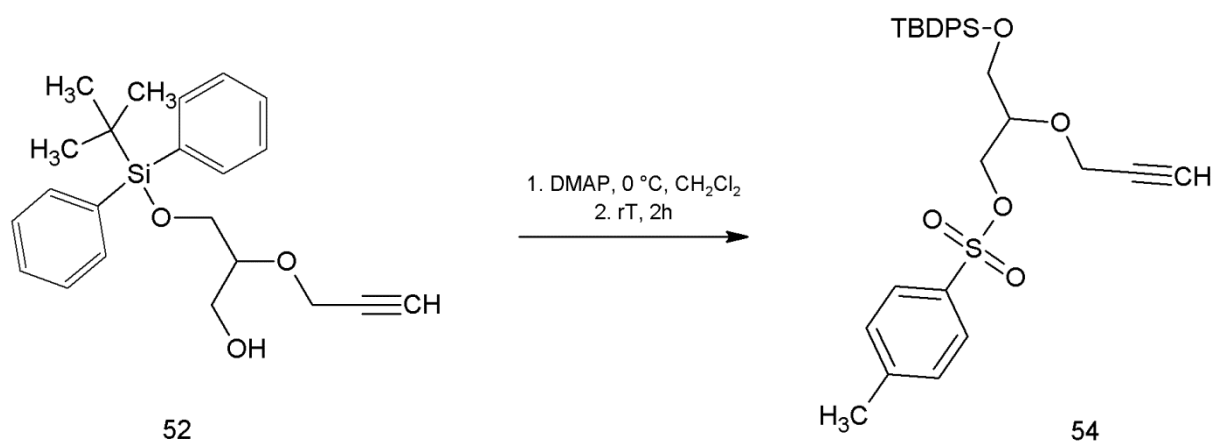
Interesujący mnie produkt monopodstawiony (**52**) oddzieliłem podczas chromatografii kolumnowej i zidentyfikowałem go za pomocą metod spektroskopowych ^1H NMR oraz ^{13}C NMR.

W widmie protonowym uzyskałem potwierdzenie wprowadzenia grupy ochronnej TBDPS do cząsteczki substratu. W szerokim zakresie od 7,72-7,63 ppm oraz 7,49-7,34 ppm widoczne są multiplety od pierścieni fenylowych blokady TBDPS. Ponadto przy 1,06 ppm widoczny jest bardzo intensywny singlet pochodzący od grupy *tert*-butylowej. Do trypletu przy 2,41 ppm przypisałem terminalny atom wodoru grupy propargilowej.

Masę molową związku potwierdziłem w oparciu o widmo ESI MS, w którym obecne są sygnały jonu molekularnego odpowiadające masie związku **52** o m/z 391 ($\text{M}+\text{Na}$)⁺ i 407 ($\text{M}+\text{K}$)⁺ w zakresie jonów dodatnich.

1.6. Synteza 2-(prop-2-yn-1-oksy)-3-(tert-butylodifenylosililo)-1-tosylopropanu (54)

Ostatnim krokiem syntezy alkinowego bloku budulcowego było zaktywowanie wolnej grupy hydroksylowej substratu (**52**) do reakcji sprzęgania z zasadami azotowymi. Dokonałem tego przez wprowadzenie w tej pozycji *p*-toluenosulfonowej grupy ochronnej - grupy dobrze odchodzącej (**Schemat 20**). Jako katalizatora reakcji użyłem 4-dimetyloaminopirydyny i prowadziłem reakcję tosylowania w temperaturze 0°C.



Schemat 20

Po zakończonej reakcji przeprowadziłem ekstrakcję z użyciem nasyconego roztworu kwaśnego węgla sodu, żeby zneutralizować cząsteczki kwasu powstającego w czasie reakcji. W celu oczyszczenia produktu reakcji (**54**) zastosowałem chromatografię kolumnową z użyciem mieszaniny dichlorometanu z heksanem – jako niepolarniej fazy wymywającej. Po oddzieleniu produktu reakcji, przeprowadziłem analizę spektralną czystego związku za pomocą ¹H NMR i ¹³C NMR.

Analiza protonowego widma produktu wykazała wprowadzenie do cząsteczki substratu grupy ochronnej tosyłowej. Przy 2,42 ppm obecny jest singlet pochodzący od grupy CH₃ z blokady tosyłowej. Bardzo szeroki multiplik w przedziale 7,82-7,26 ppm pochodzi od 14 atomów wodoru pierścieni aromatycznych grupy ochronnej TBDPS jak i tosyłowej. Obecność ugrupowania *tert*-butylowego potwierdza bardzo intensywny singlet dla 9 atomów wodoru przy 0,99 ppm. Natomiast tryplet przy 2,32 ppm dowodzi obecności ugrupowania alkinowego w cząsteczce.

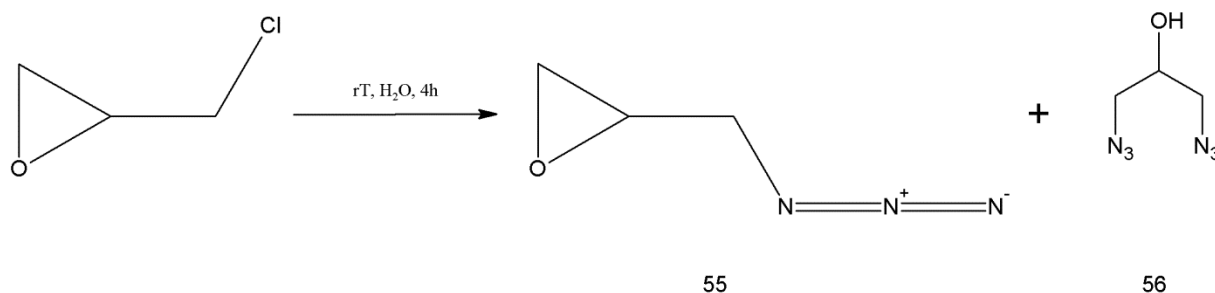
Masę molową związku potwierdziłem w oparciu o widmo ESI MS, w którym obecne są sygnały jonu molekularnego odpowiadające masie związku **54** o m/z 545 (M+Na)⁺ i 561 (M+K)⁺ w zakresie jonów dodatnich.

2. Synteza azydowego bloku budulcowego

Drugim etapem mojej pracy było otrzymanie bloku budulcowego posiadającego azydkową grupę funkcyjną. Istotne dla mnie było możliwie największe uproszczenie procedury, co udało się osiągnąć przez azydowanie epichlorohydryny jako substratu wyjściowego.

2.1. Synteza 2-(azydometylo)oksyranu (55)

Synteza tego bloku budulcowego była jednoetapowym procesem, którego monopodstawiony produkt wymagał dobrego oczyszczenia. Do roztworu epichlorohydryny wkraplałem roztwór azydku sodu w małych porcjach i w dość długim czasie (2-3 godziny). W ten sposób starałem się wymusić powstawanie pochodnej monopodstawionej, możliwie ograniczając efekt dipodstawienia (**Schemat 21**).



Schemat 21

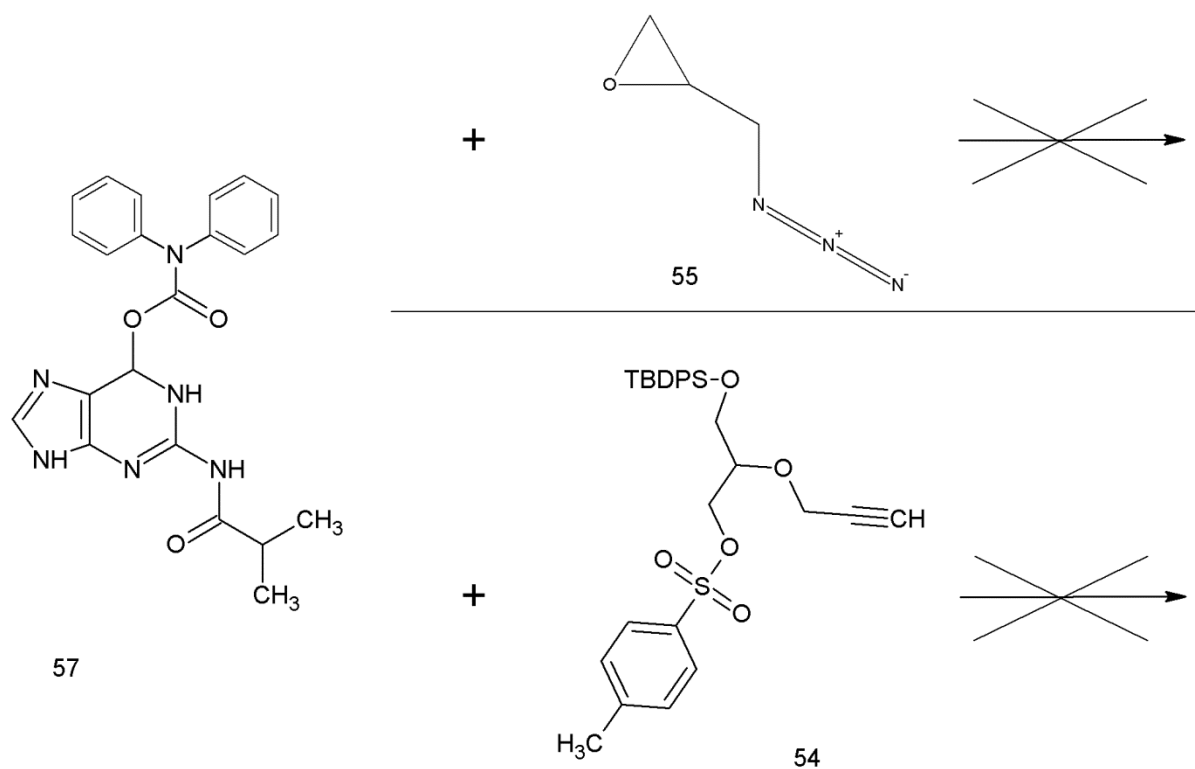
Mieszaninę produktów oczyszczałem na kolumnie chromatograficznej, co umożliwiło oddzielenie produktu mono-(**55**) i dipodstawionego (**56**). Bardziej polarny produkt **56** widoczny był na płytce TLC trochę niżej niż interesujący mnie związek **55**. Następnie fazę zawierającą produkt monopodstawiony destylowałem pod zmniejszonym ciśnieniem, żeby oddzielić produkt od nieprzereagowanej epichlorohydryny, której nie dawało się oddzielić chromatograficznie. Pod ciśnieniem atmosferycznym temperatura wrzenia epichlorohydryny wynosi 115-116°C, natomiast wyznaczona na podstawie bazy danych temperatura wrzenia związku **55** w tych samych warunkach, wynosi 128-129°C. Podczas destylacji pod zmniejszonym ciśnieniem (1,5 mm Hg) zbierałem epichlorohydrynę w zakresie temperatur

28-30°C. W temperaturze wynoszącej około 40-45°C zbierałem produkt **55**, którego czystość sprawdzałem za pomocą techniki GC-MS. Najczystsza z zebranych frakcji zawierała 93% produktu monopodstawionego (**55**) i niewielkie zanieczyszczenie nieprzereagowaną epichlorohydryną.

Związek (**55**) znany jest w literaturze i został przebadany spektroskopowo [115]. Wykonana przeze mnie analiza ^1H NMR potwierdziła zgodność z opisem literaturowym, potwierdzając właściwą identyfikację produktu.

3. Wykorzystanie otrzymanych bloków budulcowych w syntezie acyklicznych analogów nukleozydów.

Otrzymane we wcześniejszych procedurach bloki budulcowe- alkinowy (**54**) oraz azydkowy (**55**), wykorzystałem w syntezie acyklicznych analogów nukleozydów. Podjąłem próby sprzężenia bloków budulcowych z różnymi zasadami azotowymi, zarówno purynowymi i pirymidynowymi. Niezależnie od metody prowadzenia dalszej syntezy, najslabsze wyniki uzyskałem dla prób sprzężenia z blokową guaniną (**57**). W wyniku reakcji nie doszło do utworzenia produktu, a jedynie do odblokowania grup ochronnych znajdujących się w cząsteczce 2-izobutyrylo-6-O-difenylokarbamoilguaniny (**Schemat 22**).



Schemat 22

W przypadku bloku budulcowego alkinowego najlepsze wyniki osiągnąłem przy sprzężeniu z adeniną. Próby sprzężenia z zasadami pirymidynowymi nie dały zadawalających wyników. Reakcja z benzoilowaną cytozyną zachodziła lepiej niż sprzężenie z tyminą, ale wydajność obu reakcji była na tyle niska, że dalsze reakcje z udziałem tych pochodnych nie dawały pożądaných rezultatów, mimo prób reakcji w różnych warunkach.

W przypadku bloku budulcowego posiadającego podstawnik azydkowy, najlepsze wyniki osiągnąłem dla reakcji sprzęgania z adeniną i tyminą. Reakcja z benzoilowaną cytozyną zachodziła z niską wydajnością.

3.1. Synteza acyklicznych analogów nukleozydów w reaktorze mikrofalowym.

Na tym etapie pracy podjąłem próby syntezy acyklicznych analogów nukleozydów z wykorzystaniem reaktora mikrofalowego. Technika syntezy organicznej z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego, jest już dobrze znana i stosowana na szeroką skalę. Jej zaletą jest zdalne przekazywanie energii na sposób promieniowania mikrofalowego, co umożliwia bezpośrednie ogrzanie reagentów w mieszaninie, bez konieczności ogrzewania naczynia, w którym się znajdują. Jeśli piec mikrofalowy jest odpowiednio skonstruowany i możliwa jest w nim praca pod wysokim ciśnieniem, to można gwałtownie podnieść temperaturę mieszaniny nawet powyżej temperatury wrzenia rozpuszczalnika, co daje jeszcze lepszy efekt katalityczny. Wzrost temperatury powinien być jednolity w całej objętości badanej próbki, co prowadzi do mniejszej ilości produktów ubocznych i zmniejsza szanse na rozkład związków,

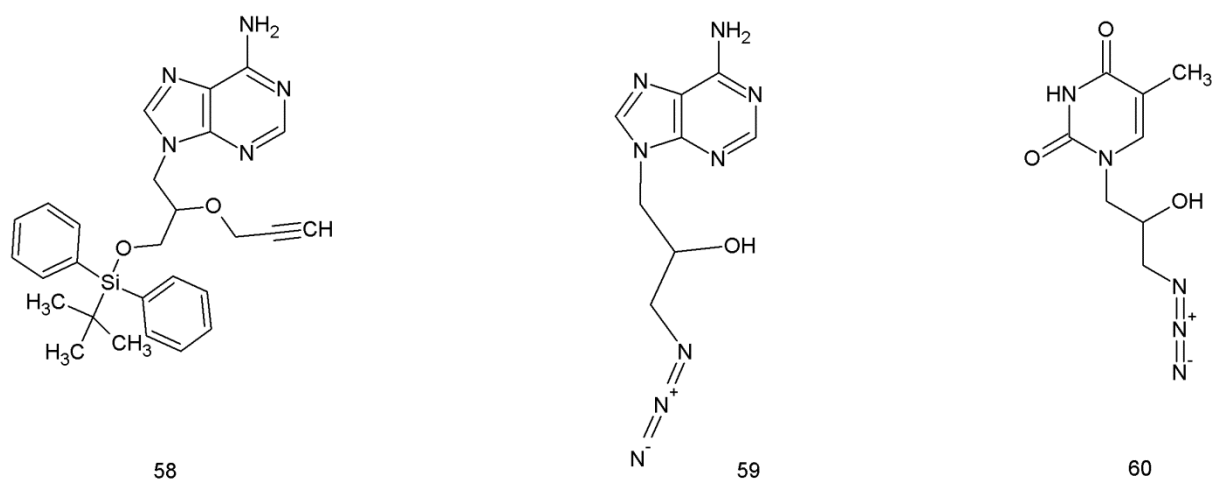
W moim projekcie badawczym wykorzystałem reaktor mikrofalowy – MARS 6 firmy CEM Corporation. Wszystkie testy prowadziłem przy ciśnieniu atmosferycznym. W reakcjach sprzęgania bloków budulcowych z zasadami, stosowałem jako rozpuszczalnik DMF, dlatego temperaturę procesu ustawiłem nieznacznie poniżej temperatury wrzenia rozpuszczalnika- na 140°C . W ustawieniach metody zdecydowałem się na możliwie krótki czas intensywnego narostu temperatury (Ramp time), wynoszący 1 minutę. W pierwszych próbach czas reakcji był stosunkowo niedługi (Hold time) i wynosił 5 minut. Po każdym 6 minutowym cyklu, układ chłodził się, a ja pobierałem próbkę i wykonywałem analizę TLC. Okazało się, że postęp reakcji jest na tyle wolny, że mogłem znacząco wydłużyć czas utrzymywania zadanej temperatury (Hold time). W dalszych testach, pobierałem próbki do chromatografii cienkowsarstwowej w odstępach 30 minutowych. Analiza płytek TLC pozwoliła mi wyciągnąć wnioski, że po 4-5 godzinach procesu większa część substratów przereagowała. Po tym czasie nie widać już znaczących różnic na płycie TLC. Z tego powodu zdecydowałem się prowadzić swoje syntezy w 8-10 cyklach 30 minutowych, kontrolując przebieg reakcji za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej. Reakcje kończyłem po 4-5 godzinach, uzyskując

wyniki porównywalne z reakcją sprzęgania prowadzoną w temperaturze 60°C i przy ciśnieniu atmosferycznym, przez 72 godziny.

3.2. Synteza acyklicznych analogów nukleozydów metodą klasyczną.

Analogicznie jak w procedurze wykorzystującej promieniowanie mikrofalowe, prowadziłem reakcję substytucji nukleofilowej grupy tosylowej w bloku alkinowym, albo N-alkilowania zasady heterocyklicznej w przypadku bloku azydkowego (**Rysunek 14**). W reakcjach obu typów użyłem jako katalizatora bezwodny węgiel potasu. Ta metodyka różniła się tylko wydłużonym czasem reakcji- 72 godziny, oraz konwencjonalną metodą ogrzewania za pomocą łaźni olejowej do 60°C. Analiza przebiegu reakcji za pomocą chromatografii cienkowarstwowej wykazała wyższą wydajność tak prowadzonej reakcji w stosunku do procesu mikrofalowego, co było najprawdopodobniej spowodowane znacznie dłuższym czasem reakcji.

W przypadku tych syntez okazało się, że nie obserwuje się korzystnych efektów stosowania promieniowania mikrofalowego – reakcje przebiegały podobnie.



Rys. 14

W wyniku reakcji sprzęgania zasad azotowych ze zsyntetyzowanymi wcześniej blokami budulcowymi, otrzymałem dwa acykliczne analogi adenozyiny – jeden zawierający alkinową grupę funkcyjną (**58**), a drugi ugrupowanie azydkowe (**59**). Drugim typem acyklicznego analogu nukleozydu jaki otrzymałem, był analog tymidyny posiadający podstawnik azydkowy (**60**). Wszystkie związki zostały przebadane metodami spektroskopowymi, co potwierdziło ich struktury.

Dla produktu **58** przeprowadziłem analizę ^1H NMR oraz ^{13}C NMR. Widmo protonowego rezonansu magnetycznego potwierdziło obecność grupy ochronnej TBDPS. Przy 1,00 ppm widoczny jest bardzo intensywny singlet od 9 atomów wodoru grupy *tert*-butylowej, a w zakresie 7,67-7,36 ppm widoczny jest multiplet o integracji 10 atomów wodoru z dwóch grup fenylowych. Tryplet przy 3,25 ppm potwierdza obecność alkinowej grupy funkcyjnej. Natomiast o powodzeniu reakcji sprzęgania z adeniną świadczą trzy singlety. Sygnał przy 7,18 ppm pochodzi od dwóch atomów wodoru z egzoaminowej grupy NH_2 adeniny. Singlety przy 8,03 ppm i 8,14 ppm przypisałem odpowiednio protonom H-8 i H-2 adeniny.

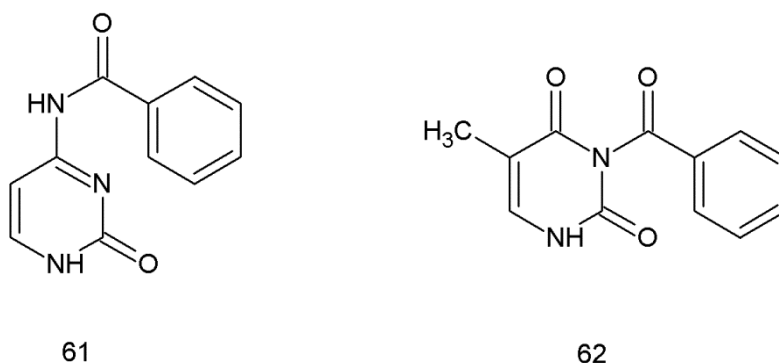
Dla produktu **59** przeprowadziłem analizę ^1H NMR, która potwierdziła powodzenie przeprowadzonej reakcji sprzęgania bloku budulcowego z adeniną. Sygnał przy 7,21 ppm pochodzi od dwóch atomów wodoru z egzoaminowej grupy NH_2 adeniny. Singlety przy 8,05 ppm i 8,14 ppm przypisałem odpowiednio protonom H-8 i H-2 adeniny. Przy 4,20 ppm znajduje się multiplet, który przypisałem jednemu protonowi H-2 azydkowego bloku budulcowego. Natomiast przy 5,65 ppm znajduje się dublet pochodzący od atomu wodoru sąsiedniej wolnej grupy hydroksylowej.

Dla produktu **60** przeprowadziłem analizę ^1H NMR, która potwierdziła powodzenie przeprowadzonej reakcji sprzęgania bloku budulcowego z tyminą. Dublet przy 1,75 ppm pochodzi od grupy metylowej tyminy, a przy 11,23 ppm znajduje się singlet pochodzący od grupy endoaminowej tyminy. Pozostałe sygnały potwierdzają strukturę acyklicznego fragmentu zawierającego podstawnik azydkowy. Przy 3,91 ppm znajduje się multiplet, który przypisałem jednemu protonowi H-2 azydkowego bloku budulcowego. Natomiast przy 5,56 ppm znajduje się dublet pochodzący od atomu wodoru sąsiedniej wolnej grupy hydroksylowej.

Masę molową związku potwierdziłem w oparciu o widmo ESI MS, w którym obecne są sygnały jonu molekularnego odpowiadające masie związku **60** o m/z 248 $(\text{M}+\text{Na})^+$ i 264 $(\text{M}+\text{K})^+$ w zakresie jonów dodatnich.

W przeprowadzonych przeze mnie próbach sprzęgania wykorzystałem również benzoilowane pochodne cytozyny oraz tyminy (**Rysunek 15**). Obie pochodne otrzymałem zgodnie ze znanymi protokołami [116-118]. W obu przypadkach zastosowanym przeze mnie czynnikiem wprowadzającym grupę ochronną był chlorek benzoilu. Otrzymanie N⁴-benzoilocytozyny (**61**) potwierdziłem przez pomiar temperatury topnienia strąconego produktu oraz porównanie z autentyczną próbką. Temperatura topnienia wyniosła, zgodnie z danymi literaturowymi, 347°C.

Związki znane są w literaturze i zostały przebadane spektroskopowo [118-120]. Wykonana przeze mnie analiza ¹H NMR potwierdziła zgodność z opisem literaturowym, potwierdzając właściwą identyfikację produktu.



Rys. 15

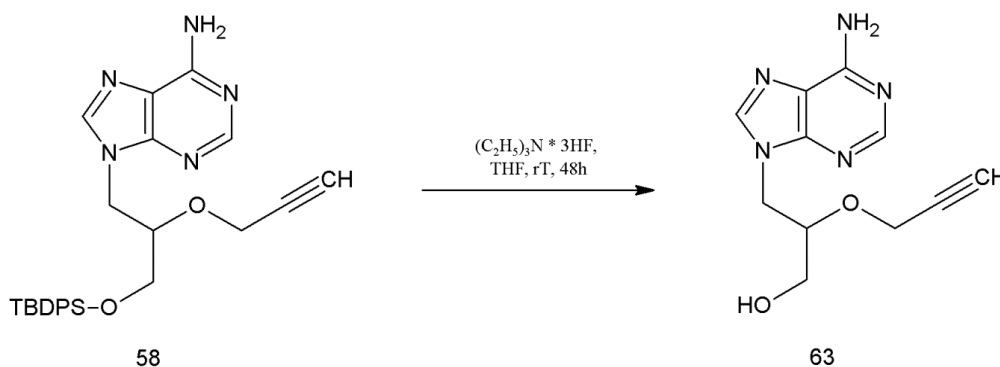
Niestety przeprowadzone przez mnie próby wykorzystania tych benzoilowanych zasad w reakcjach sprzęgania z blokami budulcowymi **54** i **55**, nie dały zadowalających efektów. Najlepsze wyniki uzyskałem w przypadku reakcji alkinowego bloku budulcowego **54** z benzoilowaną cytozyną. Niestety pochodna ta okazała się mało aktywna w reakcji sprzęgania ze związkami **59** i **60**.

4. Reakcja typu „Click” i przygotowanie substratów do automatycznej syntezy oligodeoksynukleotydów.

Grupa ochronna TBDPS użyta przez mnie w syntezie bloku budulcowego alkinowego **54**, zaowocowała lepszą wydajnością monopodstawienia od blokady trytylowej, jednakże jest grupą nienadającą się do metody zautomatyzowanej syntezy oligodeoksynukleotydów na podłożu stałym. Powodem jest trudność związana z jej usunięciem, to znaczy konieczność zastosowania bardziej ostrych warunków oraz dłuższego czasu podczas reakcji jej odblokowania. Pomimo niekorzystnego wpływu na całkowitą wydajność szeregu reakcji, konieczne było wprowadzenie dwóch dodatkowych etapów syntezy. W pierwszym z nich usunąłem blokadę TBDPS, a w drugim wprowadziłem na jej miejsce niezbędną grupę dimetoksytrytylową. W ostatnich etapach doprowadziłem do reakcji katalizowanej jonami miedzi(I) addycji azydek-alkin i wprowadziłem grupę amidofosforynową do cząsteczek analogów dinukleotydów.

4.1. Odblokowanie alkinowego analogu nukleozydowego

Reakcję prowadziłem w świeżo destylowanym THF dodając trifluorowodoru trietyloaminy (czynnik desililujący) w dużym nadmiarze (**Schemat 23**). Po stosunkowo długim czasie reakcji, wynoszącym dwie doby, w mieszaninie reakcyjnej pozostały już tylko śladowe ilości substratu (**58**) (TLC).



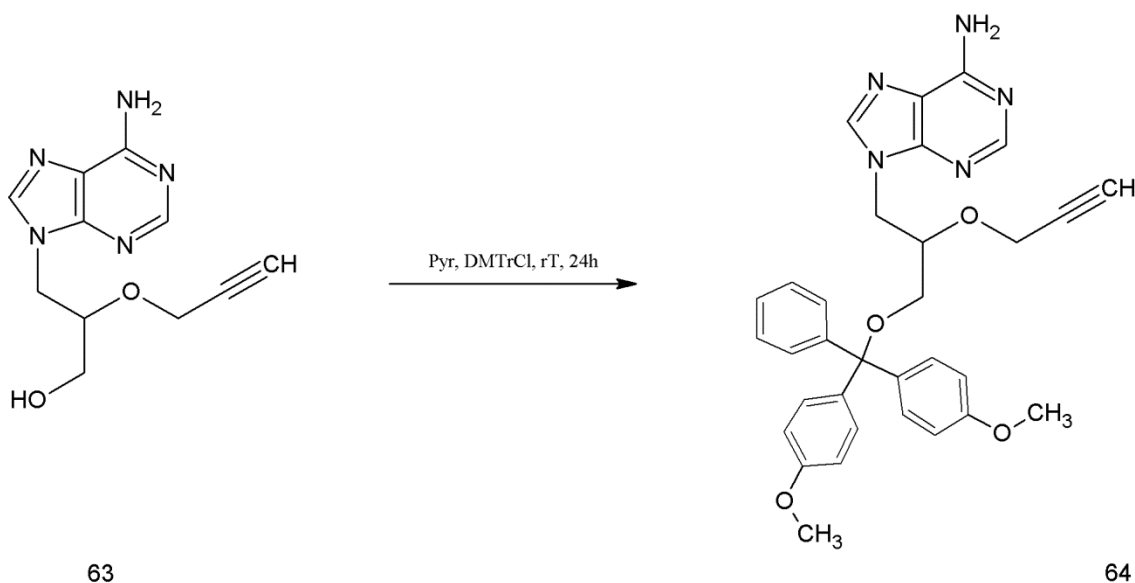
Schemat 23

Do mieszaniny reakcyjnej dodałem nasycony roztwór kwaśnego wodorowęglanu sodu, w celu jej zobojętnienia. Po odparowaniu rozpuszczalników do sucha przeprowadziłem ekstrakcję pirydyną na gorąco, żeby oddzielić produkt o zwiększonej polarności względem substratu, od dużej ilości wytrąconych w mieszaninie soli. Pomimo ekstrakcji pirydyną, balast zanieczyszczeń solami nieorganicznymi był nadal duży. Przygotowałem kolumnę jonowymienną Dowex H⁺, którą odpowiednio kondycjonowałem i skutecznie odmyłem zanieczyszczenie solami nieorganicznymi. Czystą pochodną adeninową wydzieliłem wykorzystując chromatografię jonowymienną – poprzez absorpcję protonowanej adeniny na kationicie, a następnie po odmyciu soli wymywając ją roztworem amoniaku. Oczyszczony produkt (**63**) zebrałem w kilku frakcjach, które po odparowaniu do sucha przeanalizowałem za pomocą techniki ¹H NMR.

W protonowym widmie NMR nie widać już sygnałów w zakresie protonów aromatycznych grup fenylowych, oraz zniknął charakterystyczny bardzo intensywny singlet pochodzący od grupy *tert*-butylowej. W przedziale 4,90-4,74 ppm widoczny jest multiplet pochodzący od jednego protonu odblokowanej grupy hydroksylowej. Pozostała część struktury produktu została nienaruszona o czym świadczą tryplet przy 2,37 ppm pochodzący od terminalnego atomu wodoru grupy propargilowej, oraz sygnały charakterystyczne dla adeniny. Sygnał przy 7,46 ppm pochodzi od dwóch atomów wodoru z egzoaminowej grupy NH₂ adeniny. Singlety przy 8,18 ppm i 8,53 ppm przypisałem odpowiednio protonom H-8 i H-2 adeniny.

4.2. Trytylowanie odblokowanego alkinowego analogu nukleozydu

W celu pozbycia się wilgoci, dobrego wysuszenia substratu (**63**), odparowałem go trzykrotnie z destylowaną pirydyną. Syntezę prowadziłem przez dobę w temperaturze pokojowej i w destylowanej pirydynie, która zobojętniała tworzący się w trakcie reakcji kwas (**Schemat 24**).



Schemat 24

Powstały chlorowodorek pirydyny, został usunięty podczas ekstrakcji mieszaniny produktów i oczyszczania na kolumnie chromatograficznej. Po chromatografii otrzymałem czysty produkt trytylowania (**64**), gotowy do sprzęgania z substratem azydkowym w reakcji CuAAC. Analiza widm ^1H NMR i ^{13}C NMR potwierdziła strukturę otrzymanego produktu.

Analiza protonowego widma produktu wykazała wprowadzenie do cząsteczki substratu grupy ochronnej dimetoksytrytylowej. Singlet przy 3,80 ppm pochodzi od 6 protonów z obu grup metoksylowych blokady trytylowej. Multiptyety przy 7,57-7,15 ppm i 7,00-6,71 ppm odpowiadają protonom aromatycznym grupy trytylowej. Tryplet przy 2,14 ppm pochodzi od terminalnego atomu wodoru grupy propargilowej. Singlet przy 5,67 ppm pochodzi od dwóch atomów wodoru z egzoaminowej grupy NH_2 adeniny. Singlety przy 7,90 ppm i 8,33 ppm przypisałem odpowiednio protonom H-8 i H-2 adeniny

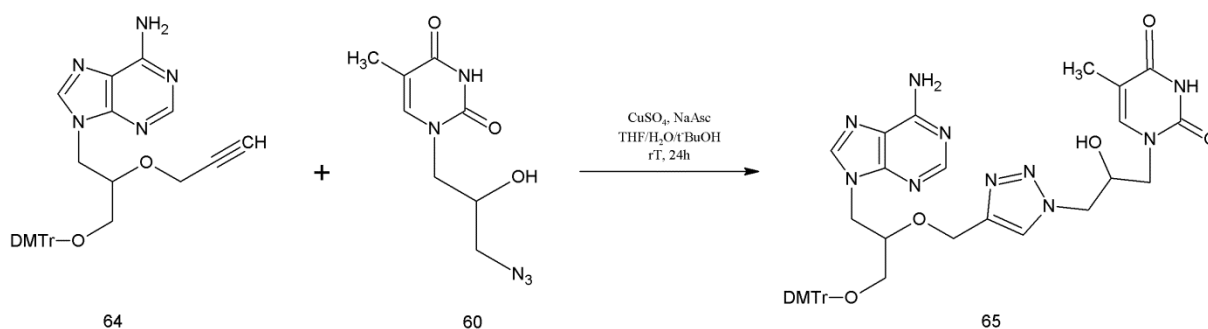
4.3. Sprzęganie typu „Click” pomiędzy alkinem i azydkiem

Po odpowiednim zablokowaniu grupy hydroksylowej acyklicznego analogu nukleozydu posiadającego podstawnik alkinowy, mogłem przystąpić do sprzęgania go w reakcji CuAAC z acyklicznym analogiem nukleozydu, posiadającym podstawnik azydkowy. Wcześniej

przeprowadziłem na małą skalę próby sprzęgania pochodnej z podstawnikiem TBDPS. Miały one na celu dobór właściwych warunków reakcji typu „Click” i późniejsze zastosowanie ich we właściwych próbach sprzęgania.

Warunki dla obu prowadzonych przeze mnie reakcji CuAAC były identyczne. Jako katalizatora użyłem soli – siarczanu(VI) miedzi(II), który był donorem jonów Cu^{2+} . Jako reduktora jonów miedzi do Cu^+ użyłem askorbinianu sodu. Reakcje prowadziłem w układzie trzech rozpuszczalników – THF/ H_2O /t-BuOH, w stosunku objętościowym jak 3:1:1. W przypadku obu reakcji, substratem którego użyłem w nadmiarze była pochodna z podstawnikiem azydkowym. Obie reakcje prowadziłem przez dobę w temperaturze pokojowej. W obu przypadkach po zakończonej reakcji odparowywałem rozpuszczalniki do sucha i oczyszczałem produkty za pomocą chromatografii kolumnowej, uzyskując czyste związki.

W pierwszej reakcji przeprowadziłem sprzęganie acyklicznego analogu adenozyiny posiadającego podstawnik alkinowy (**64**), z acyklicznym analogiem tymidyny posiadającym podstawnik azydkowy (**60**) (Schemat 25). Reakcja doprowadziła do utworzenia analogu dinukleotydu połączonego układem 1,4-dipodstawionym-1,2,3-triazolowym. Produkt (**65**) posiada wolną grupę hydroksylową, która została wykorzystana w następnej reakcji – wprowadzania amidofosforynu do cząsteczki.

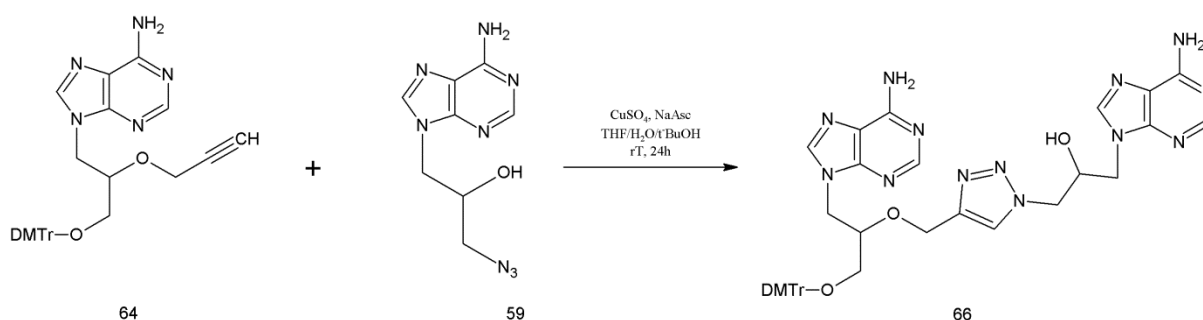


Schemat 25

Przeprowadziłem analizę widm ^1H NMR otrzymanego produktu, co potwierdziło jego strukturę.

Analiza protonowego widma produktu wykazała pozytywny przebieg reakcji CuAAC. Sygnał od terminalnego atomu wodoru grupy alkinowej nie jest już widoczny. W widmie produktu można zaobserwować sygnały świadczące o obecności zarówno reszty tyminy jak i adeniny w cząsteczce. W przedziale 1,77-1,70 ppm widoczny jest sygnał dla trzech atomów wodoru grupy metylowej tyminy. W przedziale 7,97-7,88 ppm obecny jest multiplet dla wodoru H-6 tyminy. Ostatnim potwierdzeniem obecności tyminy jest dublet przy 11,27 ppm pochodzący od iminowego atomu azotu. Natomiast singlet przy 8,32 ppm powiązałem z dwoma protonami charakterystycznymi dla cząsteczki adeniny (H-8 i H-2). Potwierdzeniem występowania blokady dimetoksytrytylowej jest singlet o dużej intensywności przy 3,73 ppm, który powiązałem z 6 atomami wodoru z dwóch grup metoksylowych. W przedziale 7,41-6,85 ppm znajduje się rozległy multiplet pochodzący od protonów aromatycznych.

W drugiej reakcji przeprowadziłem sprzężanie acyklicznego analogu adenozyiny posiadającego podstawnik alkinowy (**64**), z acyklicznym analogiem adenozyiny posiadającym podstawnik azydkowy (**59**) (Schemat 26). Reakcja doprowadziła do utworzenia analogu dinukleotydu połączonego układem 1,4-dipodstawionym-1,2,3-triazolowym. Produkt (**66**) posiada wolną grupę hydroksylową, która została wykorzystana w następnej reakcji – wprowadzania amidofosforynu do cząsteczki.



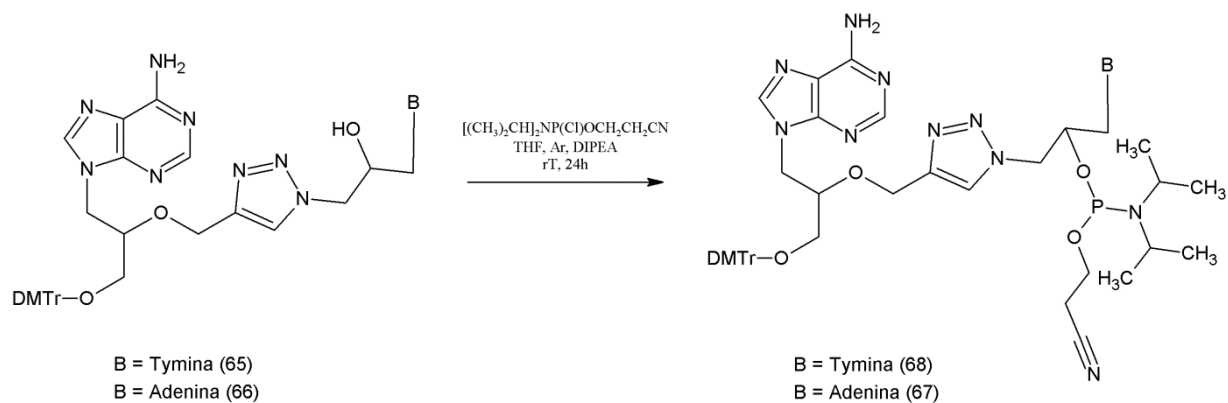
Schemat 26

Dzięki analizie widma ^1H NMR otrzymanego produktu potwierdziłem pozytywny przebieg reakcji CuAAC.

Analiza protonowego widma produktu potwierdziła jego strukturę. Sygnał od terminalnego atomu wodoru grupy alkinowej nie jest już widoczny. W widmie produktu można zaobserwować sygnały świadczące o obecności dwóch reszt adeniny w cząsteczce. Multiplet między 8,17-7,89 ppm powiązałem z czterema protonami charakterystycznymi dla cząsteczki adeniny (H-8 i H-2 z obu reszt adeniny). Potwierdzeniem występowania blokady dimetoksytrytylowej jest singlet o dużej intensywności przy 3,72 ppm, który powiązałem z 6 atomami wodoru z dwóch grup metoksylowych. W przedziale 7,41-6,80 ppm znajduje się rozległy multiplet pochodzący od protonów aromatycznych.

4.4. Wprowadzenie układu amidofosforynowego do cząsteczki dinukleotydu

W ostatnim etapie szeregu reakcji prowadzących do otrzymania układów dinukleotydo- wych aktywnych w procedurze zautomatyzowanej syntezy oligodeoksynukleotydo- w, wprowadziłem grupę amidofosforynową w pozycji wolnej grupy hydroksylowej obu cząsteczek **65** i **66**. Reakcje prowadziłem w obu przypadkach w identycznych warunkach, modyfikując jedynie ilości potrzebnych substratów (**Schemat 27**). Zarówno substrat **65** jak i **66** starannie wysuszyłem pod zmniejszonym ciśnieniem, przed wprowadzeniem do mieszaniny reakcyjnej. Reakcje prowadziłem z dużą dbałością o bezwodne warunki, zarówno rozpuszczalnik - destylowany THF, jaki i substraty reakcji wprowadzałem do układu za pomocą strzykawki przez szczelne septum. W syntezie wykorzystałem zasadowy katalizator w postaci N,N-diizopropylodetyloaminy, która również wychwytywała cząsteczki powstającego kwasu HCl. Reakcje prowadziłem przez dobę uzupełniając atmosferę argonu w układzie reakcyjnym.



Schemat 27

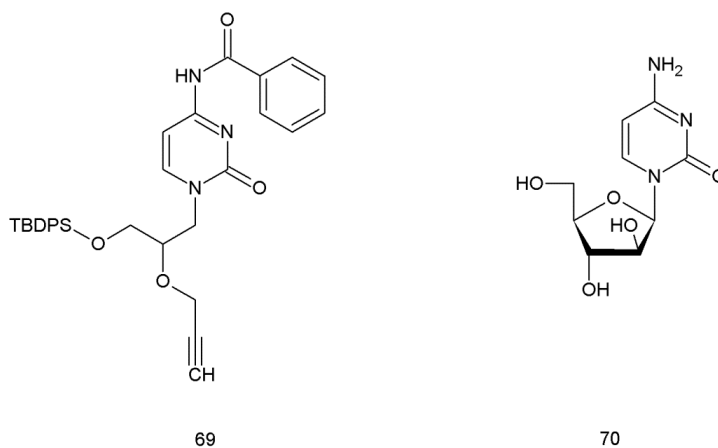
W wyniku przeprowadzonych reakcji otrzymałem dwa analogi acyklicznych dinukleotydów zawierających łącznik triazolowy. Jeden z produktów (**67**) zbudowany jest z dwóch zasad purynowych – dwóch reszt adeniny, natomiast drugi produkt (**68**) jest pochodną zawierającą zasadę purynową – adeninę, jak i pirymidynową – tyminę. Po zakończeniu reakcji przeprowadziłem chromatografię kolumnową z niewielkim dodatkiem trietyloaminy, aby nie dopuścić do rozpadu produktów w jej trakcie. Oczyszczone produkty zagęściłem z dodatkiem trietyloaminy i aby zapobiec rozkładowi przechowywałem w lodówce, do czasu kiedy przeprowadziłem zautomatyzowaną syntezę oligodeksynukleotydów na podłożu stałym.

Strukturę produktu potwierdziłem za pomocą spektroskopii ^{13}C NMR. Natomiast wprowadzenie grupy amidofosforynowej potwierdziłem za pomocą spektroskopii ^{31}P NMR. O jej obecności w strukturze produktu świadczy sygnał przy 151,22 ppm, w przypadku związku **67**. Dla produktu **68** sygnał pochodzący od grupy amidofosforynowej znajduje się przy 151,25 ppm.

5. Badania aktywności przeciwnowotworowej

Znane są analogi nukleozydów oraz nukleotydów wykazujące wysoką aktywność biologiczną, które znalazły zastosowanie jako skuteczne leki przeciwnowotworowe lub przeciwwirusowe. Z tego właśnie powodu postanowiłem sprawdzić wybrane z otrzymanych przeze mnie związków, pod kątem występowania aktywności przeciwnowotworowej. Badania zostały przeprowadzone przez dra n. farm. Piotra Ruszkowskiego w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Uniwersytetu im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Badania zostały wykonane według protokołu analizy z użyciem znacznika SRB, na liniach komórkowych wyhodowanych na podłożu RPMI 1640 medium, z użyciem 96-dółkowej płytki do mikromiareczkowania. Metoda to kolorymetryczny test, mierzący zahamowanie proliferacji komórek, na podstawie pomiaru ilości białka komórkowego. Wszystkie próby zostały powtórzone trzy razy, a pomiaru gęstości optycznej dokonano przy długości fali 490 nm, w porównaniu do próbki kontrolnej. Jako wzorzec wewnętrzny użyto Cytarabinę (**70**). Wśród wybranych przeze mnie próbek był analog acyklicznej benzoilowanej cytydyny posiadający podstawnik alkinowy (**69**). **Rysunek 16** prezentuje powyższe struktury.



Rys. 16

Wyniki pomiarów zostały zawarte poniżej w **tabeli 1**. Wartości liczbowe podane są w $\mu\text{g/ml}$ i oznaczają stężenie hamujące wzrost komórek nowotworowych w populacji 50% (IC50). Testy zostały przeprowadzone na dwóch liniach komórek rakowych:

- linia komórek rakowych HeLa (komórki raka szyjki macicy);
- linia komórek KB (komórki raka jamy nosowo-gardłowej).

Standardem w prowadzonych testach był analog nukleozydowy – arabinozyd cytozyny. Parametr SI to oznaczony Indeks Selektywności porównujący aktywność badanych związków w stosunku do komórek prawidłowych (fibroblastów skóry HDF).

Tabela 1

Związek	IC50 HeLa (SD)	IC50 KB (SD)	IC50 HDF (SD)	SI 1 (HeLa)	SI 2 (KB)
54	4.27 (0.47)	4.16 (0.04)	7.02 (0.81)	1.64	1.68
69	1.52 (0.20)	1.39 (0.36)	3.17 (0.04)	2.08	2.28
58	1.60 (0.89)	1.42 (3.19)	2.70 (0.58)	1.68	1.90
63	17.21 (0.33)	17.90 (0.03)	25.10 (0.02)	1.45	1.40
55	29.16 (1.73)	28.51 (1.60)	39.20 (0.93)	1.34	1.37
59	7.36 (1.23)	7.91 (1.09)	11.82 (0.02)	1.60	1.49
60	2.11 (0.29)	2.49 (10.26)	3.84 (2.56)	1.81	1.54
64	1.03 (0.04)	0.97 (0.21)	2.82 (0.07)	2.73	2.90
Cytarabina	0.81 (3.92)	0.93 (4.25)	2.75 (0.20)	3.39	2.95

Z przedstawionych powyżej wyników można wnioskować, że otrzymane przeze mnie związki nie wykazują znaczącej aktywności przeciwnowotworowej na wybrane rodzaje komórek nowotworowych. Najniższą aktywność prezentuje związek **55**, który charakteryzuje się również dość niską selektywnością. Najbardziej aktywny przeciwnowotworowo jest produkt **64**, którego wyniki są najbliższe wynikom dla wzorca – znanego i stosowanego leku. Stężenie hamujące wzrost komórek nowotworowych w populacji 50% (IC50) jest zadowalająco niskie. Indeks Selektywności (SI) porównujący aktywność badanych związków w stosunku do komórek prawidłowych, jest satysfakcjonująco wysoki. Trochę słabsze wyniki aktywności i selektywności uzyskano dla związku **69**, ale nadal porównywalne ze wzorcem. Pozostałe przebadane związki wykazują aktywność zawartą pomiędzy wskazanymi przeze mnie przypadkami granicznymi.

Uzyskane wyniki sugerują, że wyższą aktywność przeciwnowotworową wykazują acykliczne analogi nukleozydów posiadające podstawnik alkinowy. A szczególnie wpływ na zwiększenie

aktywności biologicznej ma, obecna w związku **64**, grupa ochronna dimetoksytrytylowa. Analog acyklicznej adenozyiny posiadający podstawnik alkinowy i grupę ochronną TBDPS (**58**) jest już mniej aktywny i selektywny, ale nadal wykazuje znaczną przewagę nad układem odblokowanym (**63**) - pozbawionym dużej grupy ochronnej. Acykliczny analog adenozyiny posiadający podstawnik azydowy (**60**) wykazuje mniejszą aktywność od najbardziej skutecznych chronionych struktur, ale charakteryzuje się znacznie wyższą aktywnością od nieblokowanej cząsteczki **63**.

6. Zautomatyzowana synteza oligodeoksynukleotydów na podłożu stałym

Następny etap mojej pracy badawczej polegał na wykorzystaniu otrzymanych wcześniej amidofosforynów acyklicznych analogów dinukleotydów połączonych układem triazolowym, w zautomatyzowanym procesie syntezy oligonukleotydów DNA na podłożu stałym z wykorzystaniem metody amidofosforynowej.

Komplementarne względem siebie fragmenty DNA, w wyniku hybrydyzacji i utworzenia wiązań wodorowych pomiędzy parami zasad typu Watson-Crick, tworzą dwuniciowe struktury. Ich stabilność określa temperatura topnienia dupleksu. Wraz ze wzrostem długości łańcucha DNA, wzrasta jego trwałość i wartość temperatury topnienia dupleksów DNA. Wprowadzenie modyfikacji do łańcucha oligodeoksynukleotydu może mieć wpływ stabilizujący lub destabilizujący na tworzone przez niego struktury dwuniciowe. Zgodnie ze znanymi badaniami [3], wpływ na trwałość oligodeoksynukleotydu ma m.in. długość połączenia pomiędzy poszczególnymi nukleotydami. Najkorzystniejszy efekt – zwiększenie trwałości, ma wprowadzenie połączenia triazolowego o łącznej długości 6 wiązań (**Schemat 11**). Zwiększenie lub zmniejszenie tej odległości w przypadku układów posiadających rybozowy fragment cukrowy, ma wpływ destabilizujący. W moich badaniach postanowiłem sprawdzić jaki wpływ będzie miał triazolowy łącznik w sytuacji, w której zamienimy część rybozową na krótki, acykliczny podstawnik. Przewidywałem zmniejszenie trwałości tworzonych dupleksów DNA i obniżenie temperatury topnienia. Dlatego zdecydowałem się na wprowadzenie modyfikowanych struktur **67** i **68** do łańcucha 12-meru DNA, dzięki czemu w dalszej części pracy możliwe było dokładne i czytelne określenie różnic w temperaturach topnienia badanych dupleksów DNA (odczyty między 33-56°C).



Rys. 17

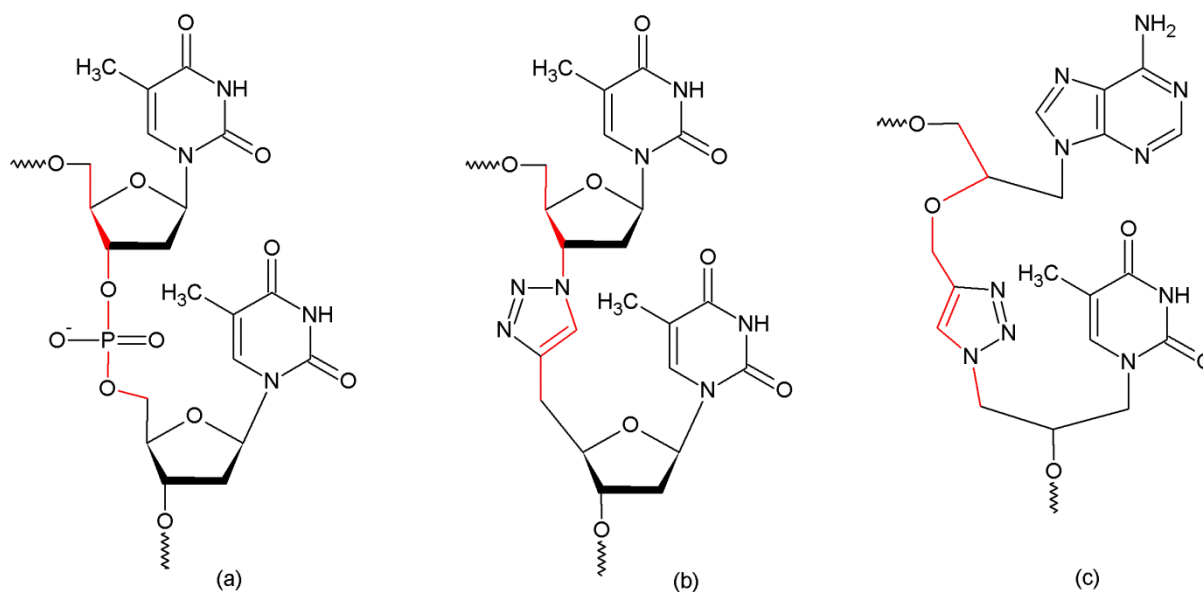
Po zamontowaniu w odpowiednich pozycjach syntetyzera kolumnienek z podłożem stałym, zawierającym nukleozydy znajdujące się na końcu 3' syntetyzowanych łańcuchów (**Rysunek 17**), przystąpiłem do syntezy wybranych sekwencji oligodeoksynukleotydów. Spis sekwencji oraz ich oznaczenia zawarte są w **tabeli 2**. Zsyntetyzowane zostały dwa 12-mery (**71** i **72**) będące niciami komplementarnymi do badanych oligomerów zawierających modyfikacje (**X**, **Y**). Modyfikacje wprowadzono na końcu 5' łańcucha (**71A** i **72A**), w środku (**71B** i **72B**), jak również zsyntetyzowano oligodeoksynukleotydy zawierające modyfikacje w obu tych miejscach (**71D** i **72D**). W celu utworzenia dupleksów o analogicznej sekwencji, ale nie posiadających modyfikacji, służących jako odnośnik w badaniach stabilności dupleksów, zsyntetyzowano oligodeoksynukleotydy **71C** i **72C**. Duża zawartość zasad C i G wpływa na zwiększenie stabilności tworzonych dupleksów DNA. Tworzone przez te zasady potrójne wiązanie wodorowe utrzymuje bliżej i mocniej dwie komplementarne nici oligomerów w dupleksie. Zasady te umiejscowiono w badanych układach w pobliżu wprowadzonej acyklicznej modyfikacji, tak by nie dopuszczać do zbyt dużego rozluźnienia struktury DNA.

Tabela 2

Oznaczenie	Sekwencja	Modyfikacja
71	5' – CTACGTTGGCT T – 3'	X = 67 (AA)
71A	5' – X GCCAACGTA G – 3'	
71B	5' – AAGCC X CGTA G – 3'	
71C	5' – AAGCCAACGTA G – 3'	
71D	5' – X GCC X CGTA G – 3'	
72	5' – CTACGATGGCA T – 3'	Y = 68 (AT)
72A	5' – Y GCCATCGTA G – 3'	
72B	5' – ATGCC Y CGTA G – 3'	
72C	5' – ATGCCATCGTA G – 3'	
72D	5' – Y GCC Y CGTA G – 3'	

Na **rysunku 18** przedstawione jest porównanie przykładowych łączników internukleotydowych – fosforanowego i triazolowego, z punktu widzenia odległości (liczby) wiązań pomiędzy pozycjami węzłowymi w łańcuchu oligodeoksynukleotydu (pozycja C-5' w pierścieniu deoksyrybozy). W przypadku naturalnie występującego połączenia fosforanowego

odległość wynosi 6 wiązań **(a)** i jest równa odległości pomiędzy pozycjami C-5' w 10-merze zbudowanym z reszt tymidyny i połączonych układem triazolowym **(b)** [2]. W otrzymanych przeze mnie niciach 12-merycznych oligodeoksynukleotydów, modyfikowany acykliczny fragment dinukleotydu, posiada łącznik triazolowy o odległości pomiędzy węzłowymi atomami węgla wynoszącej 7 wiązań **(c)**.



Rys. 18

Poniżej przedstawiam wyniki syntezy dla poszczególnych nici oligodeoksynukleotydów, wraz z przykładowymi wykresami wydajności na poszczególnych etapach reakcji i ich interpretacją.

Obliczenia teoretyczne mas dla wszystkich nici otrzymywanych oligodeoksynukleotydów wykonałem za pomocą tak zwanego „*Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator*” na stronie internetowej – <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>.

6.1. Synteza nici wzorcowych 71C i 72C

Przeprowadziłem syntezę nici wzorcowych- 12-merów nie posiadających żadnej modyfikacji. W dalszej części badań, podczas pomiarów temperatur topnienia, wykorzystałem je do utworzenia dupleksów, względem których porównywałem temperatury topnienia, energie swobodne i trwałość dupleksów z nicią modyfikowaną.

Całkowita wydajność syntezy obu nici wzorcowych, wyniosła w każdym przypadku ok. 96%. W następnym etapie związki te zostały doczyszczone i odsolone na HPLC, a po liofilizacji potwierdziłem masy otrzymanych oligomerów za pomocą techniki MALDI TOF MS, wykonując widma w trybie jonów dodatnich.

Teoretyczna obliczona masa dla 12-meru wzorcowego **71C** wynosi 3663,5, natomiast w widmie analizy MALDI obecne są sygnały jonu molekularnego odpowiadające masie o m/z 3662.

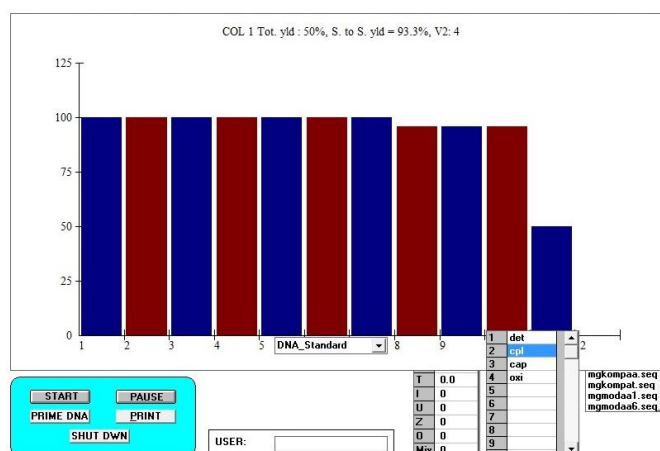
Teoretyczna obliczona masa dla 12-meru wzorcowego **72C** wynosi 3645,4, natomiast w widmie analizy MALDI obecne są sygnały jonu molekularnego odpowiadające masie o m/z 3645.

W standardowym protokole syntezy jednostka modyfikowana (zarówno **67** jak i **68**) ulegała przyłączeniu z gorszą wydajnością niż jednostki natywne.

6.2. Synteza nici modyfikowanych na końcu 5' – 71A i 72A

W pierwszej kolejności postanowiłem przeprowadzić próbę wprowadzenia otrzymanej przeze mnie modyfikacji na końcu 5' syntetyzowanej nici. Decyzję podjąłem zgodnie z założeniem, że koniec nici jest bardziej labilny i wprowadzenie tam modyfikacji, powinno być łatwiejsze niż w środku łańcucha – modyfikacja na końcu ma mniejszy wpływ na stabilność tworzonej nici oraz tworzonego przez nią dupleksu. Na **rysunku 19** przedstawiony jest wykres słupkowy, prezentujący wydajność wszystkich etapów syntezy oligomeru – poszczególnych przyłączeń kolejnych nukleozydów. Wykresy tego typu powstają w czasie rzeczywistym podczas syntezy oligomerów DNA, za pomocą aparatu *K&A Laborgeraete DNA/RNA*

Synthesizer H-6. W trakcie syntezy, przy każdym przyłączeniu kolejnej jednostki, powtarza się etap odblokowania grupy ochronnej dimetoksytrytylowej, którego wydajność porównywana jest z etapem poprzednim za pomocą tzw. monitora trytylu. Jego działanie oparte jest o pomiar przewodnictwa roztworu zawierającego karbokation dimetoksytrytylowy powstający w silnie kwaśnych warunkach odblokowania grupy DMT. Dzięki temu w trakcie syntezy otrzymuje się informacje o tym czy reakcja odblokowania zaszła ilościowo, czy też produkt kolejnego etapu syntezy nie został całkowicie odblokowany. Pojawienie się na odczycie niższego słupka (niższej wydajności) oznacza, że podstawienie kolejnego bloku zaszło z mniejszą wydajnością – to znaczy, że tylko część wprowadzonego do układu amidofosforynu została związana z powstającą na podłożu stałym nicią oligodeoksynukleotydu. Na wykresie można zaobserwować, że największy spadek wydajności procesu wiąże się z wprowadzeniem modyfikowanego dinukleotydu. Ale dzięki temu, że jest to ostatni etap syntezy, populacja zmodyfikowanego 12-meru jest dosyć duża i wynosi około 50%.



Rys. 19

Była to wystarczająca ilość modyfikowanego 12-meru, żebym przeprowadził jego oczyszczanie za pomocą techniki HPLC oraz pomiary temperatur topnienia powstałego z jego udziałem dupleksu.

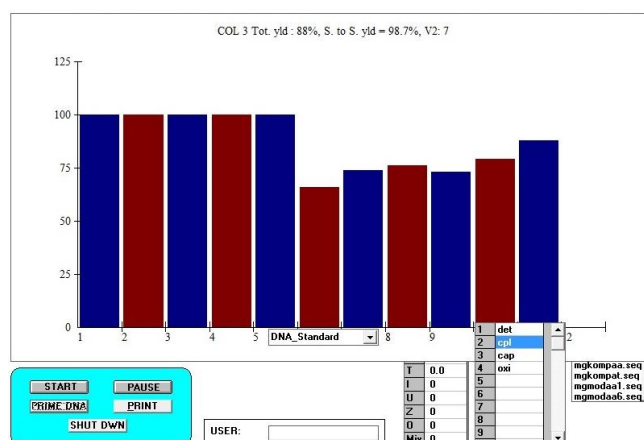
Otrzymanie zakładanych oligodeoksynukleotydów potwierdziłem za pomocą analizy MALDI TOF MS wykonując widma w trybie jonów dodatnich.

Teoretyczna obliczona masa dla 12-meru zawierającego modyfikację **67** na końcu 5' nici (**71A**) wynosi 3579,4, natomiast w widmie analizy MALDI obecne są sygnały jonu molekularnego odpowiadające masie o m/z 3580.

Teoretyczna obliczona masa dla 12-meru zawierającego modyfikację **68** na końcu 5' nici (**72A**) wynosi 3561,4, natomiast w widmie analizy MALDI obecne są sygnały jonu molekularnego odpowiadające masie o m/z 3563.

6.3. Synteza nici modyfikowanych w środku łańcucha (pozycja 6 i 7) – 71B i 72B

Wprowadzenie modyfikacji do łańcucha oligodeoksynukleotydu wiąże się ze spadkiem wydajności reakcji. Możliwe, że ze względów sterycznych podstawienie modyfikowanym dinukleotydem jest mniej korzystne. Kiedy wprowadzałem modyfikację na końcu łańcucha, spadek wydajności podstawienia wpływał tylko na zwiększenie ilości niezmodyfikowanych 10-merów w mieszaninie poreakcyjnej. W przypadku wprowadzenia modyfikacji w środku łańcucha, zwiększa się ryzyko powstania krótkich produktów ubocznych. Jednocześnie ze zmniejszeniem ogólnej wydajności procesu tworzenia 12-meru, zwiększa się stopień zanieczyszczenia łańcuchami oligomerów o mniejszej długości. Na **rysunku 20** przedstawiam wykres monitora trytylu dla 12-meru modyfikowanego w środku łańcucha.



Rys. 20

Odczyt monitora trytylu był zaskakujący. Po spadku wydajności przy wprowadzeniu modyfikowanego dinukleotydu, wydajność z odczytu zaczęła ponownie wzrastać. Jednym z wyjaśnień tej obserwacji może być fakt, że najprawdopodobniej po podstawieniu modyfikacją nie doszło do całkowitego usunięcia grupy ochronnej z końca 5'. Po następnym etapie syntezy doszło nie tylko do zdjęcia trytylu z wydłużonej nici, ale również odblokował się ponownie oligomer krótszy o jednostkę. Niestety monitor trytylu wskazywał wzrost wydajności w kolejnych etapach, co oznacza kolejne odblokowania w nici zawierającej 7 jednostek. W związku z tym rzeczywista wydajność była niższa i mogła wynosić maksymalnie ok. 60 %, w mieszaninie poreakcyjnej znajdowało się spore zanieczyszczenie krótszymi niemi – o długości pomiędzy 7 a 11 jednostek nukleotydowych. Interesujący mnie produkt tej syntezy wymagał dokładniejszego oczyszczenia za pomocą HPLC przed przystąpieniem do dalszych testów.

Po oczyszczeniu oraz liofilizacji przygotowanych próbek, potwierdziłem otrzymanie zakładanych oligodeoksynukleotydów za pomocą analizy MALDI TOF MS wykonując widma w trybie jonów dodatnich.

Teoretyczna obliczona masa dla 12-meru zawierającego modyfikację **67** w środku nici (**71B**) wynosi 3578,5, natomiast w widmie analizy MALDI obecne są sygnały jonu molekularnego odpowiadające masie o m/z 3578.

Teoretyczna obliczona masa dla 12-meru zawierającego modyfikację **68** w środku nici (**72B**) wynosi 3560,5, natomiast w widmie analizy MALDI obecne są sygnały jonu molekularnego odpowiadające masie o m/z 3561.

6.4. Synteza nici komplementarnych 71 i 72

Oligodeoksynukleotydy o komplementarnej sekwencji, pozbawione modyfikacji, były potrzebne w największej ilości w dalszych badaniach. We wszystkich pomiarach temperatur topnienia i energii swobodnej, badałem duplekсы DNA zbudowane z określonych nici modyfikowanych oraz nici komplementarnej. Wyniki porównywałem z dupleksem wzorcowym zbudowanym z nici wzorcowej i komplementarnej. W związku z czym syntezę 12-merów niemodyfikowanych o sekwencji komplementarnej powtórzyłem czterokrotnie.

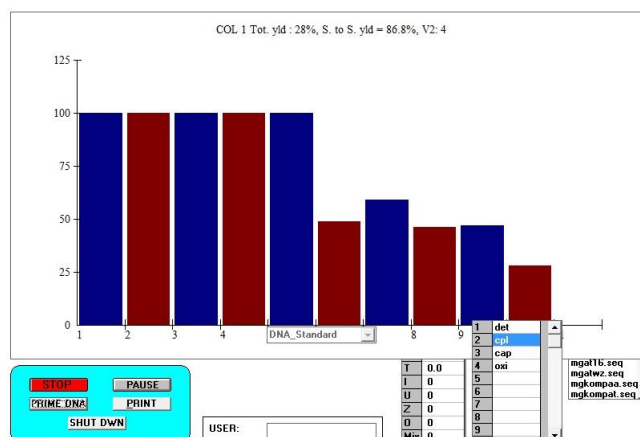
Całkowita wydajność syntezy nici komplementarnych wyniosła 90% w każdym przypadku. Masy otrzymanych 12-merów potwierdziłem za pomocą techniki MALDI TOF MS wykonując widma w trybie jonów dodatnich.

Teoretyczna obliczona masa dla 12-meru komplementarnego **71** wynosi 3627,4, natomiast w widmie analizy MALDI obecne są sygnały jonu molekularnego odpowiadające masie o m/z 3628.

Teoretyczna obliczona masa dla 12-meru komplementarnego **72** wynosi 3645,4, natomiast w widmie analizy MALDI obecne są sygnały jonu molekularnego odpowiadające masie o m/z 3646.

6.5. Synteza nici modyfikowanych w środku i na końcu 5' łańcucha – 71D i 72D

Pomimo zaobserwowania spadku wydajności reakcji w przypadku wcześniejszych syntez, postanowiłem przeprowadzić próbę otrzymywania nici oligodeoksynukleotydów modyfikowanych w dwóch pozycjach – na środku i na końcu 5' łańcucha. Spodziewałem się spadku wydajności reakcji w obu przypadkach. Obserwacje monitora trytylu podczas syntezy, potwierdziły, że całkowity spadek wydajności reakcji był bardziej znaczący niż w przypadku wcześniejszych reakcji (**Rysunek 21**). Ze względu na niską wydajność całkowitą syntezy 12-meru z dwiema modyfikacjami i znaczne zanieczyszczenie mieszaniny poreakcyjnej krótszymi niemi DNA, nie przeprowadziłem pomiarów termodynamicznych dla tych struktur. Spodziewam się, że wprowadzenie modyfikacji w dwóch pozycjach oligomeru doprowadzi do zwiększenia wpływu destabilizującego strukturę dupleksu, a zatem obniżenia temperatury topnienia i wartości energii swobodnej.



Rys. 21

Produkty ostatniego etapu syntezy automatycznej zostały oczyszczone elektroforetycznie i potwierdziłem ich masy stosując technikę MALDI TOF MS, wykonując widma w trybie jonów dodatnich.

Teoretyczna obliczona masa dla 12-meru zawierającego dwie modyfikacje **67** w środku i na końcu 5' nici (**71D**) wynosi 3494,55, natomiast w widmie analizy MALDI obecne są sygnały jonu molekularnego odpowiadające masie o m/z 3498,59.

Teoretyczna obliczona masa dla 12-meru zawierającego dwie modyfikacje **68** w środku i na końcu 5' nici (**72D**) wynosi 3476,53, natomiast w widmie analizy MALDI obecne są sygnały jonu molekularnego odpowiadające masie o m/z 3467,78.

7. Analiza i rozdziały HPLC otrzymanych oligodeoksynukleotydów

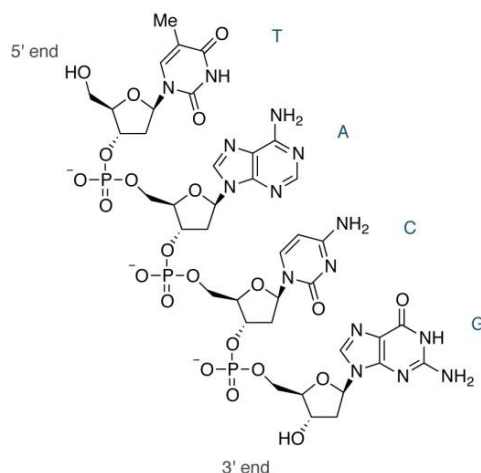
W części eksperymentalnej niniejszej pracy zawarłem informacje dotyczące układów, faz i warunków prowadzonych rozdziałów. Przed przystąpieniem do rozdziałów wykonywałem małe nastrzyki analityczne, powtarzane również w przypadku zmiany układu chromatograficznego lub warunków analizy.

Proces oczyszczania zsyntetyzowanych oligodeoksynukleotydów prowadziłem kilkietapowo, ze względu na dość duże zanieczyszczenie nici o mniejszej długości – 10-merami. W pierwszej kolejności przeprowadziłem rozdziały na kolumnie preparatywnej, dzięki którym uzyskałem częściowo rozdzielone frakcje produktu dwunastoczłonowego i nici DNA o mniejszej długości. Po przeprowadzeniu liofilizacji, próbki ze wszystkich frakcji zostały poddane analizie MALDI TOF MS co pozwoliło wskazać frakcje zawierające pożądany produkt o spodziewanej masie molowej.

Po powiązaniu mas produktów z ich czasem retencji w trakcie przeprowadzonych rozdziałów za pomocą HPLC, przeprowadziłem ponowne rozdziały w tym samym układzie. Tym razem nie zbierałem wszystkich związków, ale tylko te o czasie retencji określonym przez wcześniejszą analizę. W razie potrzeby nastrzyki powtarzałem, tak żeby uzyskać wystarczającą ilość oczyszczonych produktów do analizy termodynamiki dupleksów DNA. Przybliżoną ilość oczyszczonych związków określałem za pomocą analizy widm absorpcji UV – mierząc wartość absorbancji przy 260 nm.

Dużym problemem okazało się rozdzielenie zmodyfikowanych 12-merów, od niemodyfikowanych 10-merów powstających w dużej ilości podczas syntezy zautomatyzowanej. Oligodeoksynukleotydy dziesięcioczłonowe jak i interesujące mnie zmodyfikowane 12-mery mają tyle samo grup fosforanowych, będących klasycznymi łącznikami międzynukleotydowymi. To właśnie połączenie fosforanowe decyduje o polianionowym charakterze szkieletu oligodeoksynukleotydu. Skoro wymienione struktury mają tyle samo połączeń fosforanowych w swoim szkielecie, to będą zachowywać się bardzo podobnie w trakcie rozdziałów HPLC w odwróconej fazie. Moje obawy potwierdziły się podczas prób oddzielenia najdłuższych produktów od struktur dziesięcioczłonowych. Właściwie nie powiodło się to w przypadku żadnej z modyfikacji podczas pierwszego rozdziału. Natomiast nici komplementarne jak i wzorcowe nie sprawiły takiego problemu,

różnice długości w ich przypadku były związane z obecnością dodatkowych połączeń fosforanowych, a zatem również ze zwiększeniem charakteru anionowego szkieletu. Przykładowy fragment polianionowego szkieletu przedstawiony jest na **rysunku 22**.



Rys. 22 (<http://www.atdbio.com/content/5/Nucleic-acid-structure>)

Z powodu opisanych powyżej trudności, konieczne było przeprowadzenie dodatkowego oczyszczania oddzielonych frakcji zawierających modyfikowane produkty. W tym celu zastosowałem drugi układ z kolumną analityczną, na którą wprowadzałem mniejsze ilości związku i przeprowadzałem dokładniejszy rozdział. W pierwszej kolejności powtórzyłem małe nastrzyki analityczne, żeby określić czas retencji pożądaných produktów. Następnie przeprowadziłem oczyszczanie, w miarę możliwości i zdolności rozdzielczej kolumny, uzyskałem czyste frakcje produktów modyfikowanych dwunastoczłonowych. Ponownie liofilizowałem zebrane próbki, określałem przybliżoną ilość produktów za pomocą spektroskopii UV-Vis. Analiza MALDI TOF MS potwierdziła, że uzyskałem czyste frakcje produktów.

W ostatnim etapie pracy z wykorzystaniem HPLC, konieczne było odsolenie frakcji oczyszczonych nici oligodeoksynukleotydowych. Jedną z używanych w rozdziałach faz zawierała 0,01M roztwór octanu amonu. W celu wykonania analizy MALDI, jak i przygotowania próbek do badań termodynamiki dupleksów DNA, musiałem pozbyć się soli. Nastrzyki wykonywałem na już wcześniej używanej kolumnie, oligodeoksynukleotydy wymywałem z użyciem fazy wodnej i acetonitrylu, bez dodatku soli. Odsolone próbki

zliofilizowałem i za pomocą analizy UV-Vis określiłem, że zawierają wymaganą ilość produktów do dalszych badań.

W podobny sposób przeprowadziłem odsalanie związków **71D** i **72D**, które zostały wcześniej oczyszczone elektroforetycznie. Zostało potwierdzone przypuszczenie, że mieszanina zawiera najmniejszą ilość związków posiadających dwie modyfikacje – jedną w środku, drugą na końcu 5' łańcucha. Oczyszczone i odsolone oligomery liofilizowałem i umieściłem na płytce do analizy MALDI TOF MS. Potwierdziłem, że udało się otrzymać i wyizolować produkty dwukrotnie modyfikowane, chociaż z bardzo niską wydajnością (uzyskano 0,4 OD związku 71D i 0,5 OD związku 72D). Analiza MALDI TOF potwierdziła ich strukturę, niestety mała ilość materiału nie pozwoliła na przeprowadzenie badań termodynamiki.

8. Pomiary temperatur topnienia i pełnej termodynamiki dupleksów

Pomiary termodynamiki wykonałem dla dupleksów DNA zbudowanych z syntetyzowanych przeze mnie nici oligodeoksynukleotydów. Po ustaleniu potrzebnych stężeń zmieszałem ze sobą roztwory właściwych 12-merów, otrzymując dupleksy o określonych sekwencjach (**tabela 3**). Ze względu na małą ilość otrzymanych nici 71D i 72D, nie wykorzystałem ich w badaniach termodynamiki.

Tabela 3

Oznaczenie	Sekwencja	Modyfikacja
71 – 71A	5' – CTACGTTGGCTT – 3' 3' – GATGCAACCGX – 5'	X = 67 (AA)
71 – 71B	5' – CTACGTTGGCTT – 3' 3' – GATGCXCCGAA – 5'	
71 – 71C	5' – CTACGTTGGCTT – 3' 3' – GATGCAACCGAA – 5'	
72 – 72A	5' – CTACGATGGCAT – 3' 3' – GATGCTACCGY – 5'	Y = 68 (5' –AT – 3')
72 – 72B	5' – CTACGATGGCAT – 3' 3' – GATGCYCCGTA – 5'	
72 – 72C	5' – CTACGATGGCAT – 3' 3' – GATGCTACCGTA – 5'	

8.1. Analiza dupleksów wzorcowych – pozbawionych modyfikacji

W pierwszej kolejności przebadałem dupleksy DNA zbudowane z nici wzorcowych (**71C** i **72C**) oraz nici komplementarnych (**71** i **72**), to znaczy układy niezawierające modyfikacji. W ten sposób wyznaczyłem orientacyjne temperatury topnienia dla dupleksów 12-merów o podanych sekwencjach. W obu przypadkach uzyskałem bardzo podobne wyniki zarówno dla temperatur topnienia i wartości entalpii swobodnej.

Dla lepszego porównania, wyniki pomiarów uwzględniające błąd odczytu dla wszystkich dupleksów umieściłem w **tabeli 4**. Zaproponowałem podział wyników ze względu na sposób ich obliczenia:

- według dopasowania krzywych eksperymentalnych do teoretycznych krzywych topnienia;
- wykresu zależności odwrotności temperatury topnienia od logarytmu stężenia badanego dupleksu.

Tabela 4

Oznaczenie	Z dopasowania krzywych		Z wykresu zależności	
	ΔG (kcal/mol, 37°C)	T _m (°C, 1.0e-4M)	ΔG (kcal/mol, 37°C)	T _m (°C, 1.0e-4M)
71 – 71C	-11.54 ± 0.527	55.8	-11.02 ± 0.115	56.3
71 – 71A	-10.53 ± 0.257	53.6	-10.35 ± 0.123	53.6
71 – 71B	-6.25 ± 0.210	35.7	-6.30 ± 0.078	35.9
72 – 72C	-11.24 ± 0.094	56.0	-11.47 ± 0.198	55.6
72 – 72A	-10.51 ± 0.289	53.2	-10.49 ± 0.105	53.1
72 – 72B	-5.88 ± 0.108	33.9	-5.84 ± 0.033	33.7

8.2. Analiza dupleksów z modyfikacją na końcu 5' łańcucha

W przypadku wprowadzenia modyfikacji w postaci acyklicznego analogu dinukleotydu połączonego układem triazolowym na końcu łańcucha, można zaobserwować minimalny wpływ destabilizujący na strukturę dupleksu DNA. Dla obu modyfikacji uzyskałem bardzo podobne wyniki, czyli w tym przypadku sekwencja modyfikacji nie ma znaczenia. W stosunku do dupleksów wzorcowych obniżenie temperatury topnienia wynosi zaledwie około 3°C zarówno dla układu **71-71A** jak i **72-72A**. Niewielkie podwyższenie wartości entalpii swobodnej sugeruje, że nie jest wykluczone użycie oligomerów zawierających dinukleotydy modyfikacje do badań hybrydyzacji.

8.3. Analiza dupleksów z modyfikacją w środku łańcucha

W przypadku wprowadzenia modyfikacji **67** lub **68** w środku łańcucha oligodeoksynukleotydu, widoczny jest bardziej wyrazisty efekt destabilizujący strukturę dupleksu DNA. Przy obu modyfikacjach zaobserwowałem znaczny wzrost wartości entalpii swobodnej w stosunku do struktury wzorcowej. Bardzo duży spadek temperatury topnienia (wynoszący około 20°C) potwierdza wpływ destabilizujący na strukturę DNA. Łatwy do zaobserwowania jest również wpływ sekwencji wprowadzonej modyfikacji na trwałość dupleksu. W przypadku próbki **71-71B** użyłem modyfikacji **67**, dla której wartość ΔG jest niższa, a T_m wyższa od próbki **72-72B**, w której użyłem modyfikacji **68**. Uzyskane wyniki pozwalają mi wyciągnąć wniosek, że modyfikacja **67**, zbudowana z dwóch acyklicznych analogów adenozyiny połączonych układem triazolowym, ma mniej destabilizujący charakter i lepiej imituje struktury naturalnie występujące w niciach DNA.

Zmniejszenie stabilności układów zawierających modyfikacje w środku łańcucha, pozwala mi przypuszczać że efekt destabilizujący zwiększy się, a trwałość dupleksów DNA ulegnie zmniejszeniu, w przypadku pochodnych **71D** i **72D**. Prawdopodobnie w układach posiadających modyfikacje w środku i na końcu łańcucha, dojdzie do złożenia się efektów występujących w przypadku przebadanych struktur z modyfikacją w jednej pozycji.

V. Podsumowanie

Zgodnie z założeniem mojej pracy, przeprowadziłem syntezę acyklicznych bloków budulcowych posiadających podstawnik alkinowy lub azydkowy. Otrzymane przeze mnie związki zostały scharakteryzowane spektroskopowo (NMR, MS, IR). Przeprowadziłem próby syntezy acyklicznych analogów nukleozydów, w których część cukrowa była zastąpiona otrzymanymi wcześniej blokami budulcowymi wyposażonymi w grupę azydkową lub alkinową. Wybrane nowe analogi acyklicznych nukleozydów charakteryzują się aktywnością w reakcji CuAAC, prowadzącej do utworzenia analogów dinukleotydu połączonych ugrupowaniem triazolowym, zamiast występującego klasycznie łącznika fosforanowego.

Struktury analogów dinukleotydu zostały przebadane spektroskopowo i zmodyfikowane w celu przystosowania do zautomatyzowanej syntezy DNA na podłożu stałym. Przeprowadziłem syntezę oligodeoksynukleotydu 12-merów posiadających zmodyfikowany fragment dinukleotydu, wprowadzony na końcu lub w środku łańcucha. Obserwacje na etapie automatycznej syntezy wykazały większy spadek wydajności kondensacji w przypadku modyfikacji w środku łańcucha niż na jego końcu. Przeprowadziłem również syntezę oligomerów DNA, 12-merów, o sekwencji komplementarnej oraz łańcuchów wzorcowych – nie posiadających modyfikacji. W ramach badań przesiewowych część otrzymanych związków została przebadana pod kątem aktywności biologicznej (przeciwnowotworowej) i jedna ze struktur wykazała aktywność porównywalną do Cytarabiny – znanego leku przeciwnowotworowego.

W następnym etapie swojej pracy, przeprowadziłem dokładne oczyszczanie 12-merów za pomocą techniki HPLC. Zgodnie z przypuszczeniem, największym problemem było oddzielenie konkurencyjnie utworzonych 10-merów, które powstawały kiedy modyfikacji nie udało się wprowadzić do łańcucha. Oddzieliłem czyste łańcuchy zawierające oba typy modyfikacji, na końcu i w środku łańcucha. Operacja oczyszczania modyfikowanych oligomerów okazała się znacznie trudniejsza niż rutynowe oczyszczanie nici komplementarnych i wzorcowych. Uzyskano jednorodne preparaty a masy syntetyzowanych 12-merów zostały potwierdzone przy pomocy techniki MALDI.

W ostatnim etapie swojej pracy, przeprowadziłem badanie termodynamiki dla dupleksów zbudowanych z nici modyfikowanej i nici komplementarnej. Przeprowadziłem również

analizę dla dupleksów wzorcowych – zbudowanych z nici wzorcowej oraz komplementarnej. Wyniki pomiarów potwierdziły tezę o destabilizującym charakterze wprowadzonej modyfikacji. Temperatura topnienia (T_m) dupleksów zawierających nić modyfikowaną zmniejszyła się względem dupleksów wzorcowych. Potwierdziłem również, że modyfikacja na końcu nici ma mniejszy wpływ destabilizujący niż modyfikacja w środkowej części łańcucha. Obniżenie stabilności łańcucha było jednak na tyle niewielkie, że nie wyklucza użycia oligomerów zawierających dinukleotydowe modyfikacje do badań hybrydyzacji.

Uzyskane wyniki nakłaniają do przeprowadzenia prób syntezy acyklicznych analogów nukleozydów posiadających pozostałe zasady purynowe i pirymidynowe. Warte uwagi i dalszych badań, byłoby również skrócenie acyklicznego połączenia, co mogłoby wpłynąć na zwiększenie trwałości syntetyzowanych oligomerów.

Zaprezentowane wyniki ukazały się drukiem w formie publikacji i 2 komunikatów na konferencjach krajowych oraz 1 komunikatu na konferencji międzynarodowej.

SPIS PUBLIKACJI I KOMUNIKATÓW

Publikacje

- M. Gładysz, J. Milecki „Zastosowanie chemii „Click” w modyfikacjach nukleozydów i oligonukleotydów”, *Wiadomości Chemiczne*, **2014**, 68, 7-8, 617-643
- M. Gładysz, J. Milecki „Metoda chemii „Click” w otrzymywaniu analogów dinukleotydów zawierających łącznik triazolowy”, *Nauka i przemysł – metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości*, **2013**, 353-356

Komunikaty

- M. Gładysz, J. Milecki, J. Nowak-Karnowska „Acyclic dinucleotide analogues obtained via Click Chemistry”, XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids *Chemical Biology of Nucleic Acids*, Poznań 2014

- M. Gładysz, J. Milecki „*Metoda chemii „Click” w otrzymywaniu analogów dinukleotydów zawierających łącznik triazolowy*”, VI Ogólnopolskie Sympozjum „Nauka i przemysł – metody spektroskopowe w praktyce, nowe wyzwania i możliwości” Lublin 2013
- M. Gładysz, J. Milecki „*Acykliczne analogi dinukleotydów otrzymywane metodą chemii „Click”*”, 55. Zjazd PTChem i SITPChem, Białystok 2012
- M. Gładysz, J. Milecki „*Synteza acyklicznych analogów nukleozydów o funkcjonalności w chemii „Click”*”, 54. Zjazd PTChem i SITPChem, Lublin 2011
- M. Gładysz, J. Milecki „*Otrzymywanie analogów dinukleotydów metodą „Click”*”, 53. Zjazd PTChem i SITPChem, Gliwice 2010

VI. Część eksperymentalna

1. Uwagi ogólne

1.1. Odczynniki

Sigma-Aldrich - Adenina, Guanina, Tymina, Cytosyna

Fluka – Dowex 50W

SAFC® Proligo® Reagents - Amidofosforyny do automatycznej syntezy DNA

SAFC® Proligo® Reagents - odczynniki do automatycznej syntezy DNA

Wszystkie pozostałe odczynniki używane w prowadzonych syntezach, zostały zakupione w firmie Sigma-Aldrich lub Avantor.

1.2. Rozpuszczalniki organiczne

Rozpuszczalniki stosowane w syntezach:

- Chlorek metylenu i Chloroform - destylowany znad bezwodnego K_2CO_3 ;
- Pirydyna - zasypiana KOH na 24h i destylowana, powtórnie destylowana znad CaH_2 , przechowywana nad sitami molekularnymi 4Å;
- Dimetyloformamid – destylowany znad CaH_2 pod zmniejszonym ciśnieniem, przechowywany nad sitami molekularnymi 4Å;
- Pozostałe rozpuszczalniki pochodziły z firmy Avantor i w razie konieczności były destylowane.

Rozpuszczalniki stosowane do automatycznej syntezy DNA:

- Acetonitryl - J.T. Baker HPLC Analyzed Ultra Gradient Grade.

Rozpuszczalniki i odczynniki stosowane do HPLC:

- Acetonitryl – J.T. Baker, HPLC Analyzed Ultra Gradient Grade;
- Metanol – J.T. Baker, HPLC Analyzed Gradient Grade;
- woda destylowana i dejonizowana (Milipore Super Q System);
- Octan amonu cz.d.a. POCH.

1.3. Chromatografia cienkowarstwowa i kolumnowa

Chromatografię cienkowarstwową (TLC) wykonywałem na płytkach DC Kieselgel 60 F₂₅₄ firmy Merck. Chromatogramy obserwowałem w świetle UV ($\lambda=254$ nm) lub wywoływałem stosując roztwór 10 % kwasu siarkowego (VI) w alkoholu etylowym i wygrzewając płytki aż do wypalenia analizowanych substancji.

W chromatografii kolumnowej stosowałem technikę flash-chromatography. Używałem żel krzemionkowy Kieselgel 60H i Kieselgel 60 HF₂₅₄ firmy Merck.

1.4. Badania aktywności biologicznej

Badania aktywności przeciwnowotworowej zostały przeprowadzone przez dra n. farm. Piotra Ruszkowskiego w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Przeprowadzono kolorymetryczny test SRB. Rozpuszczone w DMSO próbki badano w porównaniu ze standardem, analogiem nukleozydowym - cytarabiną.

1.5. Zautomatyzowana synteza DNA

Zautomatyzowaną syntezę oligodeoksynukleotydów przeprowadziłem na aparacie *K&A Laborgeraete DNA/RNA Synthesizer H-6*.

Do syntezy oligonukleotydów użyłem odpowiednich odczynników:

- TCA Deblock marki SAFC® (L020250-04) roztwór kwasu trichlorooctowego w dichlorometanie 3/100 (v/v). Odczynnik ten służy do odblokowania DMTr- z nukleozydu (lub z podłoża z przyłączoną zablokowaną zasadą) do którego ma być przyłączony kolejny nukleozyd.
- Oxidizer 0,1M roztwór jodu w THF i pirydynie marki SAFC (L360045). Pełni on funkcje utleniacza. THF/H₂O/Pirydyna/jod 77/2/21/2,54 (v/v/v/w).
- Cap A (L34005) marki SAFC; THF, bezwodnik octowy, 2,6-lutydyna.
- Cap B (L350045) marki SAFC; THF, 1-metyloimidazol.

Syntezę przeprowadziłem w skali 0.2μM. Do suszenia kolumnienek stosowałem Argon czystości N 5.0.

1.6. Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Analizy HPLC wykonywałem na aparatach firmy Agilent 1260 i 1200 wyposażonych w detektor UV-Vis. Chromatogramy rejestrowałem przy długości fali 260 nm.

Doczyszczanie produktów po syntezie przeprowadziłem na kolumnach stosując elucję gradientową

Zastosowałem kolumny chromatograficzne:

- Waters X-Bridge prep C18 5 μm 10×150 mm;
- Agilent Poroshell 120 EC-C18 2,7 μm 4,6×100 mm.

1.7. Pomiary temperatur topnienia i pełnej termodynamiki dupleksów

Pomiary wykonałem w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu, we współpracy z Panią dr Anną Pasternak. Wszystkie analizy przeprowadziłem na spektrofotometrze Beckman DU-70 z termoprogramatorem z użyciem metody topnienia UV (*ang.* UV melting).

1.8. Pomiary spektralne

Wszystkie widma ^1H , ^{13}C , ^{31}P oraz ^{15}N NMR wykonane zostały w Środowiskowym Laboratorium Unikalnej Aparatury Chemicznej Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Analizy przeprowadzono na 3 spektrometrach:

- Spektrometr Bruker Avance 600 MHz
- Spektrometr NMR Varian VNMR-S 400 MHz
- Spektrometr NMR VARIAN Mercury 300 MHz

Widma były mierzone przy użyciu takich rozpuszczalników jak CDCl_3 , CD_3OD , DMSO-d_6 lub D_2O . Wartości przesunięć chemicznych dla ^1H -NMR i ^{13}C -NMR określono w skali δ (ppm) w dół pola elektromagnetycznego względem tetrametylosilanu (TMS) jako wzorca wewnętrznego lub zewnętrznego (D_2O). Widma ^{31}P -NMR dla bloków amidofosforynowych były mierzone z dodatkiem DABCO jako stabilizatora, względem wzorca zewnętrznego (85% H_3PO_4).

Widma masowe wykonano z zastosowaniem techniki elektrospray na spektrometrze ZQ Waters-Micromass oraz na spektrometrze Varian 4000MS z pułapką jonową połączonym z chromatografem gazowym CP3800 zaopatrzonym w kolumnę VF-5ms.

Widma masowe MALDI TOF MS w trybie jonów dodatnich wykonano na spektrometrze Bruker ultrafleXtreme stosując jako matrycę kwas 3-hydroksypikolinowy a jako kalibrant peptide calibration standard (Bruker).

Widma absorpcji UV były rejestrowane w kuwetach kwarcowych ($l=0.5$ cm lub $l=0.1$ cm) na spektrofotometrze Cary 100 UV-Vis Agilent. Absorpcja pochodząca od rozpuszczalnika była odejmowana.

2. Synteza alkinowego bloku budulcowego

2.1. Synteza 2-fenilo-1,3-dioksan-5-olu (44)

Świeżo destylowany aldehyd benzoesowy (53g; 0,5 mol) rozpuściłem w 50ml toluenu i dodałem bezwodną glicerynę (55,3g; 0,6 mol) w 50ml toluenu. Do mieszaniny dodałem kwas p-toluenosulfonowy (2g; 0,01 mol) i rozpocząłem ogrzewanie pod chłodnicą zwrotną zaopatrzoną w aparat Deana-Starka. Reakcję prowadziłem przez pięć godzin w temperaturze wrzenia toluenu (110,6°C), odprowadzając wydzielającą się wodę. Kiedy woda przestała się skraplać przerwałem reakcję. Po ostygnięciu mieszaniny zobojętniłem ją za pomocą 4M roztworu wodorotlenku potasu. Następnie dwukrotnie przemyłem mieszaninę wodą i jeden raz nasyconym roztworem chlorku sodu. Warstwę organiczną suszyłem nad bezwodnym MgSO₄, następnie odparowałem, a pozostałość krystalizowałem ze schłodzonej mieszaniny heksan-toluen (w stosunku objętościowym 5:3). Otrzymałem około 20 gramów produktu, co stanowi w przybliżeniu wydajność równą 20%.

Związek znany jest w literaturze i został przebadany spektroskopowo [113]. Wykonana przeze mnie analiza H¹ NMR potwierdziła zgodność z opisem literaturowym, potwierdzając właściwą identyfikację produktu.

2.2. Synteza 2-fenilo-5-(prop-2-ynyl-1-oksy)-1,3-dioksanu (46)

2-Fenilo-1,3-dioksan-5-ol (**44**) - substrat reakcji (2,1g; 12 mmol) rozpuściłem w 15ml DMF i ochłodziłem do 0°C. Następnie dodałem wodorek sodu (0,42g; 18mmol) w kilku niewielkich porcjach, kontrolując żeby reakcja nie zaszła zbyt gwałtownie. Następnie pozostawiałem układ na mieszadle magnetycznym przez kolejne 30 minut. Po tym czasie dodałem bromku propargilu (1,73g; 15 mmol) i zostawiłem reakcję w temperaturze pokojowej na 12 do 24 godzin.

Po tym czasie skontrolowałem przebieg reakcji za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC (faza rozwijająca toluen-octan etylu 7:3, v/v). Reakcję zakończyłem dodając do mieszaniny 70ml wody i ekstrahowałem trzema porcjami (po 30ml) chloroformu. Fazę organiczną suszyłem nad bezwodnym MgSO₄ i odparowałem do sucha. Surową mieszaninę

produktów oczyszczałem chromatograficznie (CH_2Cl_2 :AcOEt 1:1 + MeOH 1,5%) otrzymując 0,84g czystego produktu. Wydajność reakcji wynosiła 33,1%.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3), δ 2,43 (m, 1H, CCH), 3,65 (p, $J=1,7\text{Hz}$, 1H, H-5), 4,09 (dd, $J_1=12,9\text{Hz}$, $J_2=1,6\text{Hz}$, 2H, OCH_2CCH), 4,37 (m, 4H, H-4, 4' i H-6, 6'), 5,56 (s, 1H, H-2), 7,35 (m, 3H, fenyl), 7,50 (m, 2H, fenyl)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3), δ 55,51; 68,63; 74,85; 77,20; 79,34; 101,30; 126,06; 128,15; 128,88; 138,04

2.3. Synteza 2-(prop-2-ynyl-1-oksy)-propan-1,3-diolu (49)

2-Fenyl-5-(prop-2-ynyl-1-oksy)-1,3-dioksan (**46**) – substrat reakcji (5,73g; 26 mmol) umieściłem w 15ml kwasu mrówkowego (90%). Reakcję mieszałem na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Jej przebieg kontrolowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC (faza rozwijająca toluen-octan etylu 7:3, v/v). Reakcję zakończyłem rozcieńczając mieszaninę wodą i przeprowadzając trzykrotną ekstrakcję małymi porcjami heksanu. Fazę wodną odparowałem do sucha.

W drugim etapie reakcji, surowy produkt pierwszego etapu umieściłem w 10ml metanolu i dodałem 5ml 25% wody amoniakalnej. Reakcję kontynuowałem przez 12 godzin, kontrolując jej przebieg za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC (faza rozwijająca toluen-octan etylu 7:3, v/v). Po tym czasie mieszaninę reakcyjną odparowałem do sucha uzyskując 3,71g surowego produktu.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3), δ 1,34 (t, $J=5,4\text{Hz}$, 2H, OH), 2,93 (t, $J=2,9\text{Hz}$, 1H, CCH), 3,53-3,31 (m, 5H, H-1, H-1', H-2, H-3, H-3'), 4,11 (d, $J=3,1\text{Hz}$, 2H, OCH_2CCH)

2.4. Synteza 3-dimetoksytrytylo-2-(prop-2-ynyl-1-oksy)-propan-1-olu (50)

2-(Prop-2-ynyl-1-oksy)-propan-1,3-diol (**49**) – substrat reakcji (0,5g; 3,84 mmol) trzykrotnie odparowałem z acetonitrylem. Następnie rozpuściłem substrat w 30ml bezwodnego acetonitrylu i dodałem trietyloaminy (0,4g; 3,84 mmol). Do tak przygotowanej mieszaniny

dodałem chlorek dimetoksytrytylu (1,3g; 3,84 mmol) i prowadziłem reakcje w temperaturze pokojowej, na mieszadle magnetycznym, przez 12 godzin. Przebieg reakcji śledziłem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC (faza rozwijająca toluen-octan etylu 7:3, v/v). Płytki spryskiwałem również 10% roztworem H₂SO₄ w etanolu i wypalałem na płycie grzewczej.

Reakcje zakończyłem, mieszaninę zagęściłem na wyparce, a pozostałość rozpuściłem w CH₂Cl₂ i ekstrahowałem 15 ml nasyconego roztworu NaHCO₃. Fazę organiczną wysuszyłem nad MgSO₄ i odparowałem do sucha. Surową mieszaninę produktów oczyszczałem chromatograficznie (CH₂Cl₂:heksan 1:1 + MeOH 1%) otrzymując 0,41g produktu monopodstawionego, co stanowiło wydajność 25%.

¹H NMR (CDCl₃), δ 2,43 (t, J=2,3Hz, 1H, CCH), 3,30-3,16 (m, 2H, H-1, 1'), 3,78-3,58 (m, 4H, OH, H-3, 3', H-2), 3,79 (s, 6H, OCH₃), 4,24 (dd, J₁=15,8Hz, J₂=2,4Hz, 1H, OCH₂CCH), 4,34 (dd, J₁=15,8Hz, J₂=2,4Hz, 1H, OCH₂CCH), 7,47-6,76 (m, 13H, trytyl)

ESI-MS m/z 455 (M+Na⁺), obliczono m/z 432,5 dla C₂₇H₂₈O₅

2.5. Synteza 2-(prop-2-ynyl-1-oksy)-3-(tert-butyldifenylosililo)-propan-1-olu (52)

2-(Prop-2-ynyl-1-oksy)-propan-1,3-diol (**49**) – substrat reakcji (1,17g; 9 mmol) rozpuściłem w 10ml THF i ochłodziłem do 0°C. Następnie dodałem wodorek sodu (0,216g; 9mmol) w kilku niewielkich porcjach, kontrolując żeby temperatura nie wzrosła gwałtownie. Następnie pozostawiałem układ na mieszadle magnetycznym przez kolejne 30 minut. Po tym czasie dodałem chlorku *tert*-butyldifenylosililu (2,47g; 9 mmol) i kontynuowałem mieszanie na mieszadle magnetycznym przez około 2 godziny do temperatury pokojowej. Przebieg reakcji śledziłem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC (faza rozwijająca toluen-octan etylu 7:3, v/v).

Po tym czasie zakończyłem reakcję, mieszaninę wlałem do 30 ml eteru dietylowego i ekstrahowałem dwukrotnie 10% roztworem K₂CO₃ oraz nasyconym roztworem chlorku sodu (porcje po około 10-15ml). Fazę organiczną suszyłem nad bezwodnym MgSO₄ i odparowałem do sucha.

Substrat reakcji odzyskałem przez ekstrakcje fazy wodnej za pomocą mieszaniny CHCl_3 :izopropanol 3:1.

Surową mieszaninę produktów oczyszczałem chromatograficznie (CHCl_3 :heksan 1:3 + MeOH 3%) otrzymując 1,75g produktu monopodstawionego, co stanowiło wydajność 53%.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3), δ 1,06 (s, 9H, t-butyl), 2,06 (ddd, $J_1=6,8\text{Hz}$, $J_2=4,8\text{Hz}$, $J_3=1,2\text{Hz}$, 1H, OH), 2,41 (t, $J=2,4\text{Hz}$, 1H, CCH), 3,84-3,62 (m, 5H, H-1, H-1', H-2, OCH_2CCH), 4,19 (dd, $J=15,9\text{Hz}$, 1H, H-3), 4,28 (dd, $J=15,9\text{Hz}$, 1H, H-3'), 7,49-7,34 (m, 6H, fenyl), 7,72-7,63 (m, 4H, fenyl)

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3), δ 19,13; 26,77; 57,56; 62,66; 63,41; 74,48; 79,41; 79,94; 127,75; 129,80; 133,07; 135,53

ESI-MS m/z 391 ($\text{M}+\text{Na}^+$), 407 ($\text{M}+\text{K}^+$), obliczono m/z 368,54 dla $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{Si}$

2.6. Synteza 2-(prop-2-ynyl-1-oksy)-3-(tert-butyldifenylosililo)-1-tosylopropanu (54)

2-(Prop-2-ynyl-1-oksy)-3-(tert-butyldifenylosililo)-propan-1-ol (**52**) – substrat reakcji (1,75g; 4,75 mmol) umieściłem w 20ml destylowanego CH_2Cl_2 i dodałem DMAP (1,76g; 14,25 mmol). Mieszając na mieszadle magnetycznym ochłodziłem mieszaninę do około 0°C i dodałem chlorku tosyłu (1,83g; 9,5 mmol). Reakcję prowadziłem przez 2-3 godziny, pozwalając ogrzać się do temperatury pokojowej. Przebieg reakcji śledziłem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC (faza rozwijająca toluen-octan etylu 7:3, v/v).

Po tym czasie zakończyłem reakcję, rozcieńczyłem mieszaninę za pomocą CH_2Cl_2 i dwukrotnie ekstrahowałem za pomocą wody oraz nasyconego roztworu NaHCO_3 . Fazę organiczną suszyłem nad MgSO_4 i odparowałem do sucha.

Surową mieszaninę produktów oczyszczałem chromatograficznie (CH_2Cl_2 :heksan 1:3 + AcOEt 1,5%) otrzymując 2,06g produktu, co stanowiło wydajność 83,1%.

¹H NMR (CDCl₃) δ 0,99 (s, 9H, t-butyl), 2,32 (t, J=2,4Hz, 1H, CCH), 2,42 (s, 3H, CH₃-Tos), 3,61 (dd, J₁=10,8Hz, J₂=6,2Hz, 1H, H-1), 3,70 (dd, J₁=10,8Hz, J₂=4,9Hz, 1H, H-1'), 3,80 (m, 1H, H-2), 4,11 (m, 3H, OCH₂CCH, H-3), 4,27 (dd, J₁=10,4Hz, J₂=3,9Hz, 1H, H-3'), 7,82-7,26 (m, 14H, fenyl)

¹³C NMR (CDCl₃) δ 19,09; 21,63; 26,67; 57,61; 62,08; 69,25; 74,65; 76,44; 77,20; 79,26; 127,73; 127,99; 129,80; 132,91; 135,51; 144,76

ESI-MS m/z 545 (M+Na⁺), 561 (M+K⁺) obliczono m/z 522,73 dla C₂₉H₃₄O₅SSi

3. Synteza azydowego bloku budulcowego

3.1. Synteza 2-(azydometylo)oksiranu (55)

Epichlorohydrynę (50g; 0,54 mmol) umieściłem w 100ml wody destylowanej i mieszałem energicznie na mieszadle magnetycznym. Następnie powoli i w małych porcjach, za pomocą wkraplacza, dodawałem do mieszaniny roztwór azydku sodu (39g; 0,6mmol) w 140ml wody destylowanej. Roztwór dodawałem w czasie 2-3 godzin, a następnie mieszałem przez kolejne 30 minut. Po tym czasie oddzieliłem dolną warstwę, a górną ekstrahowałem trzema porcjami dichlorometanu po 60ml. Ekstrakty i wcześniej oddzieloną dolną warstwę połączyłem i suszyłem nad bezwodnym $MgSO_4$.

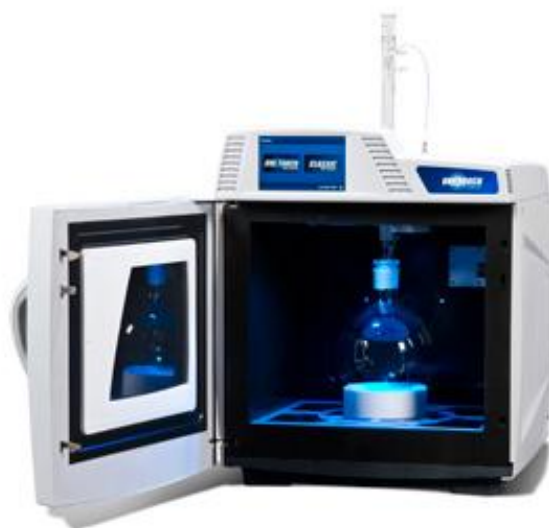
Następnie, mieszaninę produktów oczyszczałem chromatograficznie ($CH_2Cl_2 + MeOH$ 2,5%). Frakcje zawierające produkt monopodstawiony połączyłem, zagęściłem i oczyszczałem za pomocą destylacji próżniowej.

Związek znany jest w literaturze i został przebadany spektroskopowo [115]. Wykonana przeze mnie analiza H^1 NMR potwierdziła zgodność z opisem literaturowym, potwierdzając właściwą identyfikację produktu.

4. Procedura syntezy acyklicznych analogów nukleozydowych

4.1. Procedura syntezy w reaktorze mikrofalowym

W moim projekcie badawczym wykorzystałem reaktor mikrofalowy – MARS 6 firmy CEM Corporation. Komorę pieca wyposażono w mieszadło magnetyczne i podkładkę pod kolbę. Do zestawu została dorobiona szklana rura ze szlifem, tak żeby połączyć chłodnicę zwrotną umiejscowioną w górnym otworze obudowy, z kolbą reakcyjną. Aparat MARS 6 zaprezentowany jest na **rysunku 23**.



Rys. 23 (<http://www.cem.com/mars6.html>)

Przed wstawieniem reakcji w piecu mikrofalowym, suszyłem stosowane zasady azotowe i bezwodny K_2CO_3 w ponad $100^\circ C$, pod zmniejszonym ciśnieniem (2mm Hg) przez 2-3 godziny. Substrat alkinowy również suszyłem pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze pokojowej. Substrat azydkowy używany był w sprzęganiu z zasadą azotową, krótko po destylacji (bez dodatkowego suszenia).

Substratem wyjściowym był blok budulcowy alkinowy lub azydkowy. Względem tego substratu wyznaczałem ilość stosowanej zasady azotowej jako 2 ekwiwalenty molowe. Mieszaninę umieszczałem w 10-20ml DMF i dodawałem około 200mg K₂CO₃.

Reakcje prowadziłem w piecu mikrofalowym, ustalając czas wzrostu temperatury do 140°C w ciągu 1 minuty. Następnie temperatura 140°C była utrzymywana przez 30 minut. Po tym czasie chłodziłem układ reakcyjny, pobierałem próbkę i sprawdzałem postęp reakcji za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC (faza rozwijająca chloroform-metanol 9:1, v/v). Reakcje powtarzałem w tych samych warunkach w 8 lub 10 cyklach trzydziesto minutowych. Cały proces zajmował od 4 do 5 godzin.

Mieszaninę poreakcyjną sączyłem, a rozpuszczalnik odparowywałem. Surowy produkt oczyszczałem chromatograficznie (CH₂Cl₂ + MeOH 3%).

4.2. Procedura syntezy klasycznej

Przed rozpoczęciem reakcji suszyłem stosowane zasady azotowe i bezwodny K₂CO₃ w ponad 100°C, pod zmniejszonym ciśnieniem (2mm Hg) przez 2-3 godziny. Substrat alkinowy również suszyłem pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze pokojowej. Substrat azydkowy używany był w sprzęganiu z zasadą azotową, krótko po destylacji (bez dodatkowego suszenia).

Substratem wyjściowym był blok budulcowy alkinowy lub azydkowy. Względem tego substratu wyznaczałem ilość stosowanej zasady azotowej jako 2 ekwiwalenty molowe. Mieszaninę umieszczałem w 10-20ml DMF i dodawałem około 200mg K₂CO₃.

Reakcję prowadziłem na łaźni olejowej w 60°C, z użyciem mieszadła magnetycznego i chroniąc przed dostępem wilgoci. Po ustaleniu się temperatury, pozostawiałem reakcję na 3 doby intensywnie ją mieszając. Przebieg reakcji śledziłem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC (faza rozwijająca chloroform-metanol 9:1, v/v).

Kiedy zanik substratów był niemal całkowity, mieszaninę poreakcyjną sączyłem, a rozpuszczalnik odparowywałem. Surowy produkt oczyszczałem chromatograficznie (CH₂Cl₂ + MeOH 3%).

W wyniku reakcji sprzęgania zasad azotowych ze zsyntetyzowanymi wcześniej blokami budulcowymi, otrzymałem dwa acykliczne analogi adenozyiny – jeden zawierający alkinową grupę funkcyjną (**58**), a drugi ugrupowanie azydkowe (**59**). Otrzymałem również analog

tymidyny posiadający podstawnik azydkowy (**60**). Reakcje otrzymywania pochodnych azydowych przebiegały z niższą wydajnością (od 31%), natomiast otrzymywanie analogu adenozyiny z podstawnikiem propargilowym przebiegało z wyższą wydajnością (do 86%).

4.3. Dane spektralne otrzymanych acyklicznych analogów nukleozydów

58

¹H NMR (DMSO) δ 1,00 (s, 9H, t-butyl), 3,25 (t, $J=2,4\text{Hz}$, 1H, CCH), 3,70 (m, 2H, H-1, H-1'), 4,22-4,01 (m, 3H, H-2, OCH₂CCH), 4,28 (dd, $J_1=14,3\text{Hz}$, $J_2=7,3\text{Hz}$, 1H, H-3), 4,40 (dd, $J_1=14,3\text{Hz}$, $J_2=4,4\text{Hz}$, 1H, H-3'), 7,18 (s, 2H, NH₂), 7,67-7,36 (m, 10H, fenyl), 8,03 (s, 1H, H-8 adeniny), 8,14 (s, 1H, H-2 adeniny)

¹³C NMR (DMSO) δ 18,78; 26,58; 43,59; 56,88; 63,32; 76,77; 77,01; 79,90; 118,52; 127,89; 129,90; 132,53; 135,06; 141,19; 149,71; 152,38; 155,91

59

¹H NMR (DMSO) δ 3,24 (dd, $J_1=12,7\text{Hz}$, $J_2=5,9\text{Hz}$, 1H, H-3), 3,36 (m, 1H, H-3'), 4,10 (m, 2H, H-1, H-1'), 4,20 (m, 1H, H-2), 5,65 (d, $J=5,1\text{Hz}$, 1H, OH), 7,21 (s, 2H, NH₂), 8,05 (s, 1H, H-8 adeniny), 8,14 (s, 1H, H-2 adeniny)

60

¹H NMR (DMSO) δ 1,75 (d, $J=1,2\text{Hz}$, 3H, CH₃), 3,39-3,15 (m, 2H, H-3, H-3'), 3,48 (dd, $J_1=13,7\text{Hz}$, $J_2=8,3\text{Hz}$, 1H, H-1), 3,75 (dd, $J_1=13,7\text{Hz}$, $J_2=3,9\text{Hz}$, 1H, H-1'), 3,91 (m, 1H, H-2), 5,56 (d, $J=5,6\text{Hz}$, 1H, OH), 7,4 (q, $J=0,9\text{Hz}$, 1H, H-6 tyminy), 11,23 (s, 1H, NH)

ESI-MS m/z 248 (M+Na⁺), 264 (M+K⁺) obliczono m/z 225,2 dla C₈H₁₁N₅O₃

5. Modyfikacja zasad pirymidynowych.

5.1. Synteza N⁴-benzoiocytozyny (61)

Cytozynę (1,1g; 10mmol) odparowałem trzykrotnie z pirydyną. Następnie umieściłem cytozynę w 10ml pirydyny na mieszadle magnetycznym. Za pomocą wkraplacza dodawałem do mieszaniny chlorek benzoilu (2,8g; 20 mmol) w małych porcjach, przez 30 minut. Reakcję kontynuowałem przez dobę, kontrolując jej przebieg za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej TLC (faza rozwijająca chloroform-metanol 95:5, v/v).

Po tym czasie zakończyłem reakcję, dodałem do mieszaniny metanolu i odsączyłem wytrącony osad. Osad przemyłem etanolem i suszyłem pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskałem łącznie 1,98g produktu, co stanowiło wydajność równą 93%.

Dane spektralne lit. [119,120]

5.2. Synteza N³-benzoiotyminy (62)

Tyminę (1,26g; 10 mmol) umieściłem w mieszaninie 6,5ml pirydyny i 16ml acetonitrylu na mieszadle magnetycznym. Następnie za pomocą wkraplacza dodawałem do zawiesiny chlorek benzoilu (5,6g; 40 mmol) w małych porcjach. Reakcję kontynuowałem przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji śledziłem za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej TLC (faza rozwijająca chloroform-metanol 95:5, v/v).

Po tym czasie zakończyłem reakcję. Odparowałem rozpuszczalniki do sucha, a pozostałość umieściłem w mieszaninie 15ml dioksanu i 15ml wody. Do roztworu dodałem K₂CO₃ (2g; 15 mmol) i umieściłem całość na mieszadle magnetycznym, w temperaturze pokojowej na czas 24 godzin. Przebieg reakcji śledziłem za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej TLC (faza rozwijająca chloroform-metanol 95:5, v/v).

Po zakończeniu reakcji, mieszaninę zakwasiłem roztworem 1N kwasu solnego – do pH=3; i odsączyłem wytrącony osad.

Produkt rekrytalizowałem z etanolu, otrzymując 1,1g oczyszczonego związku, co stanowiło 48% wydajności.

Dane spektralne lit. [118]

6. Reakcja typu „Click” i przygotowanie substratów do automatycznej syntezy oligodeoskynukleotydów.

6.1. Odblokowanie alkinowego analogu nukleozydowego (63)

Substrat reakcji – modyfikowaną acykliczną adenozyne (58) posiadającą podstawnik alkinowy oraz *tert*-butylodifenylosililową grupę ochronną (1,5g; 3,1 mmol), umieściłem w 20ml świeżo destylowanego THF. Następnie dodałem w dużym nadmiarze trifluorowodoru trietyloaminy (2,69g; 16 mmol) i pozostawiłem reakcję na mieszkadle magnetycznym w temperaturze pokojowej przez dwie doby. Postęp reakcji kontrolowałem za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej TLC (faza rozwijająca chloroform-metanol 9:1, v/v).

Po prawie całkowitym zaniku substratu, zakończyłem reakcję przez dodanie do mieszaniny nasyconego roztworu NaHCO₃, do uzyskania odczynu obojętnego pH. Zobojętnioną mieszaninę odparowałem do sucha. Przeprowadziłem dwukrotną ekstrakcję z pirydyną na gorąco. Pozostałość odparowałem do sucha.

W celu pozbycia się zanieczyszczeń nieorganicznych przygotowałem kolumnę jonowymienną Dowex H⁺. Wypełnienie wprowadziłem na kolumnę w wodzie, a następnie przemyłem ją 3% roztworem HCl i wymyłem wodą do pH=7, w celu przeprowadzenia w formę H⁺. Surową mieszaninę poreakcyjną wprowadziłem na kolumnę i po przemyciu kolumny wodą (10 objętości kolumny) wymywałem 3% roztworem amoniaku w wodzie. Oczyszczony produkt uzyskałem w kilku frakcjach, które odparowałem do sucha.

Ostatecznie otrzymałem 590 mg czystego produktu, co dało łączną wydajność 77%.

¹H NMR (D₂O) δ 2,37 (t, J=2,4Hz, 1H, CCH), 3.67 (dd, J₁=12.4Hz, J₂=4.8Hz, 1H, H-3) 3.85 (dd, J₁=12.4Hz, J₂=4.0Hz, 1H, H-3'), 4,44-4,00 (m, 5H, H-1, H-1', H-2, OCH₂CCH), 4,90-4,74 (m, 1H, OH), 7,46 (m, 2H, NH₂), 8,18 (m, 1H, H-8 adeniny), 8,53 (m, 1H, H-2 adeniny)

6.2. Trytylowanie odblokowanego alkinowego analogu nukleozydu (64)

Odblokowany substrat alkinowy (**63**) (540mg; 2,2 mmol) odparowałem trzykrotnie z pirydyną. Następnie umieściłem w 20ml destylowanej pirydyny na mieszadle magnetycznym i dodałem 1,5 ekwiwalentu molowego chlorku dimetokstytrytylu (1,11g; 3,3 mmol). Reakcję prowadziłem przez 24 godziny w temperaturze pokojowej, postęp reakcji kontrolowałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC (faza rozwijająca chloroform-metanol 95:5, v/v).

Po tym czasie mieszaninę reakcyjną odparowałem do sucha. Pozostałość rozpuściłem w destylowanym dichlorometanie i ekstrahowałem trzykrotnie niewielkimi porcjami nasyconego roztworu NaHCO₃. Fazę organiczną suszyłem nad bezwodnym MgSO₄ i odparowałem do sucha.

Surowy produkt oczyściłem za pomocą chromatografii kolumnowej (CH₂Cl₂ + MeOH 5%). Otrzymałem 760mg czystego produktu reakcji trytylowania, co stanowiło wydajność wynoszącą 63%.

¹H NMR (CDCl₃) δ 2,14 (t, J=2,4Hz, 1H, CCH), 3,20 (dd, J₁=10,4Hz, J₂=4,7Hz, 1H, H-3), 3,30 (dd, J₁=10,4Hz, J₂=4,4Hz, 1H, H-3'), 3,80 (s, 6H, OCH₃), 4,15-3,93 (m, 2H, H-2, OCH₂CCH), 4,35-4,14 (m, 2H, H-1, OCH₂CCH), 4,47 (dd, J₁=14,4Hz, J₂=3,4Hz, 1H, H-1'), 5,67 (s, 2H, NH₂), 7,00-6,71 (m, 4H, fenyl), 7,57-7,15 (m, 9H, fenyl), 7,90 (d, 1H, H-8 adeniny), 8,33 (s, 1H, H-2 adeniny)

¹³C NMR(CDCl₃) δ 45,14; 55,22; 57,62; 62,71; 74,53; 76,11; 78,91; 86,46; 113,19; 126,90; 127,90; 128,04; 129,97; 135,66; 141,83; 144,50; 152,75; 155,21; 158,55

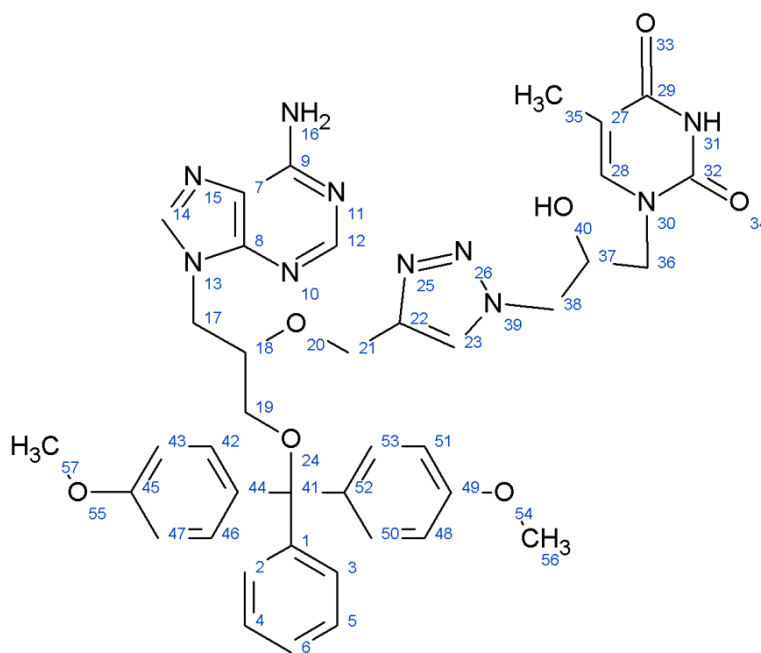
6.3. Procedura sprzęgania typu „Click” pomiędzy alkinem i azydkiem

Reakcje sprzęgania prowadziłem w układzie rozpuszczalników THF/H₂O/t-BuOH (jak 3:1:1, v/v), używając nadmiaru pochodnej zawierającej grupę azydkową względem alkinowego bloku budulcowego (jak 1,2:1 ekwiwalentu molowego). Do mieszaniny reakcyjnej dodawałem odpowiednie ilości katalizatora- CuSO₄; i reduktora- askorbinianu sodu.

6.3.1. Synteza dinukleotydu adenozyno-tymidynowego połączonego układem triazolowym (65)

W mieszaninie rozpuszczalników (o łącznej objętości 15ml) umieściłem, w niedużym nadmiarze, azydkowy blok budulcowy - pochodną tymidyny (**60**) (50mg; 0,22 mmol). Następnie dodałem do mieszaniny substrat alkinowy (**63**) (100mg; 0,18 mmol) i wprowadziłem CuSO₄ (12,5 mg; 0,05 mmol) oraz askorbinian sodu (30mg, 0,15 mmol). Reakcje prowadziłem przez dobę w temperaturze pokojowej, na mieszkadle magnetycznym. Jej przebieg śledziłem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC (faza rozwijająca chloroform-metanol 9:1, v/v).

Mieszaninę reakcyjną odparowałem do sucha i oczyszczałem za pomocą chromatografii kolumnowej (CH₂Cl₂ + MeOH 7%). Otrzymałem 93mg czystego produktu, co stanowi wydajność równą 66%.



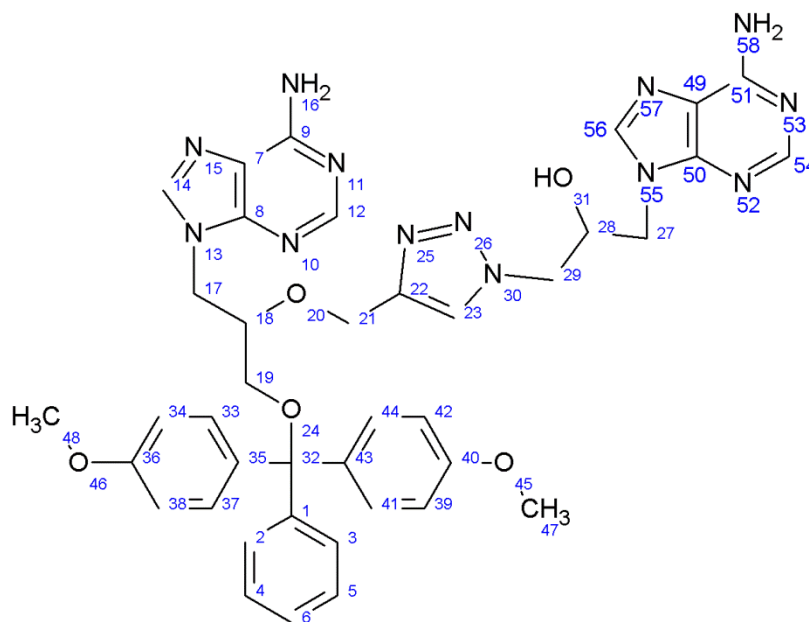
Rys. 24 Przyjęta podczas analizy widm numeracja atomów cząsteczki związku 65

¹H NMR (DMSO) δ 1,77-1,70 (m, 3H, CH₃ tyminy), 3,02-2,90 (m, 2H, H-19, H-19'), 3,45 (m, 4H, H-36, H-36', H-18, OH), 3,73 (s, 6H, OCH₃), 3,87-3,78 (m, 1H, H-37), 4,55-4,17 (m, 4H, H-17, H-17', H-38, H-38'), 4,63 (dd, J₁=12,2Hz, J₂=1,4Hz, 2H, H-21, H-21'), 7,41-6,85 (m, 16H, trytyl, H-23, NH₂), 7,97-7,88 (m, 1H, H-6 tyminy), 8,32 (s, 2H, H-8 i H-2 adeniny), 11,27 (d, J=1,5Hz, 1H, NH)

6.3.2. Synteza dinukleotydu adenozyno-adenozynowego połączonego układem triazolowym (66)

W mieszaninie rozpuszczalników (o łącznej objętości 15ml) umieściłem, w niedużym nadmiarze, azydkowy blok budulcowy - pochodną adenozyiny (**59**) (218mg; 0,92 mmol). Następnie dodałem do mieszaniny substrat alkinowy (**63**) (420mg; 0,75 mmol) i wprowadziłem CuSO_4 (25mg; 0,1 mmol) oraz askorbinian sodu (60mg, 0,3 mmol). Reakcję prowadziłem przez dobę w temperaturze pokojowej, na mieszadle magnetycznym. Jej przebieg śledziłem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC (faza rozwijająca chloroform-metanol 9:1, v/v).

Mieszaninę reakcyjną odparowałem do sucha i oczyszczałem za pomocą chromatografii kolumnowej ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 + \text{MeOH}$ 7%). Otrzymałem 480mg czystego produktu, co stanowi wydajność równą 80%.



Rys. 25 Przyjęta podczas analizy widm numeracja atomów cząsteczki związku 66

^1H NMR (DMSO) δ 3,20-3,06 (m, 1H, H-19), 3,47-3,35 (m, 1H, H-19'), 3,72 (s, 6H, OCH_3), 4,08 (m, 1H, H-17), 4,37-4,20 (m, 6H, H-29, H-29', H-17', H-18, H-28, H-27), 4,53-4,43 (m, 2H, H-21, H-27'), 4,63 (dd, $J_1=12,2\text{Hz}$, $J_2=1,5\text{Hz}$, 1H, H-21'), 5,66 (d, $J=4,5\text{Hz}$, 1H, OH), 7,41-6,80 (m, 18H, trytyl, H-23, $2\times\text{NH}_2$), 8,17-7,89 (m, 4H, $2\times$ H-2 i H-8 adeniny)

6.4.1. Fosfitylacja dinukleotydu adenozy-no-adenozynowego (67)

Substrat reakcji – analog dinukleotydu (**66**) (390mg, 0,5 mmol), suszyłem w kolbie reakcyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem przez 3 godziny. Następnie napelniłem kolbę argonem i dodałem 5ml THF.

Za pomocą dokładnie wysuszonych pod zmniejszonym ciśnieniem strzykawkę, dodałem do roztworu DIPEA (105mg, 0,82 mmol) i chloro(diizopropylamino)- β -cyanoetoksyfosfinę (165mg, 0,7 mmol). Reakcję prowadziłem na mieszadle magnetycznym przez dobę w atmosferze argonu. Postęp reakcji śledziłem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC (faza rozwijająca chloroform-metanol 9:1, v/v).

Po tym czasie zakończyłem reakcję dodając do mieszaniny destylowanego metanolu (1ml), trietyloaminę (1ml) i rozpuściłem mieszaninę w octanie etylu (30ml). Następnie przemyłem fazę organiczną za pomocą nasyconych roztworów NaHCO₃ i NaCl. Mieszaninę poreakcyjną zagęściłem na wyparce, odparowując rozpuszczalniki prawie do sucha. Surowy produkt oczyszczałem za pomocą chromatografii kolumnowej (CH₂Cl₂ + MeOH 3% + Et₃N 1%). Otrzymałem 238mg czystego produktu, co stanowiło wydajność równą 49%.

³¹P NMR (CDCl₃) δ 151,22 (główny sygnał), 7,55 (średni sygnał), 4,82 (mały sygnał)

¹³C NMR (CDCl₃) δ 10,59; 14,82; 20,26; 21,31; 22,74; 23,29; 24,41; 34,38; 43,10; 45,83; 50,71; 51,88; 52,46; 55,17; 57,83; 58,49; 62,47; 63,19; 70,16; 71,15; 86,33; 113,14; 117,63; 119,08; 123,76; 124,37; 126,83; 127,85; 129,94; 135,64; 141,62; 144,13; 149,98; 152,75; 155,25; 158,47; 176,54

6.4.2. Fosfitylacja dinukleotydu adenozy-no-tymidynowego (68)

Substrat reakcji – analog dinukleotydu (**65**) (86mg, 0,11 mmol), suszyłem w kolbie reakcyjnej pod zmniejszonym ciśnieniem przez 3 godziny. Następnie napelniłem kolbę argonem i dodałem 1ml THF.

Za pomocą wysuszonych pod zmniejszonym ciśnieniem strzykawkę, dodałem do roztworu DIPEA (23,25mg, 0,18 mmol) i chloro(diizopropylamino)- β -cyanoetoksyfosfinę (36,3mg, 0,154 mmol). Reakcję prowadziłem na mieszadle magnetycznym przez dobę w atmosferze

argonu. Postęp reakcji śledziłem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC (faza rozwijająca chloroform-metanol 9:1, v/v).

Po tym czasie zakończyłem reakcję dodając do mieszaniny destylowanego metanolu (1ml), trietyloaminę (1ml) i rozpuściłem mieszaninę w octanie etylu (30ml). Następnie przemyłem fazę organiczną za pomocą nasyconych roztworów NaHCO₃ i NaCl. Mieszaninę poreakcyjną zagęściłem na wyparce, odparowując rozpuszczalniki prawie do sucha. Surowy produkt oczyszczałem za pomocą chromatografii kolumnowej (CH₂Cl₂ + MeOH 3% + Et₃N 1%). Otrzymałem 98mg czystego produktu, co stanowiło wydajność równą 91%.

³¹P NMR (CDCl₃) δ 151,25 (główny sygnał), 7,30 (średni sygnał), 4,60 (mały sygnał)

¹³C NMR (CDCl₃) 8,06; 12,17; 14,77; 19,22; 20,30; 21,54; 23,26; 24,44; 34,36; 43,17; 52,90; 55,16; 62,49; 86,31; 110,19; 112,98; 113,12; 118,50; 126,80; 127,99; 129,05; 129,93; 135,60; 144,32; 151,80; 152,79; 155,41; 158,44

7. Badania aktywności biologicznej

7.1. Zastosowane kultury bakteryjne

Zarówno linia komórek rakowych HeLa (komórki raka szyjki macicy) jak i linia komórek KB (komórki raka jamy nosowo-gardłowej) zostały wyhodowane na podłożu RPMI 1640 medium. Do każdej z prowadzonych hodowli dodano 10% płodowej surowicy cielęcej, 1% L-glutaminy i 1% roztwór penicyliny ze streptomycyną. Linie komórkowe były przechowywane w inkubatorze w temperaturze 37°C. Optymalną gęstość posiewu linii komórkowych ustalono jako 5×10^4 . Wykorzystane linie komórkowe zostały pozyskane z The European Collection of Cell Cultures (ECACC) i dostarczone przez firmę Sigma-Aldrich.

7.2. Analiza cytotoksyczności In vitro

W badaniach zastosowano znacznik białkowy sulforhodamine B (SRB, firmy Sigma-Aldrich), wykorzystywany w testach kolorymetrycznych mikrokultur bakteryjnych. Znacznik ten został opracowany w National Cancer Institute w USA, służy jako czuły wskaźnik białkowej zawartości komórkowej, pozwalając liniowo oszacować gęstość komórkową [121]. Monowarstwa komórkowa została trypsynowana i ustalono liczbę komórek – 5×10^4 . Następnie w każdej ze studzienek w płytce 96-dołkowej do mikromiareczkowania, umieszczono 0,1ml rozcieńczonej zawiesiny komórkowej (w przybliżeniu 10000 komórek). Po 24 godzinach, kiedy częściowa monowarstwa została utworzona, wymyto supernatant i dodano 100µl sześciu różnych stężeń badanych związków do komórek na płytce do mikromiareczkowania. Związki testowano w przedziale stężeń 0.1 do 100 µg/ml. Związki rozpuszczano w DMSO (1mg związku - 100µl rozpuszczalnika), którego zawartość w przeprowadzonych testach nie przekraczała 0,1%. Zastosowano stężenie próbek wynoszące 20µM. które nie było toksyczne dla linii komórkowych. Komórki rakowe były poddane działaniu testowanych związków przez 72 godziny. Po tym czasie dodano do studzienek 25µl 50% kwasu trichlorooctowego i inkubowano płytki przez 1 godzinę w 4°C. Następnie przemyto płytki wodą destylowaną w celu usunięcia podłoża i suszono na powietrzu. Wysuszone płytki zostały zabarwione za pomocą 100µl SRB i przechowane przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie pozbyto się nadmiaru niezwiązanego znacznika,

przez gwałtowne przepłukanie płytek 1% roztworem kwasu octowego. Płytki suszono na powietrzu przez noc. Pomiar gęstości optycznej wykonano przy długości fali wynoszącej 490nm. W każdym eksperymencie próbki zawierające określone stężenia związków nanoszono na płytki 96-dółkowe trzykrotnie w trzech powtórzeniach. Mierzono zdolność przetrwania komórek w zadanych warunkach, jako procentową absorbancję w porównaniu do próbki kontrolnej (komórki nie poddane działaniu badanych substancji). Jako wzorzec wewnętrzny zastosowano Cytarabinę (dostarczoną przez firmę Sigma-Aldrich).

8. Zautomatyzowana synteza DNA

W procedurze syntezy automatycznej wykorzystałem aparat *K&A Laborgeraete DNA/RNA Synthesizer H-6* (Rysunek 26).



Rys. 26

Syntezę przeprowadziłem w skali 0.2 μ M.

Po określeniu sekwencji oligodeoksynukleotydów (12-merów) syntetyzowanych w procesie zautomatyzowanym, wyznaczyłem ilość przyłączeń poszczególnych amidofosforynów do tworzonych nici. Na tej podstawie określiłem potrzebną ilość otrzymanych przeze mnie amidofosforynów analogów acyklicznych dinukleotydów, jak również niemodyfikowanych bloków amidofosforynowych poszczególnych zasad.

Jakkolwiek używałem standardowej procedury, przedstawię szczegółowo tok syntezy, by uwypuklić etapy na których następowała niecałkowita kondensacja rosnącego oligomeru z przyłączonym amidofosforynem. Skutkowało to trudnościami podczas wydzielania modyfikowanych oligomerów.

Na 197mg związku **67** i 195mg związku **68** rozpuszczonych w 2ml acetonitrylu, do syntezy przygotowałem:

- dA 437,5mg rozpuszczonego w 5,1mL ACN,
- dT 268mg rozpuszczonego w 3,6mL ACN,
- dC 475mg rozpuszczonego w 5,7mL ACN,
- dG 370mg rozpuszczonego w 4,2mL ACN,

uzyskując 0,1M roztwory amidofosforynów.

Starannie odważone amidofosforyny umieściłem w przeznaczonych do syntezy fiolkach i rozpuściłem w odpowiednich ilościach ACN. Następnie przygotowane roztwory podłączyłem do syntetyzera w wyznaczonych do tego pozycjach. Zmodyfikowane przeze mnie analogi acyklicznych dinukleotydów również umieściłem w określonych przez program pozycjach. Przed przystąpieniem do syntezy, przemyłem wszystkie przewody syntetyzera za pomocą acetonitrylu i przepuściłem przez nie argon, a następnie niewielkie ilości używanych amidofosforynów.

Następnie zgodnie z instrukcją obsługi urządzenia i procedurą prowadzenia prawidłowej syntezy łańcucha oligomeru, wprowadziłem żadaną sekwencję oligodeoksynukleotydu w programie syntetyzera i rozpocząłem proces syntezy. Procedurę powtórzyłem dla sześciu nici zawierających otrzymane przeze mnie modyfikacje. Ustaliłem też program dla syntezy dwóch nici wzorcowych oraz dla dwóch nici komplementarnych. Powtórzyłem syntezę oligomerów o sekwencji komplementarnej, ponieważ były potrzebne w największej ilości w dalszych badaniach.

Procedura zautomatyzowanej syntezy na podłożu stałym składa się z kilku powtarzających się cyklicznie etapów. W pierwszej kolejności należało podłączyć do aparatu, w odpowiednich pozycjach, kolumnienki zawierające podłoże stałe do syntezy (starannie odważone), z przyłączonym już do niego pierwszym nukleotydem zadanej sekwencji. Następnie przepuściłem przez kolumnienki roztwór TCA Deblock, w celu usunięcia grupy ochronnej DMTr. Odblokowanie zaobserwowałem przez pojawienie się w kolumnie jasnopomarańczowej barwy- charakterystycznej dla karbokationu dimetoksytrytylowego powstającego w silnie kwaśnych warunkach. Po przemyciu kolumnienek wprowadziłem na nie odpowiednie roztwory amidofosforynów. Po dokonaniu przyłączenia, znikome ilości pozostałych nieprzereagowanych grup OH poddano reakcji acetylowania za pomocą

roztworów Cap A i Cap B. Następnie wprowadziłem na kolumnienki roztwór utleniacza (Oxidizer), utleniając estry P(III) do P(V), w ten sposób cykl został zamknięty. W celu uzyskania łańcucha DNA o długości 12 zasad, powtórzyłem cykl syntetyczny 12 razy. Za każdym razem cykl składał się dokładnie z takich samych etapów, jedyna różnica polegała na tym, że w przypadku nici modyfikowanych wprowadzałem na kolumnienki odpowiednio modyfikowany analog dinukleotydu (**67** lub **68**) w określonym momencie. Przeprowadziłem syntezę 3 typów modyfikowanych oligomerów:

- modyfikacja została wprowadzona na końcu 5' łańcucha (zasada 11 i 12);
- modyfikacja została wprowadzona w środku łańcucha (zasada 6 i 7);
- modyfikacja została wprowadzona zarówno w środku jak i na końcu łańcucha.

Po syntezie 12-merów usunąłem blokadę DMTr z końca 5' każdego łańcucha, przemyłem kolumnienki za pomocą ACN i wysuszyłem argonem. W celu usunięcia grup ochronnych z otrzymanych oligodeoksynukleotydów i usunięcia ich z podłoża stałego, przeniósłem zawartość kolumnienek do szczelnie zamykanych fiolek i dodałem do każdej po 1ml stężonego roztworu amoniaku. Reakcję kontynuowałem przez dobę w temperaturze 55°C. Po tym czasie przesączyłem zawartość fiolek oddzielając podłoże od roztworu zawierającego oligomery, do przemywania fiolek i podłoża użyłem metanolu. Supernatant odparowałem do sucha.

Przeprowadzając wstępne oczyszczanie 12-merów, rozpuściłem je w 0,7ml roztworu 10mM NH₄OAc. Następnie przesączyłem przez kolumnienki NAP wypełnione żelem Sephadex, które wcześniej kondycjonowałem przemywając 30ml 10mM roztworu octanu amonu (wymycie roztworu konserwującego NaN₃). Za pomocą pipety automatycznej nanosiłem po 0,7ml substancji na szczyt kolumny NAP. Oligomery DNA wymywałem przygotowanym roztworem octanu amonu. Eluent zbierałem do siedmiu probówek typu Eppendorf, do każdej po około 1,2ml roztworu. Oczyszczanie na kolumnienkach NAP powtórzyłem dla wszystkich zsyntetyzowanych nici DNA.

Uzyskane we wstępnym oczyszczaniu roztwory oligomerów poddałem analizie UV-Vis, selekcjonując frakcje o najwyższej absorbancji przy długości fali 260nm (zwykle frakcje 2-4). Dla każdej nici połączyłem frakcje o najwyższym stężeniu DNA i widmie UV niewskazującym na obecność zanieczyszczeń i odparowałem je do sucha, przygotowując materiał do rozdziałów HPLC.

9. Analiza i rozdziały HPLC otrzymanych oligodeoksynukleotydów

Rozdziały przeprowadziłem na aparatach firmy Agilent – na **rysunku 27** przedstawiony jest przykładowy zestaw modułów HPLC.



Rys. 27

Do analiz stosowałem następujące układy:

- kolumna 1 - Waters X-Bridge prep C18 5 μm 10 \times 150 mm;
- kolumna 2 – Agilent Poroshell 120 EC-C18 2,7 μm 4,6 \times 100 mm.

Fazy:

A= 0,01M wodny roztwór octanu amonu,

B=50% CH₃CN w wodnym 0,01M roztworze octanu amonu,

C=H₂O,

D=CH₃CN.

Rozdziały prowadziłem w następujących warunkach:

Rozdział oligodeoksynukleotydów po syntezie:

- Oligodeoksynukleotydy bez modyfikacji:

Kolumna 1, przepływ 1 ml/min, fazy A i B

Zmiana gradientu fazy ruchomej w czasie:

czas (min)	%B
0	0
20	20

- Oligodeoksynukleotydy modyfikowane:

Kolumna 1, przepływ 1,5 ml/min, fazy A i B

Zmiana gradientu fazy ruchomej w czasie:

czas (min)	%B
0	0
5	5
25	10

Doczyszczanie oligodeoksynukleotydów:

Kolumna 2, przepływ 0,5 ml/min, fazy A i B

Zmiana gradientu fazy ruchomej w czasie:

czas (min)	%B
0	0
5	7
15	10
25	20

Odsalanie oligodeoksynukleotydów:

- Po elektroforezie:

Kolumna 1, przepływ 1,5 ml/min, fazy C i D

Zmiana gradientu fazy ruchomej w czasie:

czas (min)	%D
0	0
5	0
25	20

- Po rozdziale:

Kolumna 2, przepływ 0,8 ml/min, fazy C i D

Zmiana gradientu fazy ruchomej w czasie:

czas (min)	%D
0	0
3	0
10	20

Poszczególne nastrojki były różnej wielkości, w zależności od jakości rozdziału oraz ilości posiadanych nici 12-merowego DNA. W każdym przypadku zbierałem eluent zawierający oczyszczone oligodeoksynukleotydowe produkty, zgodnie z odczytem detektora. W pierwszej kolejności wykonywałem mały nastrojek analityczny, na podstawie którego określałem właściwą metodę dla jak najkorzystniejszego rozdziału produktów. Chromatogramy rejestrowałem dla długości fali 260nm. Po wybraniu określonych powyżej warunków, przystępowałem do nastrojków preparatywnych i zbierania frakcji, które mogły zawierać pożądane produkty. Mierzyłem wartość absorbancji przy 260nm i określałem ilość OD wyizolowanych oligodeoksynukleotydów. Następnie liofilizowałem zebrane eluenty i przeprowadzałem odsalanie wszystkich próbek. Po pozbyciu się soli (octanu amonu) z badanych frakcji, liofilizowałem je ponownie i przygotowywałem próbki do analizy MALDI TOF MS.

Po określeniu mas związków obecnych w poszczególnych próbkach, zdecydowałem w jakim czasie należy zbierać eluent podczas następnego rozdzału preparatywnego na HPLC. Powtarzałem nastrzyki z każdego oligodeoksynukleotydu, ale tym razem zbierałem produkt o określonym czasie retencji. Po liofilizacji próbek, ponownie analizowałem je na spektrofotometrze UV-Vis. Frakcje o wysokiej wartości absorbancji, a zatem zawierające największe ilości oligodeoksynukleotydowego produktu, łączyłem otrzymując próbki o wystarczającym stężeniu aby przeprowadzić analizę temperatur topnienia i energii swobodnej dla tworzonych przez nie dupleksów DNA (ok. 2 OD).

10. Analiza i rozdziały elektroforetyczne oligodeoksynukleotydów 71D i 72D

Rozdziału oligomerów dokonano na denaturującym żelu poliakrylamidowym o stężeniu 15%, zawierającym mocznik w stężeniu 7M. Bufor rozwijający: Tris-boran o stężeniu 0,125M, pH 7,5.

Na przygotowany żel o wymiarach 15x20cm i grubości 1,5mm naniosłem próbkę rozpuszczoną w buforze rozwijającym (150µl), zawierającym 30% mocznika, 0,005% błękitu bromofenolowego (BPB) i 0,005% ksilenocyjanolu (XC), jako barwników skalujących.

Próbkę (ok. 7 OD) naniosłem jako jedno pasmo o długości 10cm. Rozwijałem elektroforegram przy napięciu 400V, prądem o natężeniu 100 mA. Gdy szybciej migrujący barwnik osiągnął ok. 2/3 długości żelu, elektroforezę zakończyłem.

Pasma oligomerów zlokalizowałem pod lampą UV. Pasma zawierające pożądany oligomer wyciąłem skalpelem, rozdrobniłem żel na kawałki ok. 2x2mm, przenieśliem do probówki i dodałem 1,5ml 1,5M octanu amonu (NH₄OAc). Ługowałem oligomery przez minimum 8 godzin, odessałem roztwór za pomocą pipety i powtórzyłem ługowanie jeszcze dwukrotnie. Połączone roztwory odparowałem, usunąłem część NH₄OAc pod próżnią (0,5mm Hg, temp 30°C, 6 godzin). Pozostałość rozpuściłem w wodzie, zmierzyłem absorbancję przy 260nm i odsoliłem za pomocą HPLC. Uzyskałem następujące ilości oczyszczonych 12-merycznych oligomerów:

- 71D – 0,4 OD
- 72D – 0,5 OD

11. Pomiary temperatur topnienia i trwałości termodynamicznej dupleksów

Przed przystąpieniem do właściwych pomiarów obliczyłem stężenia oligodeoksynukleotydów potrzebnych do przygotowania badanych próbek. W tym celu przeprowadziłem pomiary absorbancji oraz współczynnika ekstynkcji próbek w temperaturze 80°C, w której łańcuchy DNA występują w formie jednoniciowej [122]. Zgodnie z założeniami modelu najbliższego sąsiedztwa, w wysokiej temperaturze współczynnik ekstynkcji oligodeoksynukleotydu równa się sumie arytmetycznej współczynników ekstynkcji wszystkich nukleotydów wchodzących w jego skład [123].

Pomiary trwałości termodynamicznej dupleksów DNA wykonywałem przy długości fali $\lambda = 260$ nm. Zakres temperatury pojedynczego eksperymentu wynosił 3-93°C, natomiast szybkość zmiany temperatury wynosiła 1°C/min. Wartość absorbancji próbek mierzyłem co pół minuty.

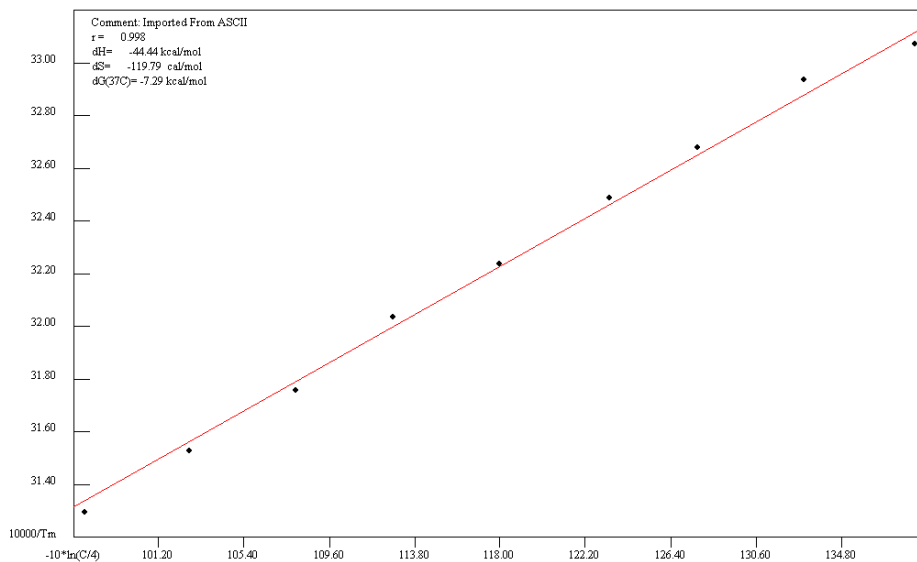
W celu uzyskania możliwie dokładnych parametrów termodynamicznych, pomiary dla każdego z dupleksów prowadziłem dla dziewięciu różnych stężeń – w zakresie 10^{-3} - 10^{-6} M. Pomiary wykonywałem w kuwetach kwarcowych o pojemności 30µl, 150µl oraz 300µl. Badany materiał rozpuszczałem w buforze o pH 7.0, który stanowił również referencję, zawierającym 100mM NaCl, 20mM Na(CH₃)₂AsO₂, 0.2mM EDTANa₂. W tym samym czasie prowadziłem pomiar trwałości termodynamicznej dla dwóch dupleksów w trzech różnych stężeniach – korzystając z komory pomiarowej z ruchomym wózkiem na sześć próbek. Po wykonanej analizie odzyskiwałem i odpowiednio rozcieńczałem buforem badane próbki (zgodnie z protokołem procedury pomiarów – **rysunek 28**). W ten sposób otrzymywałem próbki o mniejszych stężeniach do dalszych pomiarów. Czynności te powtarzałem w sumie dwukrotnie. W wyniku tak prowadzonych badań otrzymałem krzywe topnienia dla dziewięciu różnych stężeń badanych dupleksów.

	Sequence		Abs. (80C) in water	V (ml)	Dilution	# OD	Ext. Coeff	# Mol	Abs. (20C) in buffer
1	CTACGTTGGCTT		2,800	0,5	5	7,0	110000	6,36E-08	
1a	AAGCCAACGTAG		0,601	0,5	5	1,5	131200	1,15E-08	
	1-1a			ε260=	120600				
						1	1a		
Conc. #	Conc. (M)	Path (cm)	Th. Abs	Volume (ul)	# Mol	Vol. Stock A (ul)	Vol. Stock B (ul)	Vol. Prevs. (ul)	Vol. Buffer (ul)
1	1,5E-04	0,100	1,80	30	4,478E-09	17,59	97,75	Dry Down	30
2	8,9E-05	0,100	1,08	30	2,684E-09			17,98	12,02
3	5,4E-05	0,100	0,65	30	1,609E-09			17,98	12,02
4	3,2E-05	0,500	1,94	150	4,822E-09	18,94	105,26	Dry Down	150
5	1,9E-05	0,500	1,16	150	2,890E-09			89,91	60,09
6	1,2E-05	0,500	0,70	150	1,732E-09			89,91	60,09
7	6,9E-06	1,000	0,83	300	2,077E-09	8,16	45,34	Dry Down	300
8	4,1E-06	1,000	0,50	300	1,245E-09			179,83	120,17
9	2,5E-06	1,000	0,30	300	7,463E-10			179,83	120,17
					suma	293,04			

Rys. 28 Przykładowy protokół rozcieńczenia

Uzyskane krzywe topnienia poddałem analizie w programie MeltWin 3.5. Dzięki obróbce danych otrzymałem parametry termodynamiczne, entalpię (ΔH°), entropię (ΔS°) oraz energię swobodną (ΔG°), charakteryzujące dany dupleks DNA. Wartości powyższych parametrów obliczane były dla dupleksu o stężeniu 10^{-4} M na podstawie:

- dopasowania krzywych eksperymentalnych do teoretycznych krzywych topnienia;
- wykresu zależności odwrotności temperatury topnienia od logarytmu stężenia badanego dupleksu (rysunek 29).



Rys. 29 Przykładowy wykres zależności odwrotności temperatury topnienia od logarytmu stężenia dupleksu

Jeżeli różnice w wartościach parametrów termodynamicznych uzyskanych obydwoma metodami różnią się o mniej niż 15% przyjmuje się, że topnienie duplexu zachodzi według modelu dwustanowego (rys. 30).

Full Analysis				
Date: 4 Dec 2014 Comment: Imported From ASCII				
Melt Curve Results				
Concentration (M)	dH (kcal/mol)	dS (cal/K·mol)	dG (kcal/mol, 37°C)	Tm (°C)
1.524e-04	-81.93	-229.74	-10.67	54.61
9.424e-05	-86.96	-244.58	-11.10	54.07
5.691e-05	-78.68	-219.58	-10.57	52.28
3.452e-05	-84.98	-239.81	-10.61	50.00
2.095e-05	-79.36	-222.08	-10.48	49.11
1.263e-05	-75.82	-211.28	-10.29	47.49
7.692e-06	-75.34	-209.17	-10.46	46.99
4.523e-06	-73.04	-202.47	-10.25	44.87
2.811e-06	-73.28	-202.84	-10.37	44.09
Averages:	-78.82	-220.17	-10.53	49.28
Analysis of Melt Curve Fits/Errors				
dH (kcal/mol)	dS (cal/K·mol)	dG (kcal/mol, 37°C)	Tm (°C, 1.0e-4M)	
-78.82 ± 4.993	-220.17 ± 15.374	-10.53 ± 0.257	53.6	
Analysis of Tm Dependence/Errors				
dH (kcal/mol)	dS (cal/K·mol)	dG (kcal/mol, 37°C)	Tm (°C, 1.0e-4M)	
-75.11 ± 3.121	-208.81 ± 9.681	-10.35 ± 0.123	53.6	

Rys. 30 Przykładowy protokół z analizy krzywych topnienia w programie MeltWin 3.

VII. Wykaz stosowanych skrótów

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy	ANA – analog nukleozydu o aktywności przeciwwirusowej (ang. antiviral nucleoside analogue)
RNA – kwas rybonukleinowy	
5-FU - Fluorouracyl	TFO – oligonukleotydy tworzące potrójną helisę (ang. triplex forming oligonucleotides)
TBDPS – grupa <i>tert</i> -butylodifenylosililowa	RSV – wirus syncytium nabłonka oddechowego
Tos – grupa tosylowa	HCV – wirus zapalenia wątroby typu C
CuAAC – katalizowana miedzią(I) cykloaddycja azydek-alkin (ang. Copper(I) Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition)	ssDNA – jednoniciowe DNA
DMTr / DMT – grupa dimetoksytrytylowa	mRNA – matrycowe RNA
i-Pr – grupa izopropylowa	TMS – grupa trimetylosililowa
kat – katalizator	Ph – grupa fenylowa
R – postawnik alkinowy	Et – grupa etylowa
Nu – nukleofil	RNAi – interferencja RNA
RuAAC – katalizowana rutenem(II) cykloaddycja azydek-alkin (ang. Ruthenium(II) Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition)	dsRNA – dwuniciowe RNA
ASO – antysensowny oligonukleotyd (ang. antisense oligonucleotide)	ADAR – deaminaza adenozyiny dwuniciowego RNA
siRNA – małe interferujące RNA (ang. short-interfering RNA)	AZT – 3'-azydo-3'-deoksytymidyna
	PEG – glikol polietylenowy (ang. polyethylene glycol)
	N3BC – 7-azydo-4-(bromometylo)-2H-chromen-2-on

EPR – spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego	dNTP – trifosforan deoksynukleotydu
SDLS – ukierunkowane znakowanie spinowe (ang. Site-Directed Spin Labeling)	MSNT – aktywator 1-(mezytyleno-2-sulfoniano)-3-nitro-1,2,4-triazol
TEMPO – wolny rodnik 2,2,6,6-tetrametylopiperydyno-1-oksylowy	^{TL} DNA – DNA połączone układem triazolowym
TBTA – tris[(1-benzylo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metylo]amina	PNA – kwas peptydonukleinowy (ang. Peptide Nucleic Acid)
DIPEA – N,N-diizopropylometyloamina	Fmoc – grupa 9-fluorenylometyloksykarbonylowa
THF – tetrahydrofuran	TP – połączenie 1,2,3-triazolofosfonianowe
tBu – grupa <i>tert</i> -butylowa	Me – grupa metylowa
SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. Single Nucleotide Polymorphism)	SPAAC – katalizowana naprężeniem pierścienia cykloaddycja azydek-alkin (ang. Strain-Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition)
ODN – oligodeoksynukleotyd	HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa
Pyr – piren	PTSA – kwas p-toluenosulfonowy
HIV – ludzki wirus niedoboru odporności	rT – temperatura pokojowa
ANP – acykliczne fosfoniany nukleozydów (ang. Acyclic Nucleoside Phosphonate)	NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
CML – przewlekła białaczka szpikowa	ESI MS – spektrometria mas z jonizacją typu elektro-spray
AICAR – 5-amino-4-karboksyamidoimidazoilo-1-β-D-rybofuranozyd (Acadesine)	DMF – dimetyloformamid
TK – enzym kinaza tymidynowa	TLC – chromatografia cienkowarstwowa
dNK - kinaza deoksyrybonukleinowa	

DMAP – 4-dimetyloaminopirydyna

GC-MS – chromatografia gazowa
połączona ze spektrometrią mas

HeLa – komórki raka szyjki macicy

KB – komórki raka jamy nosowo-
gardłowej

SI – parametr Indeksu Selektywności

SRB – znacznik białkowy
sulforhodamine B

IC₅₀ – stężenie inhibitora hamujące 50%
prolifracji komórek

HDF – ludzkie fibroblasty skóry

MALDI TOF MS – spektrometria mas z
jonizacją typu desorpcji laserowej z
udziałem matrycy i analizatorem czasu
przelotu

UV-Vis – spektroskopia w zakresie światła
widzialnego oraz promieniowania
ultrafioletowego

OD – gęstość optyczna (zgodnie z
definicją 1 OD = absorbancja wynosząca
1 dla 1 ml roztworu na drodze optycznej
1 cm. Przy pomiarze dla długości fali
260 nm.)

T_m – temperatura topnienia

ΔH – zmiana entalpii

ΔS – zmiana entropii

ΔG – zmiana entalpii swobodnej

IR – spektroskopia w podczerwieni

DMSO – dimetylosulfotlenek

ACN – acetonitryl

BPB – błękit bromofenolowy

XC - ksilenocyjanol

VIII. Literatura

- [1] T. Brown, T. Brown (Jr.), Nucleic Acids Book, <http://www.atdbio.com/nucleic-acids-book>
- [2] H. Isobe, T. Fujino, N. Yamazaki, M. Guillot-Nieckowski, E. Nakamura, *Org. Lett.* 2008, **10**, 3729
- [3] A., Varizhuk, A., Chizhov, V. Florentiev, *Bioorg. Chem.* 2011, **39**, 127
- [4] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2001, **40**, 2004
- [5] F. Amblard, J.H. Cho, R.F. Schinazi, *Chem. Rev.* 2009, **109**, 4207
- [6] H.C. Kolb, K.B. Sharpless, *Drug Discov. Today* 2003, **8**, 1128
- [7] M. Meldal, C.W. Tornøe, *Chem. Rev.* 2008, **108**, 2952
- [8] V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2002, **41**, 2596
- [9] G. de Miguel, M. Wielopolski, D.I. Schuster, M.A. Fazio, O.P. Lee, C.K. Haley, A.L. Ortiz, L. Echegoyen, T. Clark, D.M. Guldi, *J. Am. Chem. Soc.* 2011, **133**, 13036
- [10] M. van Dijk, M.L. Nollet, P. Weijers, A.C. Dechesne, C.F. van Nostrum, W.E. Hennink, D.T.S. Rijkers, R.M.J. Liskamp, *Biomacromolecules* 2008, **9**, 2834
- [11] A.H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.* 2010, **39**, 1388
- [12] M. Dobkowski, M. Pieszko, M. Alenowicz, M. Wojciechowska, J. Ruczyński, P. Rekowski, P. Mucha, *Na Pograniczu Chemii i Biologii* 2012, **XXIX**, 21
- [13] M.V. Gil, M.J. Arevalo, O. Lopez, *Synthesis* 2007, **11**, 1589
- [14] L. Zhang, X. Chen, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, G. Jia, *J. Am. Chem. Soc.* 2005, **127**, 15998
- [15] B.C. Boren, S. Narayan, L. Rasmussen, G. Jia, V.V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.* 2008, **130**, 8923
- [16] I.S. Cho, J. Kim, D.H. Lim, H.C. Ahn, H. Kim, K.B. Lee, Y.S. Lee, *Biotechnol. Lett.* 2008, **30**, 1901
- [17] M.B. Miller, Y.W. Tang, *Clin. Microbiol. Rev.* 2009, **22**, 611
- [18] T.S. Seo, X.P. Bai, H. Ruparel, Z.M. Li, N.J. Turro, J.Y. Ju, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, **101**, 5488
- [19] Y. Chevolut, C. Bouillon, S. Vidal, F. Morvan, A. Meyer, J.-P. Cloarec, A. Jochum, J.-P. Praly, J.-J. Vasseur, E. Souteyrand, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2007, **46**, 2398
- [20] X. Liu, W. Farmerie, S. Schuster, W. Tan, *Anal. Biochem.* 2000, **283**, 56

- [21] K. Seio, Y. Takaku, K. Miyazaki, S. Kurohagi, Y. Masaki, A. Ohkubo, M. Sekine, *Org. Biomol. Chem.* 2009, **7**, 2440
- [22] J.G. Izant, H. Weintraub, *Cell* 1984, **36**, 1007
- [23] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.* 1990, **90**, 543
- [24] D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Kotliansky, D.W.Y. Sah, *Nat. Chem. Biol.* 2006, **2**, 711
- [25] A. Fire, S.Q. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, *Nature* 1998, **391**, 806
- [26] J.K. Watts, G.F. Deleavey, M.J. Damha, *Drug Discov. Today* 2008, **13**, 842
- [27] R.S. Geary, S.P. Henry, L.R. Grillone, *Clin. Pharmacokinet.* 2002, **41**, 255
- [28] J.H. Huffman, R.W. Sidwell, G.P. Khare, J.T. Witkowski, L.B. Allen, R.K. Robins, *Antimicrob. Agents Ch.* 1973, **3**, 235
- [29] S.I. Kim, D. Shin, H. Lee, B.Y. Ahn, Y. Yoon, M. Kim, *J. Hepatol.* 2009, **50**, 479
- [30] S. Khaliq, S.A. Khaliq, M. Zahur, B. Ijaz, S. Jahan, M. Ansar, *Biotechnol. Adv.* 2010, **28**, 27
- [31] H. Elayadi, M. Smietana, C. Pannecouque, P. Leyssen, J. Neyts, J.-J. Vasseur, H.B. Lazrek, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, **20**, 7365
- [32] D.R. Corey, *J. Clin. Invest.* 2007, **117**, 3615
- [33] A.H. El-Sagheer, T. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2010, **107**, 15329
- [34] M. Mascini, I. Palchetti, S. Tombelli, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012, **51**, 1316
- [35] K. Kaihatsu, B.A. Janowski, D.R. Corey, *Chem. Biol.* 2004, **11**, 749
- [36] T. Efthymiou, W. Gong, J-P. Desaulniers, *Molecules* 2012, **17**, 12665
- [37] P.M.E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2008, **47**, 3442
- [38] M.E. Ostergaard, D.C. Guenther, P. Kumar, B. Baral, L. Deobald, A.J. Paszczynski, P.K. Sharma, P.J. Hrdlicka, *Chem. Commun.* 2010, **46**, 4929
- [39] D.W. Dodd, K.N. Swanick, J.T. Price, A.L. Brazeau, M.J. Ferguson, N.D. Jones, R.H.E. Hudson, *Org. Biomol. Chem.* 2010, **8**, 663
- [40] F. Seela,; S.A. Ingale, *J. Org. Chem.* 2010, **75**, 284
- [41] H. Xiong, F. Seela, *Bioconjug. Chem.* 2012, **23**, 1230
- [42] A.H. El-Sagheer, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* 2009, **28**, 315
- [43] M.F. Jacobsen, J.B. Ravnsbaek, K.V. Gothelf, *Org. Biomol. Chem.* 2010, **8**, 50
- [44] F. Seela, H. Xiong, S. Budow, *Tetrahedron* 2010, **66**, 3930

- [45] Y. Saito, V. Escuret, D. Durantel, F. Zoulim, R.F. Schinazi, L.A. Agrofoglio, *Bioorg. Med. Chem.* 2003, **11**, 3633
- [46] K. El Akri, K. Bougrin, J. Balzarini, A. Faraj, R. Benhida, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, **17**, 6656
- [47] X. Ming, F. Seela, *Chem. Eur. J.* 2012, **18**, 9590
- [48] Z. Xiong, X.-L. Qiu, Y. Huang, F.-L. Qing, *J. Fluorine Chem.* 2011, **132**, 166
- [49] H. Krishna, M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* 2012, **134**, 11618
- [50] H. Peacock, O. Maydanovych, P.A. Beal, *Org. Lett.* 2010, **12**, 1044
- [51] E. Ohtsuka, M. Ikehara, D. Soll, *Nucleic Acids Res.* 1982, **10**, 6553
- [52] J.N. Wilson, E.T. Kool, *Org. Biomol. Chem.* 2006, **4**, 4265
- [53] A. Okamoto, Y. Saito, I. Saito, *J. Photoch. Photobio. C* 2005, **6**, 108
- [54] H. Addepalli, Meena; C.G. Peng, G. Wang, Y. Fan, K. Charisse, K.N. Jayaprakash, K.G. Rajeev, R.K. Pandey, G. Lavine, L. Zhang, *et al.* *Nucleic Acids Res.* 2010, **38**, 7320
- [55] P. Ding, D. Wunnicke, H.-J. Steinhoff, F. Seela, *Chem. Eur. J.* 2010, **16**, 14385
- [56] C. Beyer, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* 2010, **46**, 2230
- [57] P. Chittepu, V.R. Sirivolu, F. Seela, *Bioorg. Med. Chem.* 2008, **16**, 8427
- [58] S.M. Park, H. Yang, S.-K. Park, H.M. Kim, B.H. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, **20**, 5831
- [59] A. Montagu, V. Roy, J. Balzarini, R. Snoeck, G. Andrei, L.A. Agrofoglio, *Eur. J. Med. Chem.* 2011, **46**, 778
- [60] D.G. Streeter, J.T. Witkowski, G.P. Khare, R.W. Sidwell, R.J. Bauer, R.K. Robins, L.N. Simon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1973, **70**, 1174
- [61] B.Yu, X. Zhao, L.J. Lee, R.J. Lee, *AAPS J.* 2009, **11**, 195
- [62] S.T. Crooke, *Basic Principles of Antisense Therapeutics*, Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1998
- [63] M.L. Stephenson, P.C. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1978, **75**, 285
- [64] G.F. Deleavey, M.J. Damha, *Chem. Biol.* 2012, **19**, 937
- [65] N.K. Andersen, H. Dossing, F. Jensen, B. Vester, P. Nielsen, *J. Org. Chem.* 2011, **76**, 6177
- [66] A.J. Gutierrez, M.D. Matteucci, D. Grant, S. Matsumura, R.W. Wagner, B.C. Froehler, *Biochemistry* 1997, **36**, 743
- [67] P. Kumar, N. Chandak, P. Nielsen, P.K. Sharma, *Bioorg. Med. Chem.* 2012, **20**, 3843
- [68] P. Kocalka, N.K. Andersen, F. Jensen, P. Nielsen, *ChemBioChem* 2007, **8**, 2106

- [69] M. Whiting, J. Muldoon, Y.C. Lin, S.M. Silverman, W. Lindstrom, A.J. Olson, H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, J.H. Elder, *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2006, **45**, 1435
- [70] M. Robbins, A. Judge, I. MacLachlan, *Oligonucleotides* 2009, **19**, 89
- [71] K.Y. Chang, A. Ramos, *FEBS J.* 2005, **272**, 2109
- [72] B. Tian, P.C. Bevilacqua, A. Diegelman-Parente, M.B. Mathews, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004, **5**, 1013
- [73] H. Peacock, E. Fostvedt, P.A. Beal, *ACS Chem. Biol.* 2010, **5**, 1115
- [74] G. Qing, H. Xiong, F. Seela, T. Sun, *J. Am. Chem. Soc.* 2010, **132**, 15228
- [75] M.N. Manalo, L.M. Perez, A. LiWang, *J. Am. Chem. Soc.* 2007, **129**, 11298
- [76] S. Kellner, S. Seidu-Larry, J. Burhenne, Y. Motorin, M. Helm, *Nucleic Acids Res.* 2011, **39**, 7348
- [77] O. Schiemann, T.F. Prisner, *Q Rev. Biophys.* 2007, **40**, 1
- [78] N.G. Bushmakina, A.Y. Misharin, *Synthesis-Stuttgart* 1986, **11**, 966
- [79] H. Inoue, A. Imura, E. Ohtsuka, *Nippon Kagaku Kaishi* 1987, 1214
- [80] M. Koszytkowska-Stawinska, E. Mironiuk-Puchalska, T. Rowicki, *Tetrahedron* 2012, **68**, 214
- [81] M. Ganesan, K.M. Muraleedharan, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* 2010, **29**, 91
- [82] R. Duschinsky, E. Plevin, C. Heidelberger, *J. Am. Chem. Soc.* 1957, **79**, 4559
- [83] S.C. Mathew, Y. By, A. Berthault, M.-A. Virolleaud, L. Carrega, G. Chouraqui, L. Commeiras, J. Condo, M. Attolini, A. Gaudel-Siri, *et al.* *Org. Biomol. Chem.* 2010, **8**, 3874
- [84] M. Driowya, A. Puissant, G. Robert, P. Auberger, R. Benhida, K. Bougrin, *Ultrason. Sonochem.* 2012, **19**, 1132
- [85] A.S. Jorgensen, K.I. Shaikh, G. Enderlin, E. Ivarsen, S. Kumar, P. Nielsen, *Org. Biomol. Chem.* 2011, **9**, 1381
- [86] S.K. Singh, P. Nielsen, A.A. Koshkin, J. Wengel, *Chem. Commun.* 1998, 455
- [87] J. Lin, V. Roy, L. Wang, L. You, L.A. Agrofoglio, D. Deville-Bonne, T.R. McBrayer, S.J. Coats, R.F. Schinazi, S. Eriksson, *Bioorg. Med. Chem.* 2010, **18**, 3261
- [88] S. Van Poecke, A. Negri, F. Gago, I. Van Daele, N. Solaroli, A. Karlsson, J. Balzarini, S. Van Calenbergh, *J. Med. Chem.* 2010, **53**, 2902
- [89] J.-L. Yu, Q.-P. Wu, Q.-S. Zhang, X.-D. Xi, N.-N. Liu, Y.-Z. Li, Y.-H. Liu, H.-Q. Yin, *Eur. J. Med. Chem.* 2010, **45**, 3219
- [90] D. Baraniak, K. Kacprzak, L. Celewicz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, **21**, 723

- [91] T. Yamada, C.G. Peng, S. Matsuda, H. Addepalli, K.N. Jayaprakash, M.R. Alam, K. Mills, M.A. Maier, K. Charisse, M. Sekine, *et al.* *J. Org. Chem.* 2011, **76**, 1198
- [92] V. Roy, A. Obikhod, H.-W. Zhang, S.J. Coats, B.D. Herman, N. Sluis-Cremer, L.A. Agrofoglio, R.F. Schinazi, *Nucleos. Nucleot. Nucl.* 2011, **30**, 264
- [93] K. Fauster, M. Hartl, T. Santner, M. Aigner, C. Kreutz, K. Bister, E. Ennifar, R. Micura, *ACS Chem. Biol.* 2012, **7**, 581
- [94] O. Kaczmarek, H.A. Scheidt, A. Bunge, D. Foese, S. Karsten, A. Arbuzova, D. Huster, J. Liebscher, *Eur. J. Org. Chem.* 2010, 1579
- [95] S.P. Sau, P.J. Hrdlicka, *J. Org. Chem.* 2012, **77**, 5
- [96] K. Johansson, S. Ramaswamy, C. Ljungcrantz, W. Knecht, J. Piskur, B. Munch-Petersen, S. Eriksson, H. Eklund, *Nat. Struct. Biol.* 2001, **8**, 616
- [97] M. Hallek, L. Wanders, S. Strohmeyer, B. Emmerich, *Ann. Hematol.* 1992, **65**, 1
- [98] S. Eriksson, B. Munch-Petersen, K. Johansson, H. Eklund, *Cell. Mol. Life Sci.* 2002, **59**, 1327
- [99] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* 1919, **2**, 635
- [100] R. Micura, *Chem. Eur. J.* 1999, **5**, 2077
- [101] M.H. Caruthers, *Accounts Chem. Res.* 1991, **24**, 278
- [102] E. Paredes, S.R. Das, *ChemBioChem* 2011, **12**, 125
- [103] A. Nuzzi, A. Massi, A. Dondoni, *QSAR Comb. Sci.* 2007, **26**, 1191
- [104] T. Fujino, N. Yamazaki, H. Isobe, *Tetrahedron Lett.* 2009, **50**, 4101
- [105] D. Chouikhi, S. Barluenga, N. Winssinger, *Chem. Commun.* 2010, **46**, 5476
- [106] S.A. Thomson, J.A. Josey, R. Cadilla, M.D. Gaul, C.F. Hassman, M.J. Luzzio, A.J. Pipe, K.L. Reed, D.J. Ricca, R.W. Wiethe, *et al.* *Tetrahedron* 1995, **51**, 6179
- [107] F. Eckstein, *J. Am. Chem. Soc.* 1966, **88**, 4292
- [108] M. Sameiro, T. Goncalves, *Chem. Rev.* 2009, **109**, 190
- [109] M.D. Best, *Biochemistry* 2009, **48**, 6571
- [110] J.C. Jewett, C.R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* 2010, **39**, 1272
- [111] P. van Delft, N.J. Meeuwenoord, S. Hoogendoorn, J. Dinkelaar, H.S. Overkleeft, G.A. van der Marel, D.V. Filippov, *Org. Lett.* 2010, **12**, 5486
- [112] K.N. Jayaprakash, C.G. Peng, D. Butler, J.P. Varghese, M.A. Maier, K.G. Rajeev, M. Manoharan, *Org. Lett.* 2010, **12**, 5410
- [113] S. Vrbovska, A. Holy, R. Pohl, M. Masojdikova, *Collect. Chem. Commun.* 2006, **71**, 4, 543
- [114] C. Gonzales-Arellano, S. De, R. Luque, *Catal. Sci. Technol.*, 2014, **4**, 4242

- [115] J.H. Lutje Spelberg, L. Tang, R.M. Kellogg, D.B. Janssen, *Tetrahedron: Asymmetry* 2004, **15**, 1095
- [116] C.F. Liu, Y. Zeng, X.W. Lu, United States Patent Application 20110245458
- [117] J. Zhou, P.B. Shevlin, *Synthetic Communications*, 1997, **27**(20), 3591
- [118] T. Coppola, M. Varra, G. Oliviero, A. Galeone, G. D'Isa, L. Mayol, E. Morelli, M-R. Bucci, V. Vellecco, G. Cirino, N. Borbone, *Bioorg. Med. Chem.* 2008, **16**, 8244
- [119] I.M. Lagoja, S. Pochet, V. Boudou, R. Little, E. Lescrinier, J. Rozenski, P. Herdewijn, *J. Org. Chem.* 2003, **68**, 1867
- [120] J. Schmidt, B. Eschgfäller, S.A. Benner, *Helv. Chim. Acta* 2003, **86**, 2937
- [121] P. Skehan, R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J.T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M.R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.* 1990, **82**, 1107
- [122] M. Petersheim, D.H. Turner, *Biochemistry*, 1983, **22**, 256
- [123] A. Pasternak, J. Wengel, *NAR*, 2010, **38**(19), 6697