

SPIS TREŚCI

1. WPROWADZENIE	3
2. STOSOWANE SKRÓTY NAZW I SYMBOLE	5
3. WSTĘP TEORETYCZNY	8
3.1. Synteza oligonukleotydów z zastosowaniem metody fosfortriestrowej	9
3.1.1. Grupy ochronne i metody fosforylacji	10
3.1.1.1. Grupy ochronne zasad heterocyklicznych	10
3.1.1.2. Grupy ochronne funkcji hydroksylowych cukru	16
3.1.1.3. Grupy ochronne wiązania internukleotydowego	19
3.1.1.4. Reagenty fosforylujące	21
3.1.1.5. Reagenty kondensujące i katalizatory nukleofilowe	23
3.1.2. Synteza oligonukleotydów metodą fosfortriestrową	26
3.1.2.1. Synteza oligonukleotydów w roztworze	26
3.1.2.2. Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym	30
3.2. Grupy fotolabilne dla funkcji hydroksylowych w syntezie oligonukleotydów	33
4. CELE PRACY	38
5. BADANIA WŁASNE	42
5.1. Zastosowania grupy α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej (MeNPoc)	43
5.1.1. Synteza alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego (MeNP-OH)	43
5.1.2. Otrzymywanie pochodnych α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowych	45
5.1.3. Synteza amidofosforynów nukleozydów blokowanych na funkcji 5'-OH grupą α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylową	58
5.1.4. Potwierdzenie fotolabilności grupy α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej	61
5.2. Modyfikacje metody fosfortriestrowej	64
5.2.1. Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym metodą H-fosfonianową	65
5.2.2. Fosforylacja. Otrzymywanie monofunkcyjnych reagentów fosforylujących	67
5.2.2.1. Wytwarzanie wiązania fosfortriestrowego z wykorzystaniem monofunkcyjnych reagentów fosforylujących	72
5.2.2.2. Reakcje odblokowania grup ochronnych z atomu fosforu uzyskanych fosfortriestrow	74
5.2.3. Kondensacja. Sposoby aktywacji pirofosforanów powstających podczas reakcji kondensacji	80
5.2.4. Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym modyfikowaną metodą fosfortriestrową	83
5.2.4.1. Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym z zastosowaniem czynnika Efimova	83
5.2.4.2. Synteza podłoża stałego modyfikowanego sarkozyną	85
5.2.4.3. Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym modyfikowanym sarkozyną w nowym wariantcie metody fosfortriestrowej	87

6. PODSUMOWANIE	90
7. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	95
7.1. Odczynniki chemiczne	95
7.2. Aparatura	97
7.3. Techniki ogólne	98
7.4. Synteza alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego (41)	99
7.5. Synteza symetrycznego węglanu MeNPO-H (80)	101
7.6. Synteza pochodnej pentafluorofenylo α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej (54)	102
7.7. Synteza imidazolidu α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowego (42)	103
7.8. Synteza N-metyloimidazolidu α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowego (43)	103
7.9. Synteza nukleozydów z grupami aminowymi blokowanymi grupami kompatybilnymi z fotolabilną grupą ochronną MeNPoc	104
7.10. Synteza pochodnych nukleozydów blokowanych na funkcji 5'-OH grupą α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylową	106
7.11. Synteza 3'-amidofosforynów nukleozydów blokowanych na funkcji 5'-OH grupą α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylową	108
7.12. Odblokowanie grupy α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej (MeNPoc) z pochodnych nukleozydów 45A, 45C, 45G, 45T pod wpływem światła UV	111
7.13. Synteza oligonukleotydów metodą H-fosfonianową	111
7.14. Synteza p-chlorofenylo dichlorofosforanu (63)	112
7.15. Synteza 2-(2,4-dinitrofenylo)etanolu (72)	112
7.16. Synteza monofunkcyjnych czynników fosforylujących	113
7.17. Synteza fosfortriestrów z monofunkcyjnymi czynnikami fosforylującymi	115
7.18. Odblokowanie grup ochronnych z funkcji fosforanowych otrzymanych fosfortriestrów (73) i (74) do fosfordiestru (76)	117
7.19. Odblokowanie p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo 5'-O-dimetoksytrytylo tymidyn-3'-ylo fosforanu (75) pod wpływem światła UV do p-chlorofenylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (76)	118
7.20. Synteza pentametyloguanidyny (80)	119
7.21. Synteza 3'-O-benzoilotymidyny (83)	119
7.22. Synteza p-chlorofenylo 3'-O-benzoilotymidyn-5'-ylo fosforanu (84)	121
7.23. Synteza p-chlorofenylo 2-cyanoetylo 3'-O-benzoilotymidyn-5'-ylo fosforanu (85)	121
7.24. Synteza pirofosforanu bis(p-chlorofenylo 3'-O-benzoilotymidyn-5'-ylo) (88)	122
7.25. Synteza 3'-O-benzoilotymidynylo p-chlorofenylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (89)	122
7.26. Synteza 5'-O-dimetoksytrytylotymidyny związanej ze stałym nośnikiem modyfikowanym sarkozyną (95)	122
7.27. Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym z użyciem czynnika Efimova	125
7.28. Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym w nowym wariantcie metody fosfortriestrowej	125
8. LITERATURA	127

1. WPROWADZENIE

Scalone biblioteki oligonukleotydowe są od szeregu lat przedmiotem intensywnie prowadzonych prac badawczo-rozwojowych zmierzających do opracowania technologii tzw. chipów DNA. Synteza scalonych bibliotek oligonukleotydowych jest podstawą nowej technologii opartej na analizie sekwencji kwasów nukleinowych. Opiera się ona na jednoczesnej (równoległej) analizie różnych sekwencji kwasów nukleinowych. Zastosowanie tego typu analizy znajduje się w obszarze diagnostyki (wykrywanie mutacji, pojedynczych polimorfizmów nukleotydowych – SNP, analizy profilu ekspansji genów i sekwencjonowania kwasów nukleinowych przez hybrydyzację –SBH).¹⁻⁶ Technologie wykorzystujące biblioteki kombinatoryczne pod wieloma względami skutecznie konkurują z metodami klasycznymi, dzięki szybkości i łatwości ich syntezy, możliwości generowania wszystkich kombinacji określonego typu oligonukleotydów, a także oligonukleotydów zawierających modyfikacje chemiczne.^{4:7-9}

Ulepszenie metody syntezy oligonukleotydów jest związane z zastosowaniem syntezy oligonukleotydów na powierzchni płaskiej, takiej, jaka jest stosowana do otrzymywania tzw. chipów DNA. Do ich otrzymywania stosuje się najczęściej metodę wykorzystującą fotolabilne grupy ochronne funkcji 5'-hydroksylowej, a do zawiązania wiązania internukleotydowego metodę amidofosforynową.

Pomimo, że chipy DNA dostępne są handlowo i wykorzystywane coraz szerzej w praktyce, wiadomo, że skuteczność syntezy oligonukleotydów wchodzących w ich skład nie przekracza 95% na etap. Ważne jest zatem usprawnienie metody syntezy na podłożu stałym tak, aby możliwe było wydajniejsze otrzymywanie oligonukleotydów, a co za tym idzie żeby te oligonukleotydy były czystsze i bardziej jednorodne, gdyż po zakończeniu syntezy zakotwiczonego oligonukleotydu nie ma możliwości jego oczyszczenia w przypadku większości opracowanych metod syntezy. Podwyższenie wydajności syntezy powinno wpłynąć na poprawę jakości analiz wykonywanych za pomocą tych układów scalonych.

Drugi bardzo ważny aspekt opracowania nowych wariantów syntezy oligonukleotydów to ochrona patentowa metod wytwarzania scalonych bibliotek DNA

(chipów i mikromacierzy DNA). Opracowanie nowych oryginalnych metod syntezy oligonukleotydów, które mogłyby posłużyć do otrzymywania scalonych bibliotek DNA, a jednocześnie nie byłyby chronione w literaturze patentowej byłoby naturalnie bardzo korzystne. Przystąpiłam do badań, których celem było opracowanie nowego wariantu syntezy oligonukleotydów, mając na uwadze również możliwość opatentowania metody.

Podjęłam próby ulepszenia metody fosfortriestrowej. Opracowany nowy wariant metody fosfortriestrowej ma również wykorzystywać fotolabilne grupy ochronne.

Na obecnym etapie rozwoju metod fotolitograficznej syntezy scalonych bibliotek oligonukleotydowych wykorzystuje się przede wszystkim mieszane węglany do blokady grupy 5'-hydroksylowej, przy czym „fotolabilny alkohol” i funkcja 5'-OH nukleozydu (oligonukleotydu) wchodzi w skład tego węglanu. Jako alkohole stosuje się zdolne do przemian fotochemicznych pochodne o-nitrobenzylowe, o-nitrofenyloetylowe, benzoinowe i pyrenylowe.¹⁰⁻¹² Proponuje się również zastosowanie powyżej wymienionych typów alkoholi jako blokad terminalnej funkcji fosforanowej w czasie syntezy oligonukleotydu.^{10;13-15}

W mojej pracy podjęłam próby przygotowania amidofosforynów chronionych fotolabilną węglanową grupą blokującą, a także opracowania wariantu metody syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym, w którym dałoby się wykorzystać fotolabilne grupy ochronne terminalnej funkcji fosforanowej.

2. STOSOWANE SKRÓTY NAZW I SYMBOLE

Ac – acetyl

Ac₂O – bezwodnik kwasu octowego

AcOH – kwas octowy

aq – roztwór wodny

Ar – aryl

ArSO₂Cl – chlorek arylosulfonylu

bm – szeroki multiplet (ang. *broad multiplet*)

bs – szeroki singlet (ang. *broad singlet*)

BSA – kwas benzenosulfonowy

Bz – benzoil

BzCl – chlorek benzoilu

CDI – *N, N'*-karbonylodiimidazol

CE - cyjanoetyl

CH₂Cl₂ – chlorek metylenu

CH₃CN – acetonitryl

C₅H₅N (lub **Py**)- pirydyna

CH₃NO₂ – nitrometan

CF₃SO₃CH₃ – trifluorometanosulfonian metylu

CPG – szkło o kontrolowanej porowatości

d - dublet

dA – 2'-deoksyadenozyna

DBU – 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en

dC – 2'-deoksycytydyna

DCA – kwas dichlorooctowy

DCC – 1,3-dicykloheksylokarbodiimid

DMF – *N,N'*-dimetyloformamid

DMAP – 4-dimetyloaminopirydyna

DMSO – sulfotlenek dimetylu

DMT – 4,4'-dimetoksytrytyl

DMTCI – chlorek 4,4'-dimetoksytrytylu

dG – 2' deoksyguanozyna

Et – etyl

Et₂O – eter dietylowy

EtOH – etanol

Et₃N - trietyloamina

FAcOH – kwas fenoksyoctowy

Fmoc – 9-fluorenylometoksykarbonyl

¹H (**¹³C**, **¹⁹F**, **³¹P**) **NMR** – magnetyczny rezonans jądrowy (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*)

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *High Pressure Liquid Chromatography*)

iBu – izobutyryl

iPr – izopropyl

KOH – wodorotlenek potasu (I)

Lew – lewulinył

m – multiplet

Me – metyl

MeNPoc - α-metylo-6-nitropiperonyloksykarbonyl

MeNP - α-metylo-6-nitropiperonył

MeOH – metanol

Mg - magnez

MMT – 4-monometoksytrytyl

MS – spektrometria mas (ang. *Mass Spectrometry*)

MsCl – chlorek mezytylenosulfonyłu

NaOH – wodorotlenek sodu (I)

NPE – 2-(4-nitrofenylo)etyl

NPEoc – 2-(4-nitrofenylo)etoksykarbonyl

PMG - pentametyloguanidyna

ppm – część na milion (ang. *parts per million*)

Ps – polistyren

PvCl – chlorek piwaloilu

q - kwartet

s - singlet

SOCL – syntetyczna kombinatoryczna biblioteka oligonukleotydoma (ang. *Synthetic Oligonucleotide Combinatorial Library*)

T – tymidyna

t - tryplet

TEA – trietyloamina

THF – tetrahydrofuran

TMG - *N,N,N',N'*-tetrametyloguanidyna

TLC – chromatografia cienkowarstwowa (ang. *Thin Layer Chromatography*)

temp. top. – temperatura topnienia

TMS - trimetylosilil

TMSiCl – chlorek trimetylosililu

TPSCI – chlorek 2,4,6-triizopropylobenzenosulfonylu

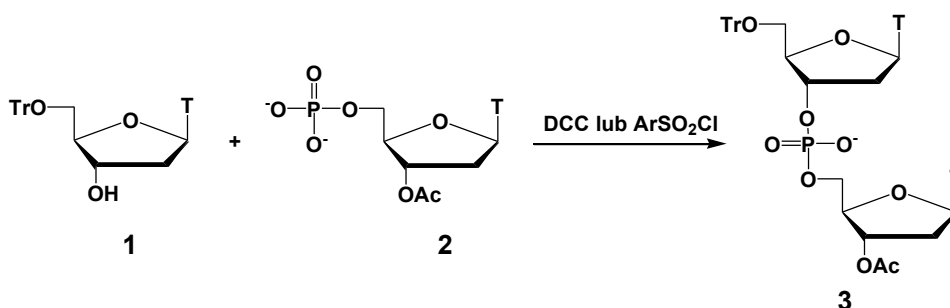
Tr – trytyl

Zn - cynk

δ - przesunięcie chemiczne

3. WSTĘP TEORETYCZNY

Kluczowym etapem syntezy fragmentów kwasów nukleinowych jest wytworzenie międzynukleotydocowych wiązań 3'-5'. Pierwsza, szeroko stosowana metoda otrzymywania oligonukleotydów, opracowana została pod koniec lat 50-tych i na początku 60-tych przez Khoranę i współ. i nosi nazwę metody diestrowej^{16,17} (schemat 1).



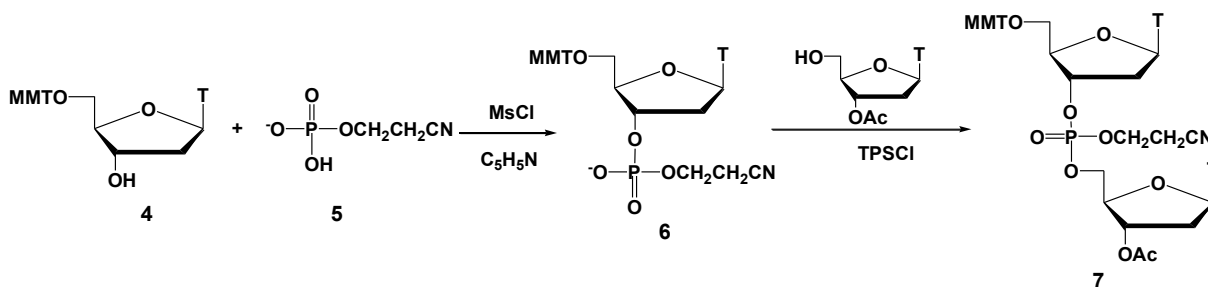
Schemat 1. Synteza monofosforanu dinukleozydu metodą diestrową

Podejście to oparte jest na reakcji kondensacji nukleozydu posiadającego wolną grupę 3'-hydroksylową oraz grupę 5'-hydroksylową chronioną kwasolabilną grupą trytylową **1** z 5'-fosforanem nukleozydu zawierającym zasadolabilne ugrupowanie acetylowe w pozycji 3'-OH **2**. Kondensacja następuje w obecności czynnika kondensującego: 1,3-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC), chlorku mezytylenosulfonylu (MsCl) lub chlorku 2,4,6-triizopropylbenzenosulfonylu (TPSCl), w wyniku czego powstaje monofosforan dinukleozydu **3**. Wydłużenie łańcucha nukleotydocowego osiągnięto poprzez usunięcie grupy acetylowej z pozycji 3' związku **3** i kolejną kondensację z odpowiednio blokowanym 5'-fosforanem nukleozydu.¹⁸

Główną wadą opisaną metody był jonowy charakter związku wyjściowego i powstawanie różnych ubocznych produktów kondensacji, które należało odseparować na drodze uciążliwej i czasochłonnej chromatografii jonowymiennej.

Wspomniane niedogodności metody diestrowej skłoniły chemików do ponownego zainteresowania się metodą fosfortriestrową wprowadzoną przez Michelsona i Todda.¹⁹ Letsinger i Ogilvie^{20,21} wykazali, że kondensacja 5'-O-blokowanego deoksyrybonukleozydu

4 z fosforanowym monoestrem **5** w obecności MsCl doprowadza do powstania odpowiedniego fosforodiestru nukleozydu **6** (schemat 2). Następnie, dodanie deoksyrybonukleozydu posiadającego wolną grupę 5'-hydroksylową oraz TPSCI powodują powstanie fosforanowego triestru dinukleozydu **7**, który z łatwością można oddzielić od



Schemat 2. Synteza triestru fosforanu dinukleozydu

jonowego związku wyjściowego przy zastosowaniu chromatografii kolumnowej w rozpuszczalnikach organicznych na silikażelu. Na przestrzeni lat metoda fosforotriestrowa była modyfikowana i ulepszana poprzez wprowadzanie różnych nowych czynników fosforylujących i kondensujących.^{22,23,24,25,26} Szczególnie efektywną modyfikacją warunków kondensacji okazał się dodatek nukleofilowych katalizatorów, takich jak N-metyloimidazol, czy 4-podstawione pochodne N-tlenku pirydyny w obecności odpowiedniego czynnika kondensującego. Modyfikacje te umożliwiły podwyższenie wydajności i zwiększenie szybkości tworzenia wiązania fosforotriestrowego.²⁷

3.1. Synteza oligonukleotydów z zastosowaniem metody fosforotriestrowej

Maksymalna długość syntezowanego oligonukleotydu zależy przede wszystkim od wydajności tworzenia wiązania internukleotydu. Innym ważnym czynnikiem są reakcje uboczne towarzyszące reakcjom kondensacji reagentów nukleotydujących i nukleozydujących. Reakcje uboczne mają przeważnie miejsce w obrębie reszt purynowych i pirymidynowych. Konsekwencją tego jest powstawanie zmodyfikowanych produktów. Kolejnym procesem obniżającym wydajność są reakcje uboczne towarzyszące usuwaniu grup ochronnych. Bardzo istotna jest także czystość substratów nukleozydujących (nukleotydujących). Z tego powodu poniżej omówione zostaną optymalne grupy ochronne, reagenty fosforylujące, jak również reagenty kondensujące, które pozwalają na uzyskanie wysokich wydajności w syntezie oligonukleotydów.

3.1.1. Grupy ochronne i metody fosforylacji

Grupy funkcyjne, z wyjątkiem tych, które biorą udział w reakcji, powinny być zabezpieczone grupami ochronnymi trwałymi podczas reakcji, a następnie odblokowane. Selektywne usunięcie grup ochronnych jest ważnym problemem w syntezie oligonukleotydów.

Synteza oligonukleotydów metodą fosfortriestrową wymaga rozwiązania dwóch głównych problemów:

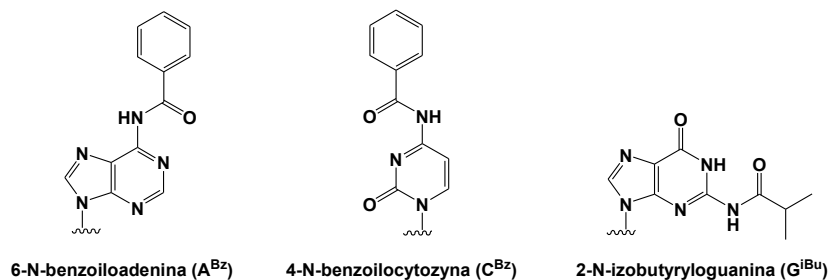
- Przygotowanie odpowiednio chronionych jednostek monomerycznych (nukleozydów lub nukleotydów)
- Łączenie monomerów przez zastosowanie odpowiedniej procedury fosforylacji (kondensacji)

Na ostatnim etapie syntezy grupy blokujące powinny być usunięte.

3.1.1.1. Grupy ochronne zasad heterocyklicznych

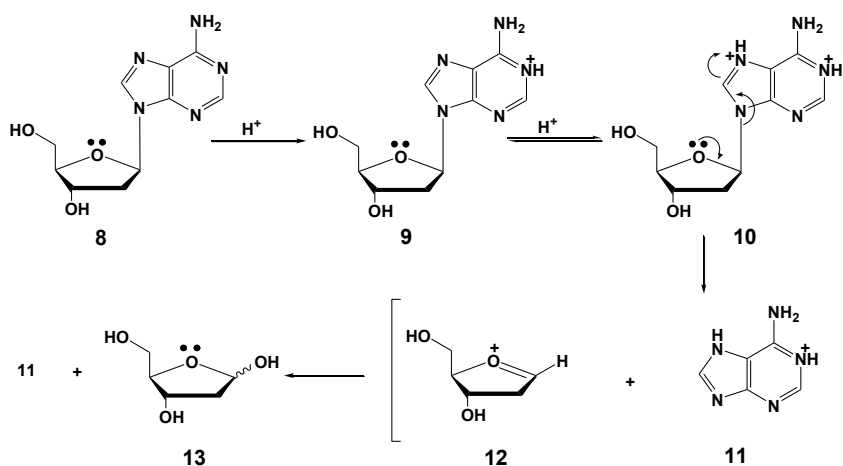
Zasady heterocykliczne w syntezie oligonukleotydów wymagają ochrony grup egzoaminowych, stanowiących potencjalne centra reaktywne w trakcie przyłączania kolejnych jednostek nukleozydowych lub nukleotydowych. Egzoaminowe grupy w resztach adeniny i guaniny są dość słabymi nukleofilami w porównaniu z grupami hydroksylowymi cukrów. W przypadku cytozyny, grupa egzoaminowa jest bardziej reaktywna niż grupy hydroksylowe w cząsteczce cukru.²⁸ Najczęściej stosowanymi grupami ochronnymi dla wyżej wymienionych zasad jest, grupa benzoilowa (lub p-metoksybenzoilowa) dla adeniny²⁹ i cytozyny³⁰ oraz grupa izobutyrylowa w przypadku guaniny (rysunek 1).³¹ Tymina nie wymaga najczęściej stosowania grup ochronnych.

Wprowadzenie grup ochronnych dla polarnych funkcji aminowych i hydroksylowych nukleozydów czy nukleotydów, zwiększa równocześnie ich lipofilowość i rozpuszczalność w rozpuszczalnikach organicznych. Blokady grup egzoaminowych są trwałe we wszystkich warunkach reakcji stosowanych w syntezie DNA. Usuwa się je po zakończeniu syntezy działając stężonym wodnym roztworem amoniaku w temp. ok. 50°C.



Rys. 1 Powszechnie stosowane w syntezie DNA blokady grup egzoaminowych zasad heterocyklicznych

W porównaniu do serii rybo, deoksyrybonukleozydy, deoksyrybonukleotydy i oligodeoksyrybonukleotydy purynowe są znacznie bardziej wrażliwe na umiarkowane kwasowe warunki, które przyczyniają się do rozerwania wiązania N-glikozydowego.³² Na przykład guanozyna jest 520 razy bardziej odporna na depurynację niż deoksyguanozyna w 100°C, natomiast deoksyadenozyna ulega depurynacji dwa razy szybciej niż deoksyguanozyna w 30°C.³² Dane te potwierdzili Tanaka i Letsinger.³³ Wykazali oni również, że 6-N-benzoylodeoksyadenozyna ma większą skłonność do depurynacji niż 2-N-izobutyrylodeoksyguanozyna. Mechanizm depurynacji (schemat 3) dla deoksyadenozyny (**8**) wymaga protonowania pozycji N-1 (**9**) albo N-7 (**10**).³⁴ Odejście protonowanej puryny **11** i równoczesne utworzenie jonu oksoniowego **12** decyduje o szybkości reakcji.^{32,35,36,37}

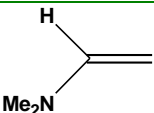
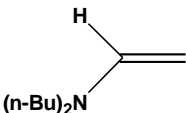
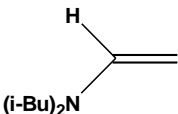
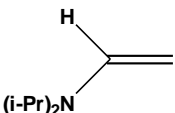
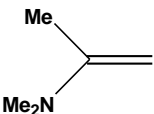
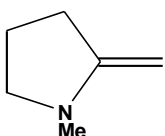


Schemat 3. Mechanizm depurynacji deoksyadenozyny

Poszukiwanie różnorodnych grup ochronnych dla egzoaminowych funkcji deoksyadenozyny, które po wprowadzeniu zmniejszyłyby depurynację w kwasowych

warunkach, doprowadziło do zastosowania amidynowych grup ochronnych (Tabela 1).^{38,39} Grupy te były wprowadzane chemoselektywnie na egzoaminowe funkcje nukleozydów purynowych i pirymidynowych. Na przykład w reakcji deoksyadenozyny z N,N-dimetyloacetamidem uzyskiwano z 70% wydajnością N-blokowaną deoksyadenozynę,⁴⁰ która była 20 razy bardziej odporna na depurynację niż 6-N-benzoilodeoksyadenozyna.

Tabela 1. Amidynowe grupy ochronne dla funkcji egzoaminowych

Grupa ochronna	Nukleozasada	Warunki odblokowania	Literatura
	Guanina (N-2) Adenina (N-6)	Stężony NH ₄ OH/ Δ	40-52
	Guanina (N-2) Adenina (N-6)	Stężony NH ₄ OH/Δ lub 0,5 M NH ₂ NH ₂ .H ₂ O/C ₅ H ₅ N/AcOH	39;40;50;53-55
	Adenina (N-6)	Stężony NH ₄ OH/10% NH ₄ OAc/ Δ 0,5 M NH ₂ NH ₂ .H ₂ O/C ₅ H ₅ N/AcOH	39
	Adenina (N-6)	Stężony NH ₄ OH/10% NH ₄ OAc/ Δ 0,5 M NH ₂ NH ₂ .H ₂ O/C ₅ H ₅ N/AcOH	39
	Guanina (N-2) Adenina (N-6)	Stężony NH ₄ OH/ Δ	40;48-51;53
	Cytozyna (N-4)	Stężony NH ₄ OH/ Δ	40;49;50

Dla funkcji aminowej N-6 deoksyadenozyny zaprojektowano również inne grupy ochronne, które hamowały depurynację w warunkach kwasowych. Kume i współ.^{56,57} wprowadzili cykliczne diacylowe grupy ochronne. Reakcja 3',5'-di-O-acetylodeoksyadenozyny z cyklicznym bezwodnikiem ftalowym (lub bursztynowym) prowadziła do powstania 6-N-ftaloilo (lub bursztynylo) 3',5'-di-O-acetylo deoksyadenozyny.⁵⁶ 3',5'-di-O-acetylodeoksyadenozyna blokowana grupą 6-N-ftaloilową była 4-6 razy bardziej stabilna niż blokowana grupą 6-N-benzoilową, natomiast 3',5'-di-O-acetylodeoksyadenozyna z grupą 6-N-bursztynyłową nawet 8 razy trwalsza od blokowanej grupą 6-N-benzoilową w 80% kwasie octowym w 70°C. Grupa ftaloilowa i bursztynyłowa były niestabilne w słabo zasadowych warunkach takich jak, pirydyna : woda (1:1) i były łatwo odblokowane z użyciem mieszaniny, stężony amoniak : pirydyna (3:2), w temperaturze pokojowej.⁵⁶

Podwyższenie wytrzymałości na depurynację osiągnięto również wówczas, kiedy do zablokowania aminowej grupy N-6 deoksyadenozyny zastosowano grupę o-nitrofenylosulfenylową (**Nps**). Deoksyadenozyna blokowana grupą o-nitrofenylosulfenylową pozostaje nienaruszona w 80% wodnym kwasie octowym w 30°C przez 24 godziny.⁵⁸ W tych samych warunkach deoksyadenozyna blokowana grupą benzoilową już po 30 minutach zostaje w połowie odblokowana, a blokowana grupą 6-N-ftaloilową po 120 minutach. Grupa Nps została również przebadana jako grupa ochronna egzoaminowych funkcji nukleozydów cytozyny i guaniny.

Pomimo, że trytylowe pochodne takie jak Tr, MMT i DMT służą głównie do ochrony funkcji 5'-OH nukleozydów, to grupy typu trytylowego znalazły również zastosowanie do ochrony egzoaminowych funkcji nukleozydów.^{59,60,61-65} Deoksyadenozyna blokowana grupą 4,4',4''-tri-(benzoiloksy)trytylową (**TBTr**) w 2% kwasie dichlorooctowym w chlorku metylenu jest czterokrotnie bardziej odporna na depurynację niż blokowana grupą 6-N-benzoilową. Inną zaletą tej grupy jest to, że 6-N-TBTr deoksyadenozyna jest łatwo przekształcana w metylo-N-morfolinofosforoamid – monomer używany do syntezy DNA na podłożu stałym.^{66,67} Grupa TBTr używana jest również do ochrony funkcji egzoaminowych dla deoksytydyny i deoksyadenozyny. Odblokowanie grupy TBTr odbywa się podczas działania na blokowany nukleozyd 2 M wodorotlenkiem sodu w ciągu 10 minut.

Wprowadzono również kilka acylowych grup ochronnych dla egzaminowych funkcji nukleozydów cytozyny, adeniny i guaniny. Informacje na ich temat zostały zebrane

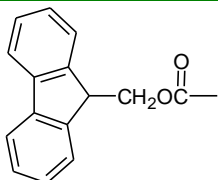
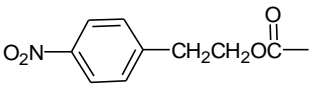
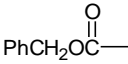
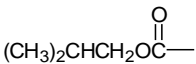
w tabeli 2. Grupy takie jak, α -fenylocynamoilowa⁶⁸ i naftaloilowa⁶⁹ były wprowadzane chemoselektywnie na egzoaminowe funkcje deoksytydyny, deoksyadenozyny i deoksyguanozyny.

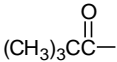
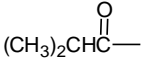
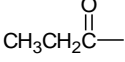

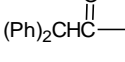
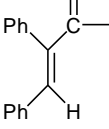
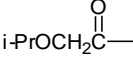
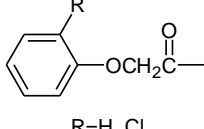
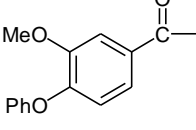
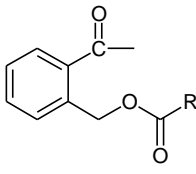
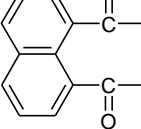
Deoksyadenozyna blokowana w pozycji N-6 jedną z tych grup, jak również grupą 3-metoksy-4-fenoksybenzoilową, była bardziej odporna na depurynację w kwasowych warunkach niż 6-N-benzoilowana deoksyadenozyna.

Grupa fenoksyacetylowa jest dogodną grupą ochronną dla guaniny, adeniny i cytozyny.^{70,71,72,73} Pod wpływem działania stężonego amoniaku w 20°C następowało połowiczne odblokowanie w ciągu 8 minut, 7 minut i 2 minut dla wyżej wymienionych zasad.^{72,73} W identycznych warunkach N-benzoilowane nukleozydy były odblokowane w ciągu 10 godzin, 11 godzin i 3 godzin, w tej samej kolejności.^{72,73} Użycie fenoksyacetylowanych nukleozasad powinno także ułatwić przygotowanie modyfikowanych nukleozydów wrażliwych na alkaliczne warunki. Szybkość depuracji 6-N-fenoksyacetylowanej deoksyadenozyny w 80% kwasie octowym była 20% niższa niż 6-N-benzoilowanej deoksyadenozyny w tych samych warunkach.⁷⁴

Grupa 2-(acetoksymetylo)benzoilowa^{70,71} również została zaproponowana jako alternatywna grupa ochronna dla funkcji aminowych nukleozydów. Ułatwiła ona syntezę zasadolabilnych modyfikowanych oligonukleotydów.

Tabela 2. Grupy ochronne dla funkcji egzoaminowych nukleozasad

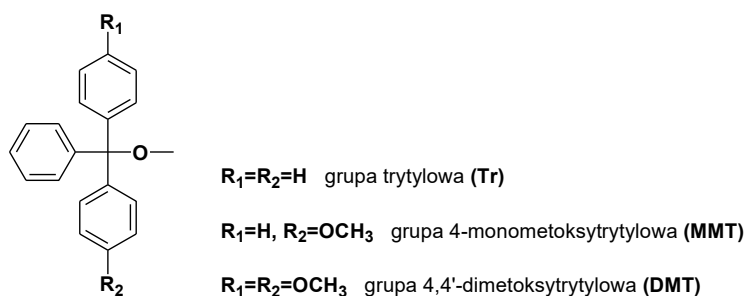
Grupa ochronna	Nukleozasada	Warunki odblokowania	Literatura
	Guanina (N-2) Adenina (N-6) Cytosyna (N-4)	Stężony NH ₄ OH- C ₅ H ₅ N (1:1) lub Et ₃ N- C ₅ H ₅ N (1:5) lub 1 M DBU/MeCN	58;75-80
	Guanina (N-2) Adenina (N-6) Cytosyna (N-4)	DBU lub DBU/ C ₅ H ₅ N	13;81-90
	Guanina (N-2) Adenina (N-6) Cytosyna (N-4)	10% Pd/C/H ₂	91;92
	Cytosyna (N-4)	Stężony NH ₄ OH- C ₅ H ₅ N (3:1)	90;93

	Cytozyna (N-4)	0,2 M NaOH-MeOH (1:1)	94;95
	Guanina (N-2) Cytozyna (N-4)	Stężony NH ₄ OH, Δ	47;52;71;74;94;96-99
	Guanina (N-2)	Stężony NH ₄ OH- C ₅ H ₅ N (2:1)	61;100-109
	Cytozyna (N-4)	NH ₃ -EtOH (1:1)	70;71;94;110-112
	Guanina (N-2)	Stężony NH ₄ OH, Δ	106;107;113;114
	Guanina (N-2) Adenina (N-6) Cytozyna (N-4)	Stężony NH ₄ OH, Δ	68
	Guanina (N-2) Adenina (N-6) Cytozyna (N-4)	Stężony NH ₄ OH	115
	Guanina (N-2) Adenina (N-6)	Stężony NH ₄ OH	46;70;71;74;96-98;110;111;116
R=H, Cl			
	Guanina (N-2) Adenina (N-6) Cytozyna (N-4)	Stężony NH ₄ OH, Δ	97;117;118
	Guanina (N-2) Adenina (N-6) Cytozyna (N-4)	0,05 M K ₂ CO ₃ /MeOH lub stężony NH ₄ OH, R.T.	119
	Guanina (N-2) Adenina (N-6) Cytozyna (N-4)	Stężony NH ₄ OH, Δ	69

3.1.1.2. Grupy ochronne funkcji hydroksylowych cukru

Kluczowym etapem syntezy oligonukleotydów metodą fosfortriestrową jest tworzenie wiązania internukleotydowego. Monomery deoksyrybonukleotydowe zawierają dwie grupy hydroksylowe (3'-OH lub 5'-OH), które powinny być zablokowane podczas reakcji fosforylacji i kondensacji jednostek deoksyrybonukleotydowych. Selektowność usuwania blokad z grup hydroksylowych jest ważnym elementem syntezy oligonukleotydów. Grupy ochronne funkcji hydroksylowych deoksyrybonukleozydów mogą posiadać charakter tymczasowy lub stały, w zależności od strategii syntezy.

Powszechnie stosowane są grupy trytylowe z wyróżnieniem grupy dimetoksytrytylowej jako blokady grupy 5'-OH, (rysunek 2).¹²⁰⁻¹²²



Rys. 2 Grupy trytylowe

Khorana i współ. wprowadzili grupę p-metoksyłową do fenyłowego pierścienia co ułatwia usunięcie pochodnych trytylowych za pomocą kwasu. W przypadku zautomatyzowanej syntezy oligodeoksyrybonukleotydów na podłożu stałym, usunięcie grupy 5'-O-DMT umożliwia ocenę efektywności elongacji łańcucha.⁴⁶ Po potraktowaniu 5'-O-DMT-pochodnej nukleozydu (lub rosnącego łańcucha oligonukleotydu) 3% roztworem kwasu dichlorooctowego w chlorku etylenu powstaje kation dimetoksytrytylowy, odznaczający się silną absorpcją przy ok. 504 nm, co wykorzystuje się do ilościowego oznaczania wydajności poszczególnych etapów. Spektrofotometrycznie mierzona absorpcja roztworu w którym znajduje się kation dimetoksytrytylowy jest podstawowym parametrem określającym przebieg syntezy oligonukleotydów.¹²³

Nowe trytylowe pochodne do syntezy oligonukleotydów zaproponowali Sekine i Hata.¹²⁴ Odkryli, że chlorek 4,4',4''-tri-(benzoiloksy)trytylu (**TBTr-Cl**) i bromek 4,4',4''-tri-(benzoiloksy)trytylu (**TBTr-Br**) otrzymane z metyloauryny, selektywnie reagują z funkcją

5'-hydroksylową N-blokowanych deoksyrybonukleozydów. Grupy te były bardziej stabilne w kwaśnych warunkach niż grupa trytylowa. Jednak warunki odtrytylowania grupy TBTr były niekompatybilne z zasadolabilnymi grupami ochronnymi nukleozasad. W celu uniknięcia tego problemu Sekine i Hata^{125;126} wprowadzili grupę 4,4',4''-tri-(4,5-dichloroftalomido)trytylową (**CPTTr**). Grupa ta była stosunkowo stabilna w warunkach kwasowych, wskutek silnego efektu indukcyjnego reszt ftaloilowych. W przeciwieństwie do silnie alkalicznych warunków, wymaganych do odblokowania grupy TBTr, grupa CPTTr była przekształcana do przejściowego eteru 4,4',4''-triaminotrytylowego w ciągu 20 minut przez hydrazynolizę.^{112;125-127} Łagodniejsze warunki odblokowania, pozwoliły na użycie 5'-O-CPTTr nukleozydów z zasadolabilnymi grupami ochronnymi, do syntezy oligonukleotydów.

Do blokowania funkcji 5'-hydroksylowej N-acylowanych nukleozydów używano również grupy 9-(fenyloksanteno-9-yłowej), inaczej piksyłowej (**Px**)^{108;109;128-134} i grupy 9-(p-metoksyfenylo)ksanteno-9-yłowej (**Max**).^{108;109;131-134} Stabilność grupy piksyłowej i 4,4'-dimetoksytrytyłowej była porównywalna w warunkach kwasowych.

Pomimo, że grupy trytyłowe są często stosowane do blokowania funkcji 5'-OH nukleozydów, to jednak poszukiwano nowych selektywnych grup blokujących, które byłyby usuwane w warunkach zbliżonych do obojętnych. Taką grupę opracował Seliger.^{135;136} Grupa p-fenyloazofenyloksykarbonyłowa (**PAPoc**) wprowadzona została w reakcji deoksyrybonukleozydów z chlorkiem p-fenyloazofenyloksykarbonyłowym. 5'-O-PAPoc nukleozydy otrzymywano z 70% wydajnością. Odblokowanie grupy PAPoc odbywało się w mieszaninie, β-cyanoetanol – trietyloamina – woda (1:1:1), a następnie działaniem 0,01 M DBU w pirydynie w ciągu 1 minuty.¹³⁶

Zasadolabilne grupy są również używane do blokowania funkcji 5'-hydroksylowej, kiedy inne grupy funkcyjne są zablokowane grupami kwasolabilnymi. Zasadolabilna grupa 9-fluorenyłometoksykarbonyłowa (**Fmoc**) była wprowadzana również selektywnie na funkcję 5'-OH.⁶¹ W przypadku tej grupy następowała niewielka depurynacja 6-N-acylowanej deoksyadenozyny podczas jej usuwania.^{55;79;137-140} Odblokowanie grupy Fmoc odbywało się w zasadowych warunkach (10% piperydyna w acetonitrylu). Użycie takich warunków neutralizowało reaktywny benzofulwen, który tworzy się podczas odblokowania.

Pfleiderer^{87;126} opisał selektywne wprowadzanie labilnych grup, takich jak: 2-(4-nitrofenylo)etoksykarbonyłowa (**NPEoc**), 2-(2,4-dinitrofenylo)etoksykarbonyłowa (**DNPEoc**) i 2-cyanoetoksykarbonyłowa (**CEoc**) w pozycję 5'-OH deoksyrybonukleozydów z wydajnością 70-80%. Odblokowanie grupy NPEoc następowało pod wpływem działania

0,5 M roztworem DBU w bezwodnej pirydynie, natomiast odblokowanie DNPEoc odbywało się w środowisku trietyloaminy w reakcjach β -eliminacji. Warunki odblokowania pozwoliły selektywnie usunąć grupę DNPEoc w obecności grup ochronnych funkcji fosforanowej: grupy p-nitrofenyloetylowej (NPE) lub grupy p-nitrofenyloetoksykarbonylowej (NPEoc).⁸⁸

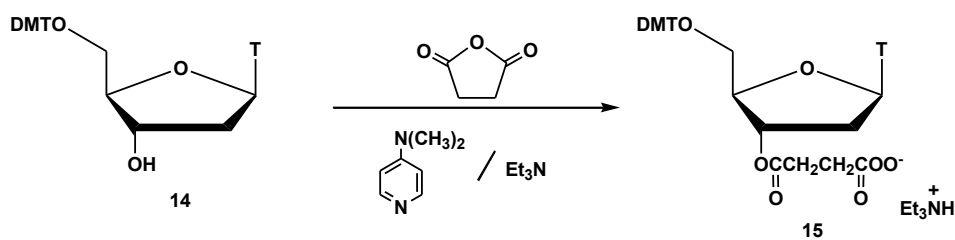
Inne grupy ochronne regioselektywnie reagujące z funkcją 5'-hydroksylową nukleozydów to: grupa 4-(metylotiometyloksy)butyrylowa (**MTMB**), grupa 2-(metylotiometyloksymetylo)benzoilowa (**MTMT**) i grupa 2-(izopropylotiometyloksymetylo)benzoilowa (**PTMT**).¹⁴¹⁻¹⁴⁴

Do blokowania używana jest również grupa trimetyloacetylowa (piwaloilowa), która jest bardziej stabilna niż grupa acetylowa. Grupa piwaloilowa jest używana do badań modelowych, gdyż w syntezie oligonukleotydów do jej odblokowania używa się silnie zasadowych warunków.²⁰ Grupy metoksy- i fenoksyacetylowe są używane, kiedy wymagane są grupy bardziej labilne. Grupa trytyloksyacetylowa (**trac**) acetylowała selektywnie pozycję 5'-nukleozydu i była używana w syntezie oligorubonukleotydów.¹⁴⁵ Szybkość alkalicznej hydrolizy grupy 5'-O-trac była większa niż innych grup występujących w nukleozydzie.

Kwasolabilna grupa tetrahydropyranylowa była wprowadzona już w 1960 przez Khoranę i współ. do syntezy dinukleozydofosforanów.¹²⁰ Grupę tetrahydro-4-metoksy-pyranylową stosuje się w celu uniknięcia tworzenia się mieszaniny diastereoizomerów. Grupa ta była użyta w połączeniu z alkilolabilną ochroną 5'-OH w syntezie oligorybonukleotydów metodą fosfortriestrową.¹⁴⁶ Stabilność wiązania internukleotydu podczas usuwania grupy ochronnej została sprawdzona za pomocą HPLC gdzie nie wykryto migracji wiązania internukleotydu.

Kiedy grupa 5'-hydroksylowa jest zablokowana grupą kwasolabilną taką jak mono- czy dimetoksytrytylowa, grupa 3'-OH deoksynukleozydów powinna być zablokowana grupą zasadolabilną.^{28;31} Grupa benzoilowa jest często używana jako końcowa grupa ochronna polinukleotydu w metodzie fosfortriestrowej.^{147;148}

Grupa 3'-O-bursztynianowa nukleozydu jest powszechnie używana jako grupa blokująca oraz jako łącznik pomiędzy nukleozydami i funkcjami aminowymi polimerów w przypadku syntezy na podłożu stałym. Typową reakcję otrzymywania 3'-O-bursztynylotymidyny (**15**) przedstawia schemat 4.¹⁴⁹



Schemat 4. Otrzymywanie 3'-O-bursztynilotymidyny

3.1.1.3. Grupy ochronne wiązania internukleotydowego

Wybór grup ochronnych wiązania internukleotydowego jest zasadniczym problemem syntezy oligonukleotydów metodą fosforotriestrową. Grupy ochronne powinny spełniać następujące kryteria:

- powinny być łatwo wprowadzane;
- stabilne w warunkach reakcji;
- łatwo usuwane na końcu syntezy w warunkach, w których produkt syntezy jest stabilny;
- reagent wprowadzający powinien być dostępny i stabilny;
- grupy powinny być achiralne;
- grupy projektowane powinny być w taki sposób, by widma NMR produktu było jak najprostsze.

Grupa benzylova była pierwszą grupą ochronną w syntezie fosforotriestrowej. Została po raz pierwszy użyta przez Michelsona i Todda⁴ w 1955 roku, w syntezie oligonukleotydów metodą fosforodiestrową, natomiast opisał ją i zastosował jako pierwszy Khorana z współ.¹⁴⁹ Grupa benzylova odblokowana jest na końcu syntezy w bardzo łagodnych warunkach,¹⁹ przez działanie jonem tiofenolanowym w temperaturze pokojowej. W przypadku syntezy długich oligomerów w pirydynie lub innej zasadzie może nastąpić częściowe debenzylowanie.¹⁵⁰

Letsinger i Mahadevan²¹ użyli grupy 2-cyjanoetylowej do ochrony wiązania internukleotydowego. Grupa ta jest odblokowana w reakcji β -eliminacji. Wadą grupy 2-cyjanoetylowej jest to, że może ona ulegać częściowemu odblokowaniu podczas przerobu mieszaniny poreakcyjnej i chromatografii na żelu krzemionkowym.²¹

Krótko później Eckstein i Rizk¹⁵¹ zaproponowali użycie grupy 2,2,2-trichloroetylowej, do ochrony wiązania internukleotydogo. Zaletą tej grupy jest fakt, że pozostaje ona nienaruszona podczas wzrostu łańcucha, jak również podczas oczyszczania. Grupa 2,2,2-trichloroetylowa jest usuwana przez β -eliminację, np. przez działanie pyłem cynkowym w wodnym kwasie octowym.

Kolejną grupą ochronną, która była szeroko stosowana w metodzie fosfortriestrowej jest grupa fenylowa. Została wprowadzona przez Reese'a i współ.¹⁵² Grupa fenylowa jest stabilna podczas wzrostu łańcucha oligonukleotydogo, jak również podczas jego oczyszczania.

Wadą tej grupy jest wymagana obecność jonów hydroksylowych podczas odblokowania lub atak innego nukleofila. W następstwie tego możliwe jest rozerwanie wiązania tlen-fosfor. Dla krótkich cząsteczek są to ilości nieznaczne, jednak dla długich cząsteczek te niepożądane produkty występują w znacznych ilościach. Starano się zapobiegać rozerwaniu wiązania internukleotydogo modyfikując grupę fenylową. Bardzo często używane są grupy o-chlorofenylove i p-chlorofenylove.^{153;154}

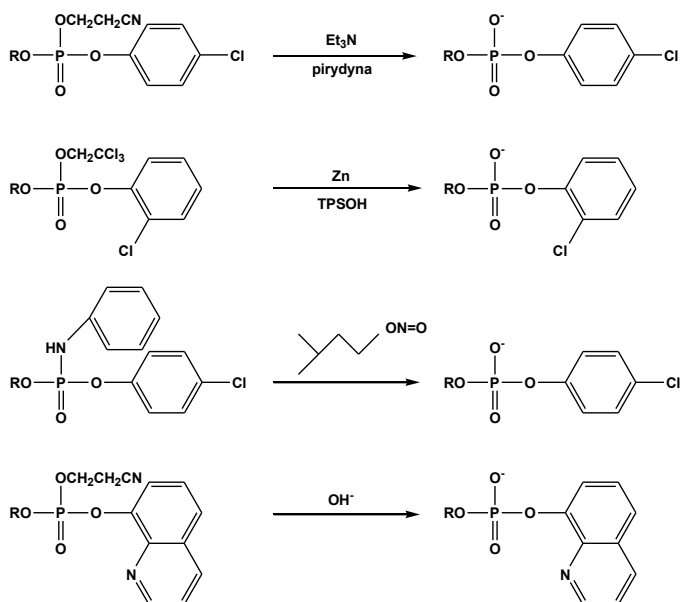
Trwałą grupą blokującą jest również grupa p-nitrofenyloetylowa (**NPE**),¹⁵⁵ która jest zdejmowana w aprotycznym rozpuszczalniku w reakcji β -eliminacji. Użycie β -eliminacyjnych grup ochronnych na funkcji fosforanowej uważa się za istotne w syntezie otrzymywania oligonukleotydów. Związane jest to z odblokowaniem fosfortriestru do fosfordiestru bez nukleofilowego ataku na atom fosforu, co mogłoby spowodować rozerwanie wiązania internukleotydogo. Do takich grup ochronnych należą: grupa β -cyjanoetylowa (**CE**), metylowe pochodne grupy β -cyjanoetylowej, grupy β -(alkilosylfonylo)- i β -(arylosulfonylo)etylowe. Grupy te są stosunkowo czułe na warunki zasadowe i ich odblokowanie następuje już pod wpływem działania amoniaku.¹⁵⁶

Zalety grup fenyloetylowych to: łatwa separacja produktów ubocznych, reagenty fosforylujące są bardzo stabilne, oraz homogenna mieszanina reakcyjna co pozwala na śledzenie postępu reakcji. Te zalety mogą być rozszerzone przez zastosowanie strategii ujednoliczonych grup blokujących takich jak, grupa 2-(4-nitrofenylo)etoksykarbonylowa (**NPEoc**), dla ochrony zasad (pirymidyny lub puryny) i grupa 2-(2,4-dinitrofenylo)etoksykarbonylowa (**DNPEoc**) i grupa 2-(4-nitrofenylo)etylosulfonylowa (**NPES**) dla ochrony funkcji hydroksylowej (3' lub 5') cukru. Aby rozszerzyć spektrum β -eliminacyjnych grup ochronnych dla chemii oligonukleotydów, przebadano również zastosowanie reszt heteroarylowych zawierających atom azotu, jako aktywatorów w reakcji

β -eliminacji. Ponieważ pierścieniowy atom azotu w hybrydyzacji sp^2 wykazuje podobną siłę aktywacyjną jak grupa NO_2 , to reszty pirydynylowe, pirymidynowe, pirazynylowe zostały wybrane jako nowe pochodne.¹⁵⁷

W syntezie fosfortriestrowej fosforan nukleozydu powinien być zablokowany podczas syntezy, natomiast końcowe fosforany powinny posiadać labilne grupy blokujące. Grupy te powinny być usuwane w warunkach innych niż alkaliczne. Fosforan dinitrobenzylu jest stabilny w pirydynie i może być stosowany jako tymczasowa blokada, która będzie usuwana w reakcji dealkilogowania za pomocą *p*-tiolotoluenu.^{155;158;159}

Przykłady selektywnego usuwania tymczasowych grup ochronnych z całkowicie zablokowanego fosforanu pokazano na schemacie 5.

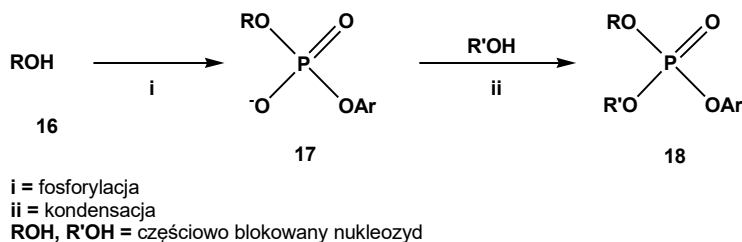


Schemat 5. Selektowne odblokowanie grup ochronnych z końcowego fosforanu

3.1.1.4. Reagenty fosforylujące

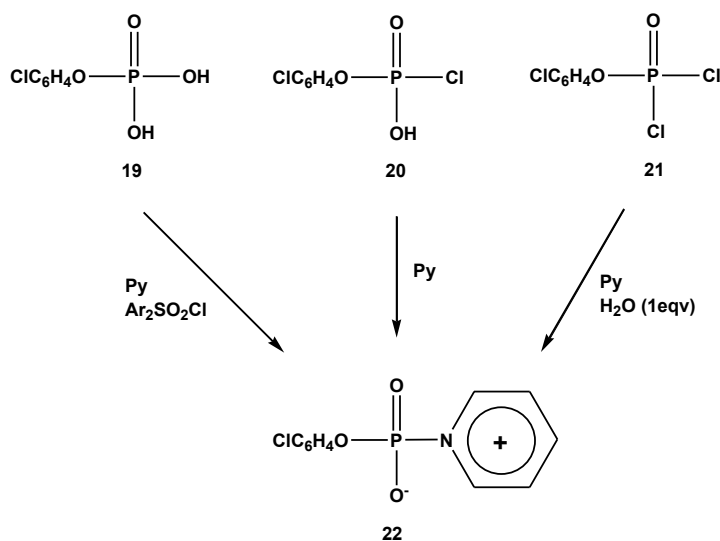
Synteza oligonukleotydów metodą fosfortriestrową przebiega w dwóch oddzielnych etapach.¹⁶⁰ W pierwszym etapie odpowiednio blokowany nukleozyd **16** z wolną grupą hydroksylową (zazwyczaj 3'-OH) przekształcany jest w oczekiwany aryłowy fosforan **17** (lub aktywną jego formę), w reakcji fosforylacji (i). W drugim etapie, w reakcji kondensacji (ii) tworzy się wiązanie fosfortriestrowe (schemat 6) **18**.

Chattopadhyaya i Reese zastosowali do reakcji fosforylacji fenylowy dichlorofosforan.¹⁵² Jednak w przypadku jego użycia nie można było uniknąć tworzenia symetrycznego produktu ubocznego. W celu uniknięcia tego problemu użyli oni fenylu 4-nitrofenylo chlorofosforanu¹⁶¹ lub 2-chlorofenylo 4-nitrofenylo chlorofosforanu.¹⁶² Z kolei van Boom i współ. zaproponowali użycie do reakcji fosforylacji 4-chlorofenylo 2,2,2-trichloroetylo chlorofosforanu.¹⁶³



Schemat 6. Ogólny przebieg syntezy fosfortriestrowej

Effimov i współ.¹⁶⁴ uzyskali dobry reagent fosforylujący, przygotowany bezpośrednio przed reakcją. Aby otrzymać p-chlorofenylo pirydynylo fosforan, dla którego zaproponowano strukturę **22**, wykorzystali oni pochodne p-chlorofenylo fosforanów (**19**, **20**, **21**) (schemat 7). Związek **22** powstawał w reakcji z ekwimolarną ilością wody dodanej do p-chlorofenylo dichlorofosforanu **21**. Aktywny związek fosforylujący **22** powstaje również w reakcji p-chlorofenylo fosforanu **19** z chlorkiem arylosulfonowym w pirydynie lub przez działanie pirydyny na p-chlorofenylo chlorofosforan **20**.



Schemat 7. Otrzymywanie p-chlorofenylo pirydynylo fosforanu

Badania reagentów fosforylujących wykazały, że monofunkcyjne reagenty fosforylujące są dobrymi reagentami w syntezie oligodeoksynukleotydów metodą fosfortriestrową jeżeli spełniają następujące kryteria:

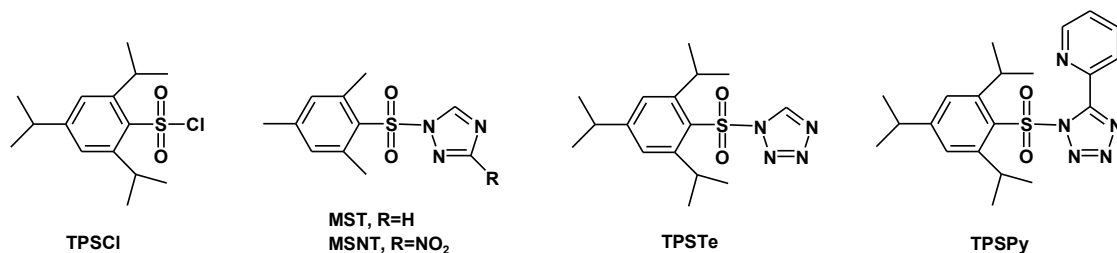
- są dostatecznie reaktywne, aby przereagować z grupą 3'-hydroksylowa nukleozydów;
- jeżeli grupą ochronną wiązania internukleotydu będzie grupa arylova, to powinno być możliwe przekształcenie związku **18** (schemat 6) do fenilo nukleozydo-3'-ylo fosforanu **17** (schemat 6), w warunkach na tyle łagodnych, aby podczas odblokowania nie zostały naruszone inne ochronne grupy kwaso- i zasadolabilne oraz nie utworzyły się inne produkty uboczne;
- powinna być możliwa izolacja produktu pośredniego **17** (schemat 6) jako czystej soli, wolnej od czynnika fosforylującego i innych produktów ubocznych.

3.1.1.5. Reagenty kondensujące i katalizatory nukleofilowe

Tworzenie wiązania internukleotydu wymaga aktywacji grupy hydroksylowej nukleozydu czy funkcji fosforanowej sąsiedniej cząsteczki.¹⁶⁵⁻¹⁶⁸

Skutecznymi czynnikami kondensującymi są chlorki arylosulfonylowe, które mogą aktywować fosfomonoestry z utworzeniem mieszanych bezwodników. Fosfodiestry są także aktywowane, lecz znacznie wolniej niż fosfomonoestry. Dobrymi reagentami w metodzie fosfortriestrowej w tworzeniu wiązania fosfortriestrowego były również azolidowe pochodne arylosulfonylowe.

1-Tolueno-p-sulfonyloimidazol i ich pochodne były dobrymi reagentami aktywującymi dla fosfordiestrów.¹⁶⁹ Jednak reakcje z tymi aktywatorami zachodziły dość wolno, szczególnie z pochodnymi 2,4,6-triizopropylbenzenosulfonowymi (TPS). Później zastosowano azolidy arylosulfonylowe, w których zwiększono ilość atomów azotu w pierścieniu azolidowym.¹⁶⁰ 2,4,6-triizopropylbenzenosulfonylotetrazolid (TPSTe)¹⁷⁰ i 1-(mezytylenosulfonylo)-3-nitro-1,2,4-triazol (MSNT)¹⁷¹ są powszechnie stosowanymi aktywatorami fosfordiestrów. Mieszaniny reakcyjne po kondensacji z użyciem arylosulfoazolidów były zdecydowanie czystsze niż w przypadku użycia TPS. Kilka przykładowych reagentów kondensujących przedstawiono na rysunku 3.

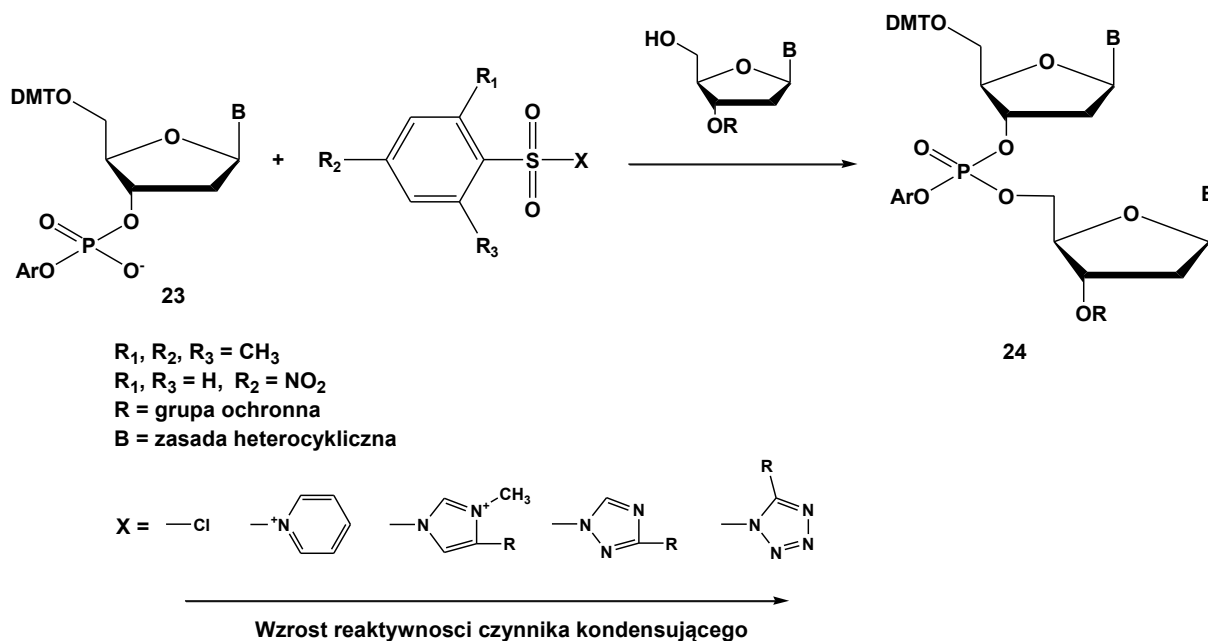


Rys. 3 Reagenty kondensujące

Podczas aktywacji fosfordiestrów azolidami arylosulfonowymi postuluje się tworzenie w pierwszej kolejności mieszanych bezwodników fosfordiestrów i kwasu arylosulfonylowego. Użycie trzykrotnego nadmiaru tetrazolu powinno pomagać w aktywowaniu fosfordiestru przez utworzenie pośredniego tetrazolidu. TPSTe jest reagentem kondensującym działającym znacznie szybciej niż TPSCl. W przypadku użycia przestrzennie rozbudowanych czynników kondensujących, reakcje kondensacji przebiegają stereoselektywnie. Powstaje wówczas tylko jeden diastereoizomer. Na przykład w reakcji N,3'-O-blokowanego nukleozydu z pochodnymi TPSTe lub 1-(mezylenosulfonylo)-5-(pirydyny-2-yl)-tetrazolu (MSPy) uzyskuje się jeden z diastereoizomerów fosfortriestru, 3'-O-(o-chlorofenylo)fosforan N-5'-O-blokowanego deoksynukleozydu.^{172;173}

Podsumowując wiadomości o czynnikach kondensujących można stwierdzić, że pochodne arylosulfonylowe są najefektywniejszymi aktywatorami fosfordiestrów w syntezie wiązania fosfortriestrowego. Reakcje kondensacji zachodzą wobec zasad, a najefektywniej wobec zasad, które są jednocześnie nukleofilami np. wobec pirydyny. Wydajność reakcji kondensacji mocno zależy od podstawnika X (schemat 8) w pochodnej arylosulfonylowej. Przejście od chlorku do azolidu powoduje wzrost szybkości reakcji kondensacji, jak również wzrost jej czystości (schemat 8).

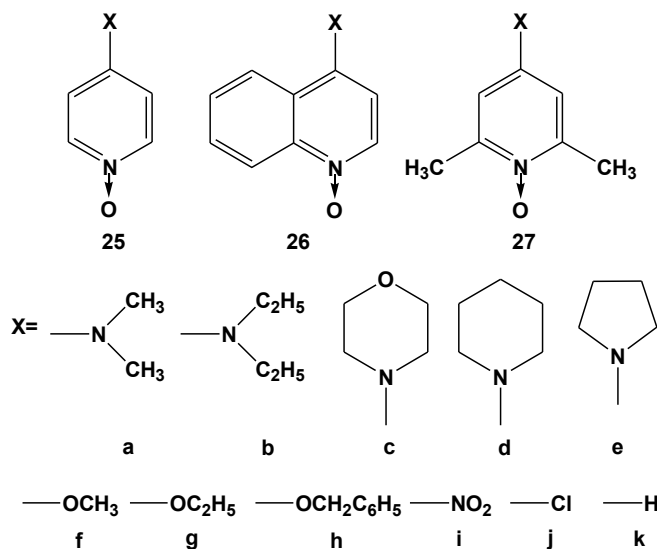
W metodzie fosfortriestrowej użycie chlorków lub nitrotriazolidów arylosulfonylowych w obecności katalizatora nukleofilowego (np. N-metyloimidazolu) efektywnie przyspiesza tworzenie wiązania internukleotydogo.^{164;174} Zastosowanie N-metyloimidazolu w metodzie fosfortriestrowej przyspiesza syntezę prowadzoną w roztworze, jak również prowadzoną na podłożu stałym. Użycie katalizatorów nukleofilowych umożliwia tworzenie wiązania internukleotydogo nie tylko w pirydynie, ale także w różnych rozpuszczalnikach organicznych.



Schemat 8. Reakcja kondensacji

Udowodniono również, że w metodzie fosfortriestrowej wzrost szybkości tworzenia się wiązania internukleotydowego, można również osiągnąć używając katalizatorów nukleofilowych takich jak, 4-podstawione pochodne N-tlenku pirydyny, w obecności czynników kondensujących. Otrzymano różne pochodne N-tlenków pirydyny (**25-27**, rysunek 4) i zbadano ich skuteczność w syntezie oligonukleotydów.¹⁷⁴

Szybkość reakcji kondensacji zależy od położenia podstawnika w pierścieniu pirydynowym. N-tlenki pirydyny podstawione grupą elektrono-akceptorową, taką jak NO_2 lub Cl , nie mają wpływu na reakcję kondensacji. Niepodstawione N-tlenki pirydyny lub chinoliny przyspieszają tworzenie się wiązania internukleotydowego tylko w niewielkim stopniu. W odróżnieniu od tych katalizatorów, wysoką skuteczność w tworzeniu wiązania internukleotydowego uzyskuje się po zastosowaniu podstawionych grupami elektrodonorowymi 4-pochodnych N-tlenków pirydyny i chinoliny. Przykłady takich grup pokazano na rysunku 4 (grupy a-h). Szybkość reakcji nie zależy w istotnym stopniu od struktury podstawnika. Reakcja kondensacji prowadzona z różnymi pochodnymi 4-dimetyloamino i 4-alkoksy była tylko trochę bardziej wydajna niż z innymi 4-podstawionymi N-tlenkami pirydyny.

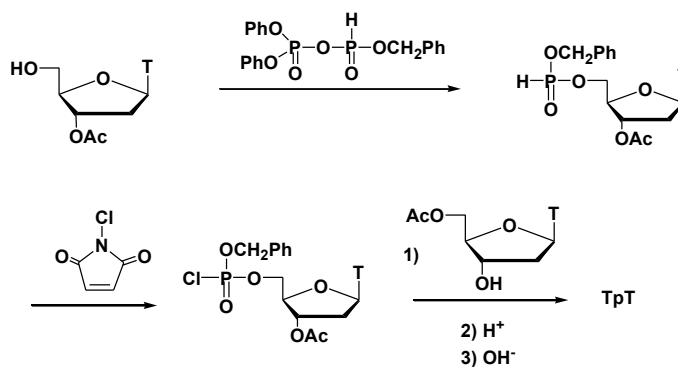


Rys. 4 Katalizatory nukleofilowe

3.1.2. Synteza oligonukleotydów metodą fosfortriestrową

3.1.2.1. Synteza oligonukleotydów w roztworze

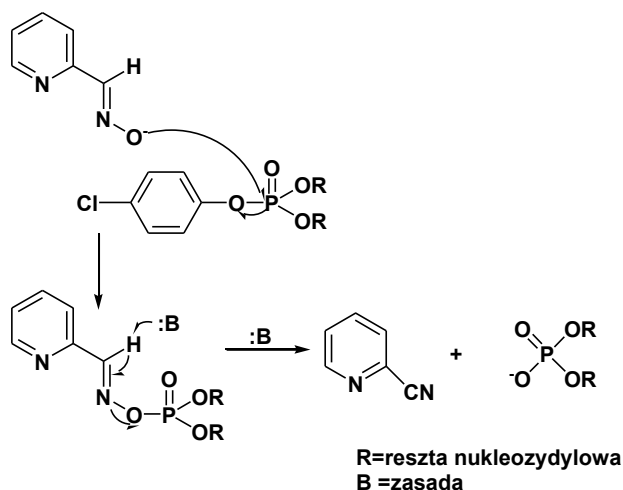
Pierwsza chemiczna synteza 3'→5' połączonych monofosforanów dinukleozydów została zaproponowana przez Michelsona i Todda (schemat 9).¹⁹



Schemat 9. Tworzenie wiązania internukleotydu

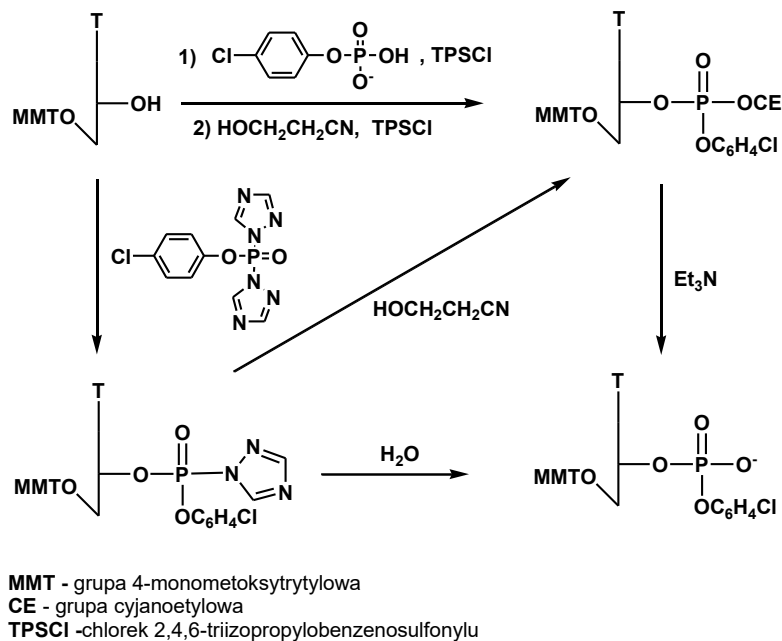
W zaproponowanej syntezie ester benzylowy był niestabilny w pirydynie, dlatego metoda fosfortriestrowa nie została wprowadzona aż do czasu, kiedy Letsinger i Ogilvie użyli grupy 2-cyjanoetylowej jako ochrony dla wiązania internukleotydu.²⁰ Jednak

właściwości tej grupy nie były do końca satysfakcjonujące w przypadku syntez wieloetapowych. Reese i współ. zaobserwowali, że pochodne fenylove są stabilne w syntezie metodą fosfortriestrową. Stwierdzili również, że grupa p-chlorofenylova posiada odpowiednią trwałość jako grupa blokująca.¹⁷⁵ O-chlorofenylo fosforan okazał się być nieco bardziej labilny, dzięki czemu na końcowym etapie syntezy można było go całkowicie odblokować.¹⁷⁶ Reese i współ. badali również selektywne usuwanie pochodnych fenylowych z wiązania internukleotydoowego i wykazali, że w reakcji prowadzonej za pomocą oksymu osiągnęli znacznie wyższą wydajność. Zastosowanie oksymów do odblokowania fosforotriestrowo pozwoliło całkowicie wyeliminować niewłaściwy rozpad wiązania internukleotydoowego.¹⁶² Reakcję odblokowania estru aryloowego z wiązania fosforowego nukleozydu przedstawiono na schemacie 10.



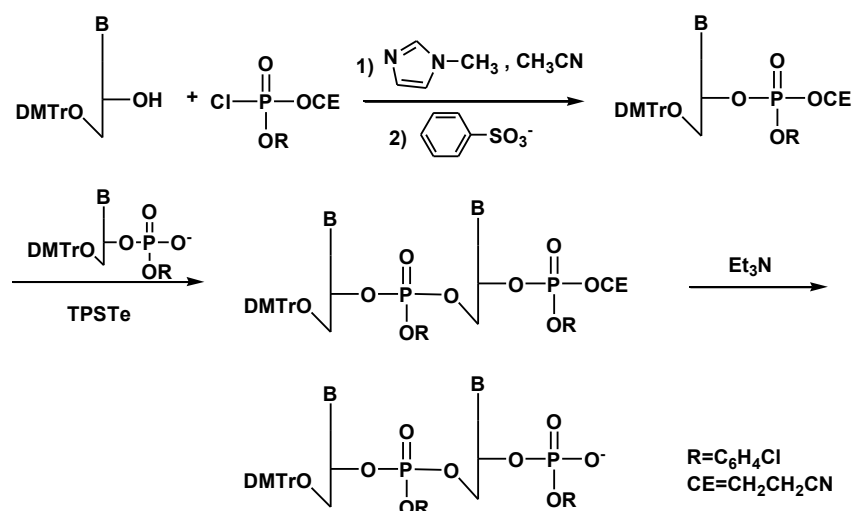
Schemat 10. Usuwanie blokad arylowych za pomocą jonu oksymowego

Narang i współ.¹⁷⁷ zsyntezowali oligonukleotydy używając całkowicie zablokowanych fosfortriestrowo (schemat 11). Podejście to umożliwiło szybką syntezę długich oligonukleotydów, zawierających 20-30 jednostek nukleotydoowych. Kondensacje były szybkie i wydajne, a produkty kondensacji izolowano metodami chromatograficznymi (chromatografia kolumnowa na żelu krzemionkowym), natomiast izolacja finalnych produktów odbywała się za pomocą HPLC.



Schemat 11. Przygotowanie blokowanego 3'-fosforanu tymidyny

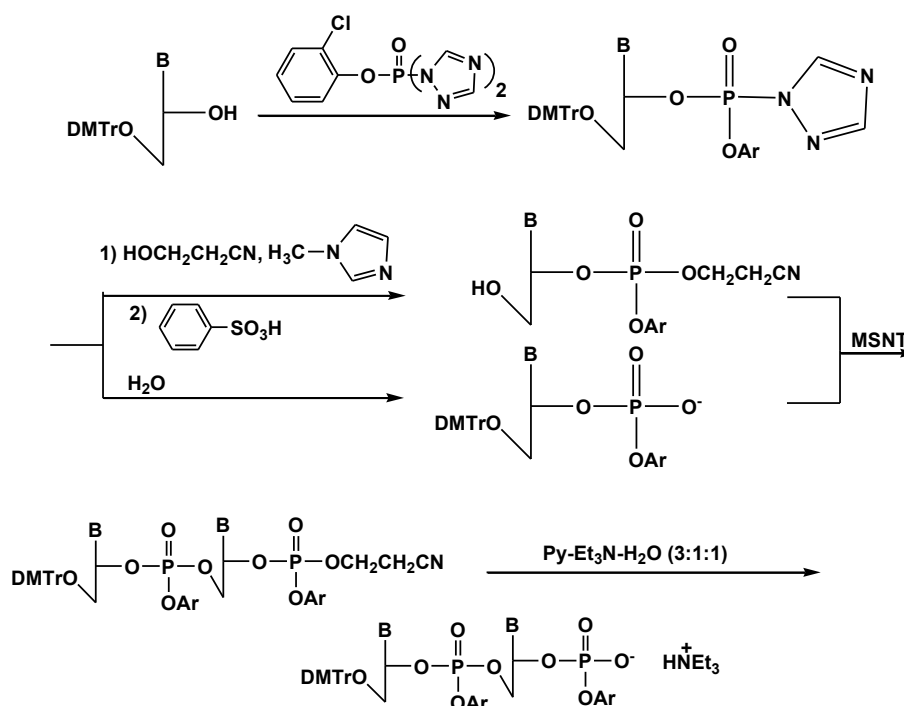
Inne zastosowanie, w którym użyto całkowicie zablokowanych fosforotriestrów obejmowało użycie monofunkcyjnych czynników fosforylujących (schemat 12).^{178;179}



Schemat 12. Fosforylacja monofunkcyjnym czynnikiem fosforylującym

Całkowicie zablokowane mononukleotydy można przekształcać w komponenty 3'-fosfordiestrowe z wolną grupą 5'-hydroksylową. Związki te następnie w reakcji

kondensacji tworzą całkowicie zablokowane dinukleotydy. W przypadku tego typu dinukleotydy dalszą elongację łańcucha można prowadzić w kierunku 3' lub 5'. Oligodeoksynukleotydy odpowiadające fragmentom genu somatostatyny i insuliny zsyntezowano z użyciem oligonukleotydowych bloków syntetycznych.^{178;180} Metoda ta została później zmodyfikowana przez użycie bifunkcyjnego czynnika fosforylującego, bistriazolido o-chlorofenylo fosforanu.¹⁸¹ Reakcje przygotowania dinukleotydy pokazano na schemacie 13.



Schemat 13. Synteza dinukleotydy

Monotriazolidy są aktywnymi związkami pośrednimi, które ulegają reakcji kondensacji z nukleozydem w obecności N-metyloimidazolu. O-chlorofenylo p-metoksyanilidyno dinukleozyd-3'-ylo fosforan syntezowano w reakcji, monotriazolidu z o-chlorofenylo p-metoksyanilidyno nukleozyd-3'-ylo chlorofosforanem.¹⁸² Końcowa aromatyczna grupa p-metoksyanilidynowa blokowanego oligonukleotydu jest bardziej trwała niż grupa 2-cyanoetylowa i może być zachowana przez wiele etapów syntezy. W wieloetapowej syntezie grupy ochronne oligonukleotydu muszą być trwałe także podczas chromatografii na żelu krzemionkowym.

3.1.2.2. Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym

Wcześniejsze próby syntezy polinukleotydów na nośniku polistyrenowym dawały tylko częściowo satysfakcjonujące wyniki, głównie z powodu niecałkowitego odzysku oligonukleotydu z podłoża.^{14;183} Ponowne badanie syntezy metody fosforodiestrowej na podłożu polimerowym z użyciem poliakrylomorfolidu i poliakrylodimetyloamidu dało zachęcające rezultaty pod względem odzysku produktów.^{184;185} Te same podłoża polimerowe użyto do syntezy fosfortriestrowej poli(deoksyrybonukleotydów).¹⁸⁶ Odpowiednio zablokowane mononukleotydy, N-blokowane 5'-O-dimetoksytrytylodeoksynukleozyd-3'-ylo arylofosforany, zostały użyte w reakcji kondensacji. Do otrzymywania np. oligonukleotydów o długości 31 jednostek, użyto podczas kondensacji bloków trinukleotydów.¹⁸⁷ Różnorodne oligodeoksyrybonukleotydy komplementarne do mRNA, otrzymano używając do kondensacji na podłożu poliakrylodimetyloamidowym bloków dinukleotydowych.^{188;189} W ten sam sposób syntezowano około 60 fragmentów oligonukleotydowych odpowiadających genowi dla α_1 -interferonu. Rozwój technik oczyszczania, w szczególności z użyciem wysokorozdzielczej chromatografii cieczowej (HPLC), która była niezbędna w tych syntezach, umożliwił otrzymanie czystych produktów. W metodzie na podłożu stałym, niezmienione substraty i inne zgromadzone produkty uboczne odzyskuje się razem z pożądanymi produktami. Jest to szczególnie uciążliwe w przypadku reakcji kondensacji, gdyż w miarę wzrostu łańcucha wzrasta ilość produktów ubocznych. W większości przypadków stosowano acylowanie nieprzereagowanych grup 5'-hydroksylowych wzrastającego łańcucha. Bardzo użyteczne okazało się użycie chromatografii w fazie odwróconej na alkilowanym silikażelu, w przypadku izolacji wysoko lipofilowych produktów zawierających grupy 5'-O-dimetoksytrytylowe.^{187;190} Dlatego, krótkie łańcuchy oligonukleotydowe o długości około 30 jednostek syntezowano tą techniką i produkt oczyszczano z użyciem HPLC.

Podłoża polistyrenowe przebadano ponownie i porównano z żywicą poliakrylomorfolidową w syntezie oligodeoksynukleotydów metodą fosfortriestrową.¹⁹¹ Letsinger (1965)^{192;193} przeprowadził syntezę na podłożu stałym, jednak synteza w fazie heterogenicznej, przebiegała bardzo wolno. W podejściu Khorany (1967) synteza również była bardzo wolna, około 10 godzin, ale stosunkowo wydajna, powyżej 90% dla reakcji kondensacji. W 1977 roku Norris stwierdził, że nie do końca zadowolające wyniki Letsingera i Khorany, spowodowane były użyciem nieodpowiedniego podłoża stałego. Polistyren nie jest

dostatecznie penetrowany przez aktywowane nukleotydy. Jako substratu do reakcji użył fosfomonoestry nukleozydu, natomiast polistyren zastąpił poliakrylomorfolidem.¹⁹⁴

Usieciowany polistyren z 2% dodatkiem diwinylobenzenu był bardziej wytrzymały mechanicznie niż poliakrylamid, jednak odblokowanie 3'-bursztynianu z podłoża nie odbywało się w sposób ilościowy. Lepsze wyniki uzyskiwano używając polistyrenu z 1% dodatkiem diwinylobenzenu.^{195;196} Używając blokowanych dinukleotydów, jako jednostek kondensujących zsyntezowano 78 oligonukleotydów odpowiadających liczącemu 564 par zasad genu hormonu wzrostu człowieka (schemat14).^{195;196} Przykładowy cykl elongacji z tej syntezy pokazano w tabeli 3.

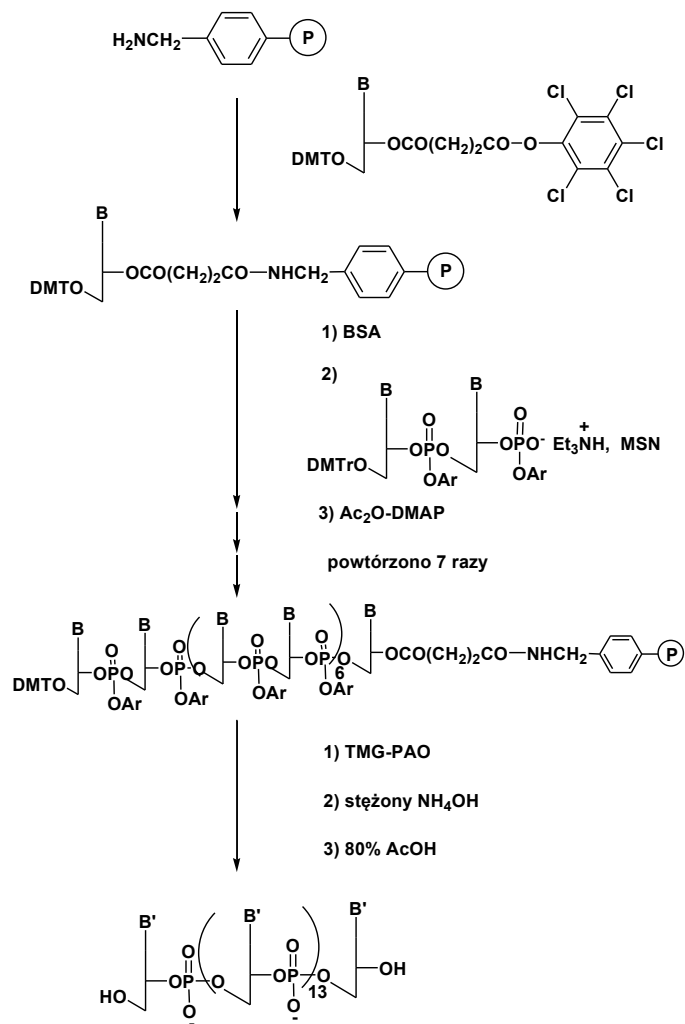
Tabela 3. Synteza deoksyoligonukleotydów na podłożu polimerowym^{195;196}

Krok	Rozpuszczalnik lub reagent	Ilość	Czas reakcji
1	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (7:3)	2 ml	0,1 min
2	2% BSA w CH ₂ Cl ₂ /MeOH	2 ml	1 min
3	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (7:3)	2 ml	0,1 min
4	2% BSA w CH ₂ Cl ₂ /MeOH	2 ml	1 min
5	CH ₂ Cl ₂ /MeOH (7:3)	2 ml	0,1 min
6	pirydyna	2 ml	0,1 min
7	pirydyna	0,3 ml	wspólne odparowanie
8	blok dimeru w pirydynie	200 mg/0,3 ml	wspólne odparowanie
9	MSNT w pirydynie	200 mg/0,3 ml	20 min (40°C)
10	pirydyna	2 ml	0,1 min
11	0,1 M DMAP w pirydynie	1,8 ml	3 min
	Ac ₂ O	0,2 ml	
12	pirydyna	2 ml	0,1 min

Dla przygotowania stosunkowo dużych oligonukleotydów (26 jednostek), użyto bloków tetramerów. Izolacja produktu końcowego była prostsza niż w przypadku użycia do kondensacji jednostek dinukleotydowych. Dupleks o długości 46 par zasad odpowiadający regionowi promotorowemu genu *gal E. coli* zsyntezowano chemicznie używając bloków tetramerowych na tym samym podłożu.¹⁵ Mimo że, przygotowanie tetranukleotydów z dinukleotydów w roztworze wiąże się z dodatkową chromatografią na żelu, to jednak

kondensacja dużych jednostek pozwoliła na uzyskanie czystych produktów, które wymagały krótszego czasu na izolację.

Do syntezy na podłożu stałym metodą fosfortriestrową stosowano również podłoża silikażelowe i podłoża typu CPG (szkło o kontrolowanej porowatości).¹⁹⁷



Schemat 14. Synteza oligonukleotydu na podłożu polistyrenowym

3.2. Grupy fotolabilne dla funkcji hydroksylowych w syntezie oligonukleotydów

Grupy fotolabilne projektuje się obecnie z myślą o wykorzystaniu ich właściwości w badaniach genetycznych, oraz wykorzystaniu do syntezy mikromacierzy DNA. Czołową rolę w tych badaniach odgrywa firma Affymetrix. W Affymetrix użyto grupę α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylową (**MeNPoc**), jako dobrą grupę fotolabilną. Na obecnym etapie rozwoju metod fotolitograficznej syntezy scalonych bibliotek oligonukleotydowych wykorzystuje się mieszane węglany do blokowania grupy 5'-hydroksylowej, przy czym fotolabilny alkohol i funkcja 5'-OH nukleozydu wchodzi w skład tego węglanu.

Grupy fotolabilne są to grupy zawierające chromofory o wysokiej chemicznej stabilności, które mogą być selektywnie aktywowane po naświetlaniu światłem o odpowiedniej długości fali. Najbardziej znanymi grupami są: grupa o-nitrobenzylowa, o-nitrofenyloetylowa, pochodne „benzoinowe” i pyrenylove.^{10;198;199} Proponuje się również zastosowanie powyżej wymienionych typów alkoholi jako blokad terminalnej funkcji fosforanowej w czasie syntezy oligonukleotydów.¹⁹⁸

Dokonując wyboru dobrej grupy fotolabilnej należy wziąć pod uwagę następujące kryteria:

- 1) fotoreakcje powinny być czyste i zachodzić z wysoką wydajnością kwantową ϕ ,
- 2) chromofor powinien charakteryzować się wysokim współczynnikiem absorpcji ϵ przy długości fali powyżej 300 nm, kiedy prawdopodobieństwo spowodowania uszkodzeń środowiska biologicznego po absorpcji światła jest mniejsze. W pewnych przypadkach niskie współczynniki absorpcji mogą być konieczne, aby umożliwić głęboką penetrację próbki przy zastosowaniu wyższych stężeń;
- 3) uboczne produkty fotochemiczne nie powinny wpływać na daną reakcję fotochemiczną i w idealnej sytuacji nie powinny pochłaniać światła o danej długości fali. Co więcej, powinny być biokompatybilne, tzn. nie powinny oddziaływać na badany system. Należy unikać powstawania wolnych rodników;
- 4) w eksperymentach czasowo-rozdzielczych szybkość uwalniania biocynnika musi przekraczać szybkość badanego procesu;
- 5) blokowane związki chemiczne powinny być rozpuszczalne w środowisku biologicznym, składającym się głównie z wody. Wskazane jest by przenikały bariery

biologiczne, takie jak błony komórkowe lub wykazywały powinowactwo do określonych miejsc, takich jak aktywne miejsca enzymów;

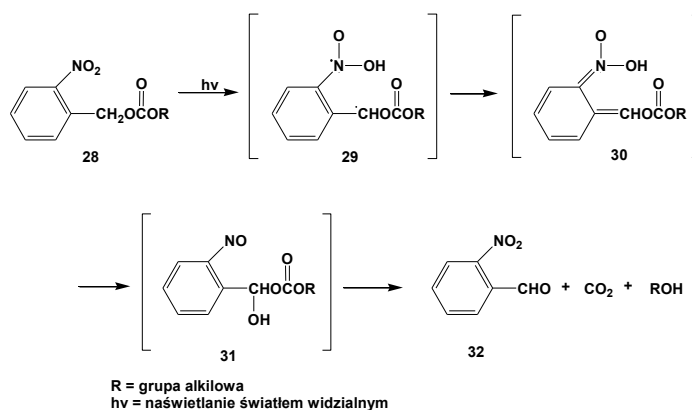
- 6) efektywność detekcji badanego produktu zależy często nie tylko od iloczynu $\epsilon\phi$, który jest proporcjonalny do ilości uwolnionego związku przy danej dawce promieniowania, ale przy małej adsorbancji także od poziomu aktywności przed naświetlaniem.

Wyróżnić można dwa typy fotoblokowań:

- bezpośrednia eliminacja substratu z reaktywnego (singletowego lub trypletowego) stanu wzbudzenia;
- tworzenie się pod wpływem światła reaktywnych produktów pośrednich, które w stanie podstawowym łatwo ulegają rozkładowi, z uwolnieniem zablokowanego substratu.

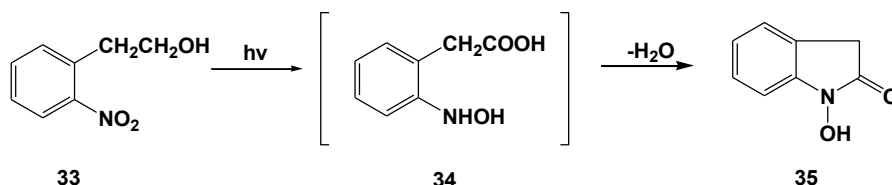
Grupy o-nitrobenzylowe lub inne grupy zawierające ugrupowania fotoczułe są używane jako fotolabilne blokady funkcji hydroksylowych, karboksylowych, aminowych, tiolowych czy karbonylowych.^{200;201} Usunięcie fotolabilnych grup ochronnych odbywa się przez naświetlenie światłem o długości fali powyżej 320 nm. Taka długość fali światła potrzebna jest, aby oderwać atom wodoru z α -metylenowego atomu węgla **28** poprzez wzbudzenie grupy nitrowej, a następnie przegrupowanie do o-nitrozobenzaldehydu (**30**) i odblokowanie alkoholu (**31**). W przypadku grupy 2-nitrobenzylksykarbonylowej uwalniany jest dwutlenek węgla (schemat 15).

Wydajność kwantowa fotoblokowania jest wyższa, gdy pierścień fenyłowy lub metylenowy atomu węgla grupy o-nitrobenzylowej jest podstawiony. Reichmanis i współ.²⁰² donieśli, że wydajność kwantowa fotoblokowania wzrasta 5-krotnie dla estrów o-nitrobenzylowych kwasu trimetylooctowego, kiedy wyjściowy ester jest podstawiony grupą α -metylową.



Schemat 15. Fotoliza estrów 2-nitrobenzylkarbonowych

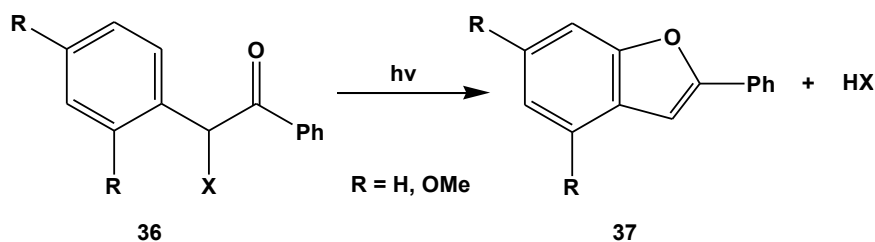
Doniesienia o reakcjach fotochemicznych grup o-nitrowych z β -atomem węgla^{156;203} sugerują, że homologi grupy o-nitrofenyloetylowej mogą być także używane jako grupy fotolabilne. Fotocyklizacja 2-(o-nitrofenylo)etanolu (**33**) do N-hydroksyoksoindolu (**35**)¹⁵⁶ następowała po uprzednim utworzeniu kwasu 2-(o-hydroksyloaminofenylo)octowego (**34**), który powinien ulegać cyklizacji z rozerwaniem wiązania C β -O (schemat 16).^{10;204}



Schemat 16. Fotocyklizacja 2-(o-nitrofenylo)etanolu

Szybkość fotoodblokowania pochodnych 2-(o-nitrofenylo)etoksykarbonylowych (NPEoc) i o-nitrobenzyloksykarbonylowych (NBoc) i efekty α -podstawienia są związane z względną szybkością oderwania atomu wodoru z alkilowego atomu węgla poprzez fotowzbudzenie grupy o-nitrowej: pierwszorzędowa < drugorzędowa < trzeciorzędowa.¹⁰

Grupa benzoinowa (**36**)¹⁹⁹ ze względu na swoje właściwości również została zastosowana jako fotolabilna grupa ochronna. Zalety tej grupy to: wysoka wydajność kwantowa, szybkość odblokowania, oraz tworzenie obojętnego produktu, benzofuranu (**37**) (schemat 17).¹⁹⁹ Jej silna absorpcja w okolicach 300 nm, pozwala na dogodne monitorowanie postępu reakcji za pomocą spektroskopii UV.



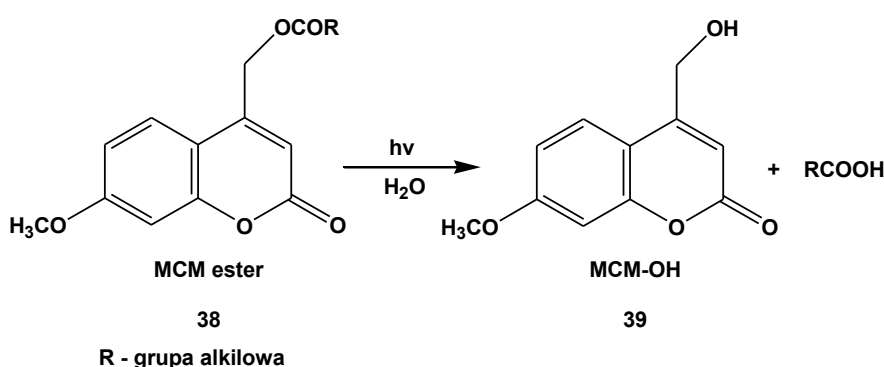
Schemat 17. Fotoreakcja grupy benzoinowej

Sheehan i Wilson²⁰⁵ donieśli, że pochodne acetylowe 3',5'-dimetoksybenzoiny (**3',5'-DMB**) można było wydajnie i czysto odblokować. W czasie odblokowania tworzyły się oczekiwane pochodne benzofuranowe z wydajnością kwantową $\phi=0,64$. Ci sami autorzy

zbadali różne podstawione pochodne, aby określić jakie czynniki strukturalne mają wpływ na wydajność kwantową i szybkość rozkładu substratu. Stwierdzili duży wpływ grup opuszczających.^{206;207} Większość rozpozszeczonych klatkowych cząsteczek, jest pochodzenia benzoinowego i 3',5'-DMB. Badania wykazały, że fotoodblokowania niepodstawionej benzoiny i pochodnych 3'-metoksybenzoiny przebiegają przez trypletowy stan wzbudzony.

Givens i współ.^{208;209} wykazali, że naświetlając fosforotriester benzoiny w metanolu, benzenie lub acetonitrylu uzyskali fosforodiester z 30% wydajnością. Efektywność fotowzbudzenia zjonizowanych estrów fosforanów w wodnym acetonitrylu była silnie zależna od pH. Najlepsze rezultaty fotoodblokowań uzyskano w kwaśnym środowisku, prawdopodobnie dlatego, że protonowany fosforan jest lepszą grupą opuszczającą.

Givens i Matuszewski wykazali, że pochodne kumarynowe mogą być również używane jako fotolabilne grupy ochronne.²¹⁰ Naświetlanie estrów 7-metoksykumaryno-4-ylo-metylowych (**MCM**) (**38**) prowadziło do powstania hydroksymetylokumaryny (**MCM-OH**) (**39**) (schemat 18).²¹¹ Dla tych pochodnych przedział spektralny może zostać rozszerzony, aż do zakresu, który obejmuje światło widzialne, przez wprowadzenie odpowiednich podstawników.¹¹ Podstawniki pozwalają na regulację hydrofilowości związku, oraz poprawiają kwantową wydajność reakcji.



Schemat 18. Fotoreakcja estrów 7-metoksykumaryn-4-ylo-metylowych

Chemiczna synteza oligonukleotydów nadal wymaga dalszych prac metodycznych. Opracowane do dzisiaj metody syntezy oligonukleotydów pozwalają otrzymać na drodze chemicznej fragmenty DNA o długości maksymalnej ok. 250 nukleotydów.

Poszukiwania nowych, doskonalszych metod syntezy oligonukleotydów, zmierzają do opracowania systemów grup ochronnych dających się wzajemnie synchronizować. Opisy syntez ulepszonych grup ochronnych pojawiają się w literaturze coraz częściej. Optymalizację różnych grup ochronnych prowadzi się w sytuacji, kiedy końcowe odblokowanie oligonukleotydu jest skomplikowane. W takich przypadkach potrzebne są bardziej standardowe grupy ochronne. Końcowe odblokowanie oligonukleotydu w środowisku zasadowym w reakcji β -eliminacji (zaproponowane przez Pflleiderer'a) jest najprawdopodobniej najbardziej racjonalnym podejściem. Może to przyczynić się do lepszego poznania właściwości chemicznych docelowych związków i powstawania metod, w których syntezy prowadzi się niejednokrotnie w znacznie mniej drastycznych warunkach, niż za pomocą metod z tradycyjnymi systemami blokad.

4. CELE PRACY

Opracowanie metod chemicznej syntezy oligonukleotydów umożliwiło powstanie metod biologii molekularnej takich, jak sekwencjonowanie DNA i RNA, amplifikacja DNA metodą łańcuchowej reakcji polimerazy, specyficzna mutageneza, oraz innych metod zarówno zaliczanych do tzw. inżynierii genetycznej jak i metod analitycznych. Syntetyczne oligonukleotydy i ich analogi znajdują także zastosowanie praktyczne w tzw. terapii antysensowej czy wspomaganii wydolności systemu odpornościowego. Znajdują też bardzo szerokie zastosowanie praktyczne w najróżniejszych wariantach metod analitycznych opartych na zjawisku hybrydyzacji kwasów nukleinowych. Te ostatnie znajdują szczególnie ważne zastosowanie w nanotechnologiach, do których można zaliczyć syntetyczne mikromacierze oligonukleotydowe tzw. chipy DNA.¹⁻⁹

Zastosowania oligonukleotydów otrzymywanych na drodze syntezy chemicznej zarówno w skali makro (np. różne metody terapii) jak i nano (np. chipy oligonukleotydowe) zależą od skuteczności i poprawności działania wykorzystanej do ich otrzymania metody syntezy. Od tego zależy też zakres ich zastosowań jak i ekonomia w ich wykorzystaniu.

Poszukiwania nowych wariantów metod chemicznej syntezy oligonukleotydów nie straciły dziś wcale sensu pomimo tak wielu spektakularnych przykładów wykorzystania oligonukleotydów otrzymanych metodami opracowanymi do tej pory. Poprawienie skuteczności syntezy i obniżenie jej kosztu pozostaje wyzwaniem naukowym o istotnym znaczeniu praktycznym. Jest to szczególnie ważne wtedy, kiedy myśli się o skali nano czy makro.

Nie bez znaczenia jest także możliwość opatentowania nowych wariantów chemicznej syntezy oligonukleotydów, w tym ochrona patentowa rozwiązań technologicznych do produkcji chipów DNA (mikromacierzy DNA). Stąd poszukiwania rozwiązań syntetycznych, które nie byłyby wcześniej opisane w literaturze patentowej jest również ważnym motywem pracy. Mając to na uwadze podjęliśmy w Pracowni Chemii Biokoniugatów próby ulepszenia fosfortriestrowej metody syntezy oligonukleotydów.

Zasadniczym etapem syntezy oligonukleotydów jest tworzenie wiązania internukleotydogo. Obecnie w laboratoriach i w syntezie na skalę przemysłową najczęściej stosowana jest metoda amidofosforynowa. Jej wykorzystanie jest znacznie szersze niż dwóch innych metod, które opierają się na użyciu czynników kondensujących do wytwarzania wiązań internukleotydogo: metody fosfortriestrowej i metody H-fosfonianowej. Także inne metody zawiązywania wiązań internukleotydogo są stosowane rzadko i do specjalnych celów takich np. jak synteza kontrolowanych pod względem stereochemicznym analogów oligonukleotydów (metoda oksatiafosfolanowa).²¹²

W mojej pracy doktorskiej podjęłam próbę ulepszenia fosfortriestrowej metody syntezy oligonukleotydów.

W metodzie fosfortriestrowej użycie różnych czynników kondensujących w połączeniu z właściwie dobranymi nukleofilowymi katalizatorami pozwala bardzo skutecznie wytwarzać wiązania internukleotydogo pomiędzy nukleotydogym dwuścrem a grupą alkoholową składnika nukleozydogo. Także repertuar grup ochronnych niezbędnych do zapobiegania reakcjom ubocznym towarzyszącym wytwarzaniu wiązań internukleotydogo jest bardzo duży.

Inne uzasadnienia dla podjęcia prób ulepszenia metody syntezy oligonukleotydów są związane z zastosowaniem syntezy oligonukleotydów na powierzchniach płaskich takie, jakie są stosowane do otrzymywania chipów czy mikromacierzy DNA. Do ich otrzymywania wykorzystuje się najczęściej metodę stosującą fotolabilne grupy ochronne funkcji 5'-hydroksylogowej, a do utworzenia wiązania internukleotydogo, metodę amidofosforynową. Pomimo, że chipy DNA dostępne są handlowo i wykorzystywane coraz szerzej w praktyce wiadomo, że skuteczność syntezy „chipowych” oligonukleotydów nie przekracza 95% na etap. Podczas otrzymywania chipów / mikromacierzy DNA należy zapewnić „rosnącym” łańcuchom oligonukleotydów jak największą trwałość. Jest to dodatkowy argument dla zainteresowania się w Pracowni Chemii Biokoniugatów Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN metodą fosfortriestrową. Należy spróbować usprawnić metodę syntezy na podłożu stałym tak, aby możliwe było wydajniejsze otrzymywanie oligonukleotydów, a co za tym idzie, żeby te oligonukleotydy były bardziej jednorodne. Powinno to wpłynąć na poprawę jakości analiz wykonywanych za pomocą otrzymywanych skalonych układów oligonukleotydogo.

Przyjęte założenia w badanym w mojej pracy doktorskiej wariantcie syntezy fosfortriestrowej były następujące:

1. opracowanie wariantu syntezy z wykorzystaniem nukleozydów w miejsce nukleotydów jako monomerów;
2. metoda syntezy zostanie opracowana dla wariantu syntezy na podłożu stałym, przede wszystkim z myślą o przyszłych zastosowaniach w skali od nano do mikro (także z zastosowaniem fotolabilnych grup ochronnych);
3. synteza powinna być jednakowo przydatna dla wzrostu łańcucha oligonukleotydowego w kierunku 5' (tradycyjnie stosowany) jak i 3' (uniezależnienie od kierunku syntezy łańcucha oligonukleotydowego).

Należało rozwiązać następujące zasadnicze problemy:

1. problem wydajnej fosforylacji nukleozydowych funkcji alkoholowych na podłożu stałym bez spinania sąsiadujących na podłożu stałym łańcuchów oligonukleotydowych;
2. problem wydajnej reakcji kondensacji terminalnych funkcji nukleotydowych pomimo możliwego chemicznego łączenia typu głowa do głowy sąsiadujących na podłożu stałym łańcuchów oligonukleotydowych.

Dodatkowym zadaniem stało się też opracowanie syntezy kilku monofunkcyjnych reagentów fosforylujących, które z racji swej monofunkcyjności nie mogą spiąć dwóch sąsiadujących łańcuchów oligonukleotydowych. W przypadku kiedy nastąpiłoby ewentualne „spięcie” funkcji fosforanowych, powinnam potrafić je skutecznie aktywować uzyskując pożądane fosforotriestry.

Rozwiązania syntetyczne zbadane dla związków modelowych miały być następnie przeniesione do syntezy na podłożu stałym. Synteza oligonukleotydów z wykorzystaniem modyfikowanej metody triestrowej powinna być możliwa i wtedy, gdy fotolabilne grupy ochronne zostaną wykorzystane do blokowania funkcji 5'-hydroksylowych i wtedy, gdy będą wykorzystane jako czasowe triestrowe grupy ochronne terminalnej grupy fosforanowej rosnącego łańcucha oligonukleotydu.

Planowane w przyszłości zastosowanie fotolabilnych grup ochronnych w syntezie oligonukleotydów wymagało opracowania syntezy odpowiednich reagentów i metod wprowadzania tych grup. W skład węglanowych grup ochronnych funkcji 5'-hydroksylowej wchodzi najczęściej reszta α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowa (MeNPoc). W literaturze opisano syntezę amidofosforynów z grupą MeNPoc bardzo pobieżnie. Brak jest

bardziej szczegółowych danych, zarówno na temat jej syntezy jak i na temat syntezy samego alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego. W tej sytuacji zdecydowałam się opracować własne podejście do syntezy alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego (**MeNP-OH**), a następnie skupić uwagę na opracowaniu syntezy nukleozydów blokowanych w pozycji 5' grupą MeNPoc. Tak zablokowane nukleozydy będzie można następnie wykorzystywać do syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym w nowym wariantcie metody fosfortriestrowej. Nukleozyd blokowany w pozycji 5' grupą MeNPoc można poddać reakcji kondensacji z resztą fosforanową przyłączonego do podłoża oligonukleotydu. Następnie po przyłączeniu nukleozydu blokowanego grupą fotolabilną, grupę α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylową z powstałego fosfortriestru odblokowuje się przez jej naświetlenie, za pomocą światła ultrafioletowego o długości fali $\lambda=360\text{nm}$. Po odblokowaniu grupy α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej przeprowadzić można reakcję fosforylacji z utworzonymi nowymi monofunkcyjnymi czynnikami fosforylującymi.

5. BADANIA WŁASNE

Scalone biblioteki oligonukleotydowe są od szeregu lat przedmiotem intensywnie prowadzonych prac badawczo-rozwojowych zmierzających do opracowania technologii tzw. chipów DNA. Synteza scalonych bibliotek oligonukleotydowych jest podstawą nowych technologii analizy sekwencji kwasów nukleinowych.

Ulepszenia metody syntezy związane są z zastosowaniem syntezy oligonukleotydów na powierzchni płaskiej takiej, jaka jest zastosowana do otrzymywania tzw. chipów-DNA. Do ich otrzymywania stosuje się najczęściej metodę wykorzystującą fotolabilne grupy ochronne funkcji 5'-hydroksylowej, a do zawiązania wiązania internukleotydowego metodę amidofosforynową.

Pomimo, że chipy DNA dostępne są handlowo i wykorzystywane coraz szerzej w praktyce wiadomo, że skuteczność syntezy oligonukleotydów wchodzących w ich skład nie przekracza 95% na etap. Ważne jest zatem usprawnienie metody syntezy na podłożu stałym tak, aby możliwe było wydajniejsze otrzymywanie oligonukleotydów, a co za tym idzie żeby te oligonukleotydy były czystsze i bardziej jednorodne, gdyż po zakończeniu syntezy zakotwiczonego oligonukleotydu nie ma możliwości jego oczyszczenia w przypadku większości opracowanych metod syntezy. Podwyższenie wydajności syntezy powinno wpłynąć na poprawę jakości analiz wykonywanych za pomocą tych układów scalonych.

Drugi bardzo ważny aspekt opracowania nowych wariantów syntezy oligonukleotydów to ochrona patentowa metod wytwarzania scalonych bibliotek DNA (chipów i mikromacierzy DNA). Opracowanie nowych oryginalnych metod syntezy oligonukleotydów, które mogłyby posłużyć do otrzymywania scalonych bibliotek DNA, a jednocześnie nie byłyby chronione w literaturze patentowej, byłoby naturalnie bardzo korzystne. Przystąpiłam do badań, których celem było opracowanie nowego wariantu syntezy oligonukleotydów, mając na uwadze również możliwość opatentowania metody.

Podjęłam próby ulepszenia metody fosfortriestrowej. Opracowany nowy wariant metody fosfortriestrowej ma również wykorzystywać fotolabilne grupy ochronne.

Na obecnym etapie rozwoju fotolitograficznej metody syntezy scalonych bibliotek oligonukleotydowych wykorzystuje się przede wszystkim mieszane węglany do blokady grupy 5'-hydroksylowej, przy czym „fotolabilny alkohol” i funkcja 5'-OH nukleozydu (oligonukleotydu) wchodzi w skład tego węglanu. Jako alkohole stosuje się zdolne do przemian fotochemicznych, pochodne o-nitrobenzylowe, o-nitrofenyloetylowe, benzoinowe i pyrenylowe.¹⁰⁻¹² Proponuje się również zastosowanie powyżej wymienionych typów alkoholi jako blokad terminalnej funkcji fosforanowej w czasie syntezy oligonukleotydu.^{11;13;15}

W mojej pracy podjęłam próby przygotowania amidofosforynów chronionych fotolabilną węglanową grupą blokującą, a także opracowania wariantu metody syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym, w którym dałoby się wykorzystać fotolabilne grupy ochronne terminalnej funkcji fosforanowej.

5.1. Zastosowania grupy α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej (MeNPoc)

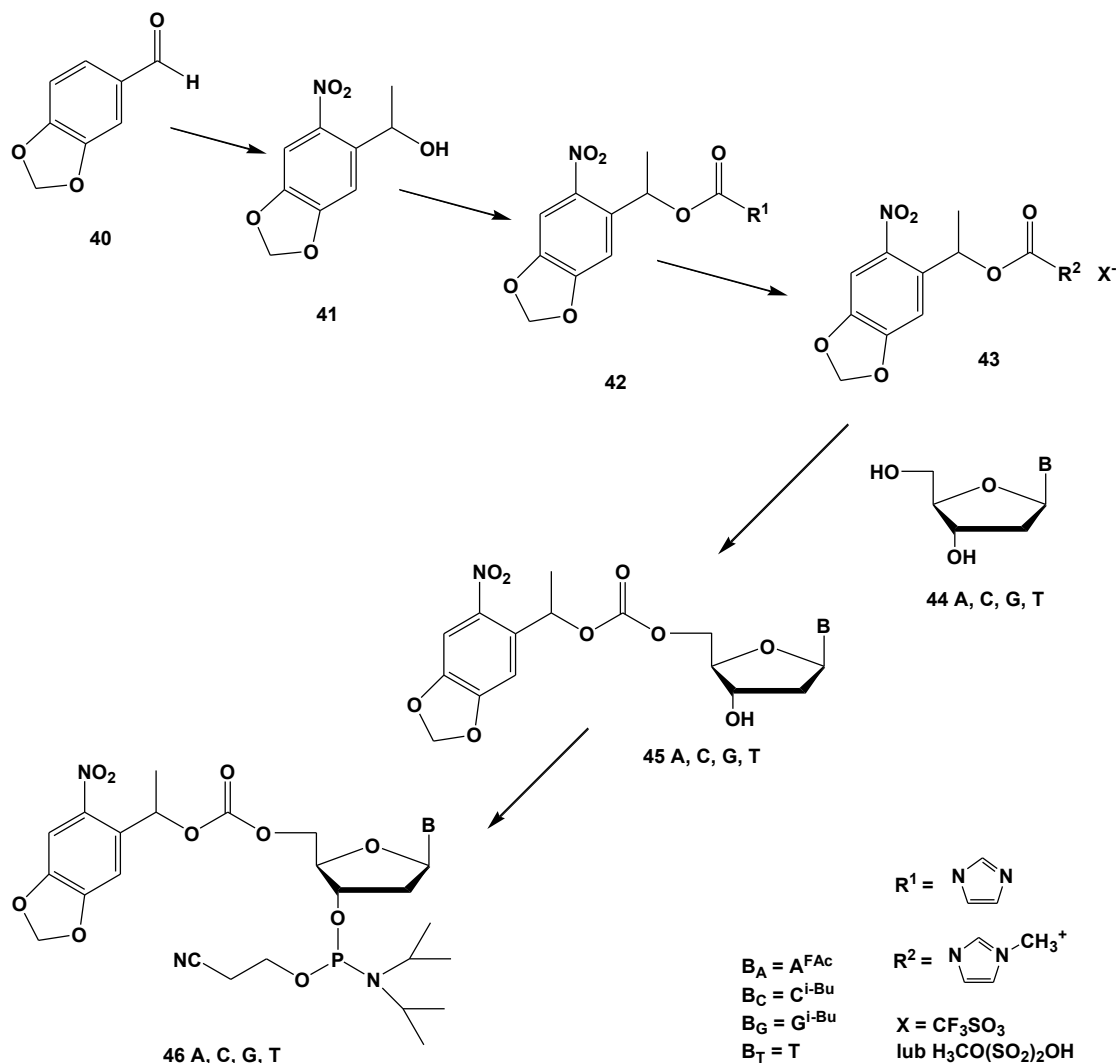
5.1.1. Synteza alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego (MeNP-OH)

W skład węglanowych grup ochronnych funkcji 5'-hydroksylowej wchodzi najczęściej reszta α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowa (**MeNPoc**). Wykazano w badaniach firmy Affymetrix, że grupa MeNPoc jest kilkukrotnie bardziej labilna niż analogiczna grupa z resztą 6-nitropiperonylową.^{198;213;214} Z tego względu większość doniesień literaturowych o syntezie chipów DNA, nie tylko z Affymetrix, wykorzystuje fotolabilne ugrupowanie α -metylo-6-nitropiperonylowe. W literaturze opisano syntezę amidofosforynów z grupą MeNPoc bardzo pobieżnie. Brak jest bardziej szczegółowych danych zarówno na temat jej syntezy jak i na temat syntezy samego alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego.

Zdecydowałam się opracować własne podejście do syntezy alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego (**MeNP-OH**, **41**), a następnie skupić uwagę na opracowaniu syntezy nukleotydów blokowanych w pozycji 5' grupą MeNPoc.

Postanowiłam wykorzystać handlowo dostępny aldehyd piperonylowy, a nie aldehyd 6-nitropiperonylowy. Ten ostatni jest znacznie droższy. Udało się mi ten plan zrealizować i chociaż w syntezie korzystałam z ogólnie znanych procedur preparatyki związków organicznych, jednak musiałam tak naprawdę dopiero sama te procedury dopasować do moich potrzeb i je zoptymalizować. Ogólny przebieg syntezy, które doprowadziły do

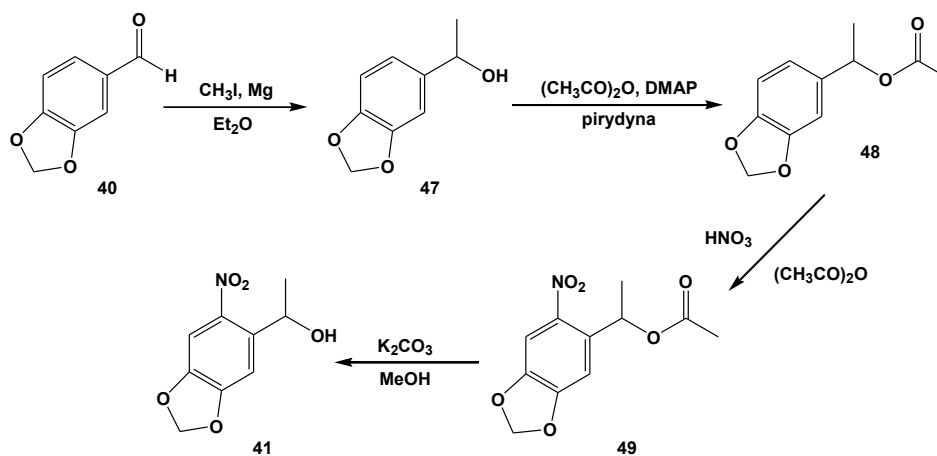
utworzenia amidofosforynów nukleozydowych blokowanych grupą MeNPoc, przedstawia schemat 19.



Schemat 19. Etapy syntezy od aldehydu piperonylowego do amidofosforynów nukleozydowych blokowanych na funkcji 5'-OH grupą MeNPoc

Pierwszym etapem była synteza alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego (**41**), który miał posłużyć do otrzymania grupy α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej. W reakcji Grignarda z jodkiem metylomagnezowym w eterze nastąpiło przekształcenie piperonalu (**40**) w alkohol α -metylo-piperonylowy (**47**). Reakcja ta przebiegła z dobrą wydajnością (88%). Wprowadzenie grupy nitrowej do tego związku wymagało uprzedniego zablokowania funkcji alkoholowej ze względu na możliwość zajścia niepożądanych reakcji ubocznych w mieszaninie nitrującej. Zdecydowałam się zastosować blokadę acetylową mając na uwadze

zarówno koszty odczynników jak i późniejsze usuwanie grupy ochronnej. Tak więc następnie poprzez działanie na otrzymany alkohol α -metylo-piperonylowy bezwodnikiem octowym w pirydynie i wobec DMAP jako katalizatora nukleofilowego, zablokowałam grupę hydroksylową (**48**). Reakcja nitrowania może zajść tylko w pozycję orto, gdyż pozycja para jest zajęta przez podstawnik metylenoksylowy. Reakcję nitrowania (**49**) prowadziłam w mieszaninie: stężony kwas azotowy - bezwodnik kwasu octowego w temperaturze -5°C . Ostatnim etapem tej syntezy była hydroliza blokady acetylowej. Zależało mi na zastosowaniu jak najłagodniejszych warunków hydrolizy. W trakcie całej syntezy starałam się korzystać w miarę możliwości z reagentów, których użycie nie pociągałoby za sobą stosowania pracochłonnych przerobów mieszanin preakcyjnych. Do hydrolizy zastosowałam jako reagent „zasadowy” węglan w alkoholu. I tak, w obecności metanolu i węglanu potasu następuje stosunkowo szybko reakcja odblokowania grupy acetylowej i uwolnienie funkcji hydroksylowej. Końcowym produktem reakcji był oczekiwany alkohol α -metylo-6-nitropiperonylowy (**41**) (schemat 20). Opracowaną przeze mnie procedurę wykorzystałam później kilkakrotnie do otrzymania kilkudziesięciogramowych ilości alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego w pojedynczej szarży.



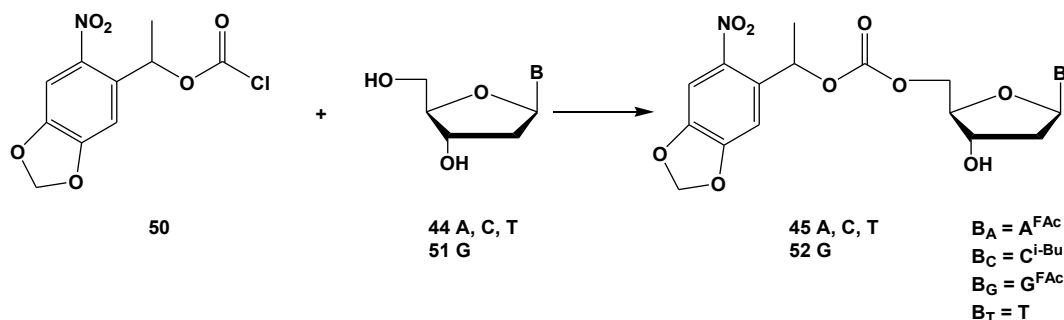
Schemat 20. Synteza alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego

5.1.2. Otrzymywanie pochodnych α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowych

Następnym etapem po otrzymaniu alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego miało być utworzenie pochodnej pozwalającej na wprowadzenie grupy α -metylo-6-

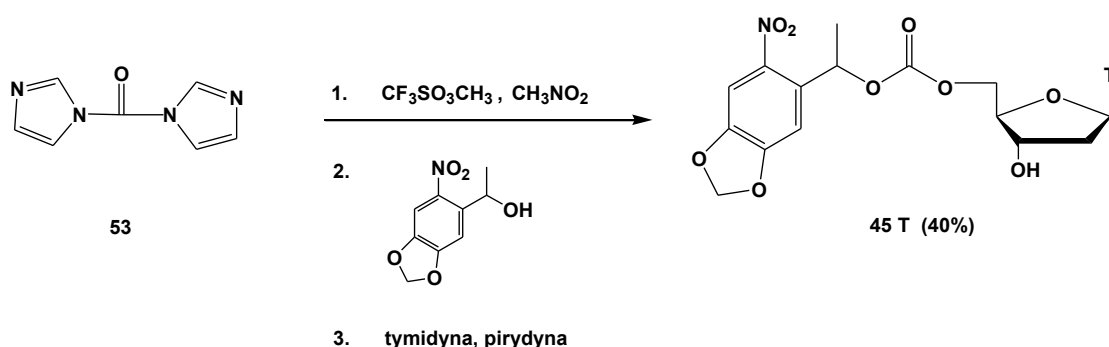
-nitropiperonyloksykarbonylowej (MeNPoc) w pozycję 5'. Ten etap pracy okazał się najbardziej kłopotliwym etapem reakcji w całej syntezie grupy blokującej MeNPoc.

Z publikacji wiadomo, że istnieją dwie drogi otrzymywania takiej pochodnej. Jedną z nich to otrzymanie chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonylu (**50**), który następnie, można użyć do reakcji otrzymywania nukleozydu z zablokowaną funkcją 5'-OH grupą fotolabilną MeNPoc (**45 A, C, T** oraz **52 G**) (schemat 21).²¹⁵



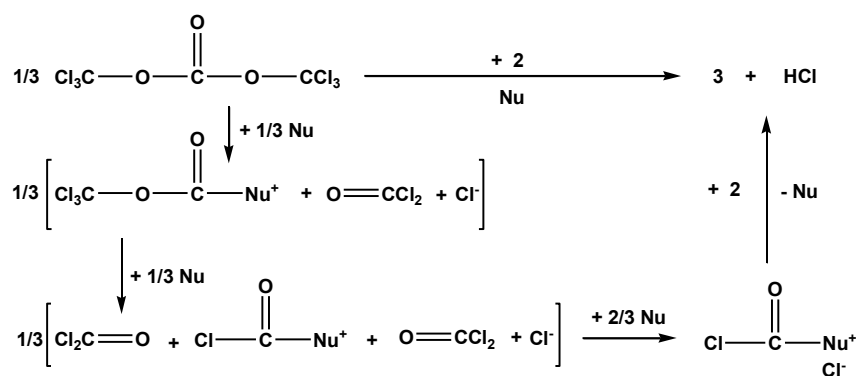
Schemat 21. Otrzymywanie nukleozydu z zablokowaną funkcją 5'-OH grupą fotolabilną MeNPoc z chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonylu

Drugi sposób opiera się na wykorzystaniu N,N'-karbonyldiimidazolu (**53**). Ten drugi sposób wykorzystał Pirrung i współ. do otrzymania nukleozydów blokowanych w położeniu 5'-OH grupą ochronną α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylową i grupą 3',5'-dimetoksybenzoinoksy karbonylową (schemat 22).²¹³



Schemat 22. Otrzymywanie nukleozydu podstawionego na funkcji 5'-OH grupą fotolabilną MeNPoc według Pirrunga i współpracowników

W pierwszej kolejności postanowiłam zbadać możliwość otrzymania chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonylu (**50**). Do otrzymywania chloromrówczanów najczęściej stosowanym substratem jest fosgen. Jednak chcąc uniknąć kontaktu z tym toksycznym gazem, postanowiłam zastąpić go jego bezpiecznym w użyciu 'prekursorem' tzw. trifosgenem. Trifosgen jest ciałem stałym, krystalicznym (temp. top. 80°C, temp. wrz. 260°C). Zgodnie z mechanizmem jego działania, opisanym przez Heinera Eckerta i Barbarę Forster²¹⁶, trifosgen pod wpływem czynnika nukleofilowego rozpada się wg. schematu 23.



Schemat 23. Rozpad trifosgeny pod wpływem czynnika nukleofilowego

Wykorzystując te informacje postanowiłam użyć trifosgeny do otrzymania chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonylu, który miał posłużyć jako substrat do otrzymania pochodnej α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej.

Chloromrówczany jako chlorki kwasowe są związkami reaktywnymi i trudnymi do analizy chromatograficznej typu TLC. Prowadząc wstępne doświadczenia otrzymywania chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonylu w niewielkiej, co najwyżej milimolowej skali, musiałam zastosować odpowiednią metodę analityczną. Dlatego chcąc się upewnić, że otrzymany produkt to oczekiwany chloromrówczan **50**, przeprowadziłam następujące próby w celu uzyskania różnych pochodnych z grupą MeNPoc (schemat 24 a,b,c).

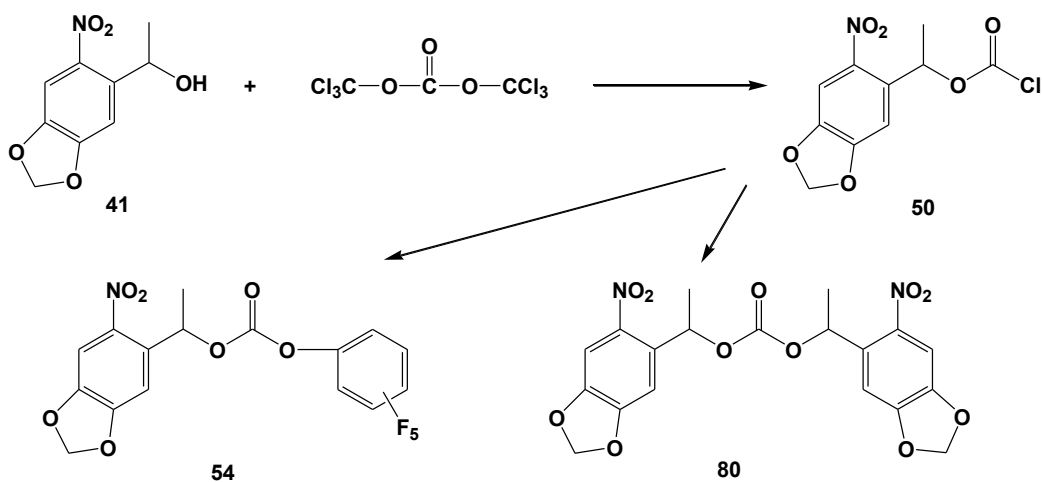
We wszystkich wariantach syntezy, etap otrzymywania chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonylu (**50**) opierał się na schemacie rozpadu trifosgeny opisanym w literaturze.²¹⁶

Na tym etapie użyłam następujących ilości substratów:

alkohol α -metylo-6-nitropiperonylowy	3 równoważ. mol.
trifosgen	1 równoważ. mol.
pirydyna lub trietyloamina	1 równoważ. mol.

Założyłam, że chloromrówczan α -metylo-6-nitropiperonylu (**50**) zaraz po jego wytworzeniu zostanie albo poddany bezpośredniej reakcji z alkoholem, albo wcześniej zostanie przekształcony w inny prekursor grupy ochronnej MeNPoc taki jak np. aktywny ester pentafluorofenylowy. Wiadomo, że aktywne estry pentafluorofenylowe aminokwasów są bardzo wygodnymi reagentami w syntezie peptydów.

Pierwszą próbę, którą podjęłam to próba uzyskania pochodnej pentafluorofenylo α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej (**54**) (schemat 24).



Schemat 24. Otrzymywanie pochodnej pentafluorofenylo α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej z chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonylu

W pierwszej kolejności wytworzyłam chloromrówczan α -metylo-6-nitropiperonylowy (**50**) w następujący sposób: do trifosgeny (148 mg; 0,5 mmola) rozpuszczonego w 2 ml tetrahydrofuranu dodałam alkohol α -metylo-6-nitropiperonylowy (316 mg; 1,5 mmola) rozpuszczony w 3 ml tetrahydrofuranu. Mieszaninę reakcyjną mieszałam przez 5 minut na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej. Następnie dodałam pirydynę (0,163 ml; 1,5 mmola), która była czynnikiem nukleofilowym w tej reakcji. Po dodaniu pirydyny wytrącił się chlorowodorek pirydyny. Po 1,5 godziny analiza TLC wykazała (chlorek metylenu / metanol, 95:5, v/v) całkowite przereagowanie **41**, prawdopodobnie z równoczesnym wytworzeniem produktu przejściowego, jakim powinien być **50**. Produkt **50** jest związkiem bardzo nietrwałym, dlatego też przed reakcją z pentafluorofenolem mieszanina poreakcyjna nie była oczyszczana. Przeprowadziłam jedynie krótki przerób w celu usunięcia wytworzonego chlorowodoru pirydyny. Mieszaninę odfiltrowałam, zatężyłam pod

zmniejszonym ciśnieniem i odparowałam z toluenem w celu usunięcia pirydyny. Przypuszczając, że utworzył się chloromrówczan α -metylo-6-nitropiperonylu (**50**), przeprowadziłam reakcję z pentafluorofenolem. Do mieszaniny dodałam pentafluorofenol (184 mg; 1 mmol) rozpuszczony w 4 ml tetrahydrofuranu, trietyloaminę (0,696 ml; 5 mmola) i niewielką ilość DMAP. Po jednej godzinie wytworzył się produkt (analiza TLC), jednak reakcja nie zaszła do końca. Dodałam ponownie 1 mmol pentafluorofenolu. Dodawanie kolejnych porcji pentafluorofenolu (3 x po 1 mmol), nie zmieniło stopnia przereagowania substratu, jak również stopnia wytworzenia oczekiwanego produktu **54**. Reakcję zakończyłam dodając 2,5 ml wody, następnie fazę wodną trzykrotnie ekstrahowałam chlorkiem metylenu. Połączone ekstrakty suszyłam bezwodnym węglanem potasu i zatężyłam pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany produkt oczyszczałam na kolumnie chromatograficznej, stosując jako eluent chlorek metylenu / metanol.

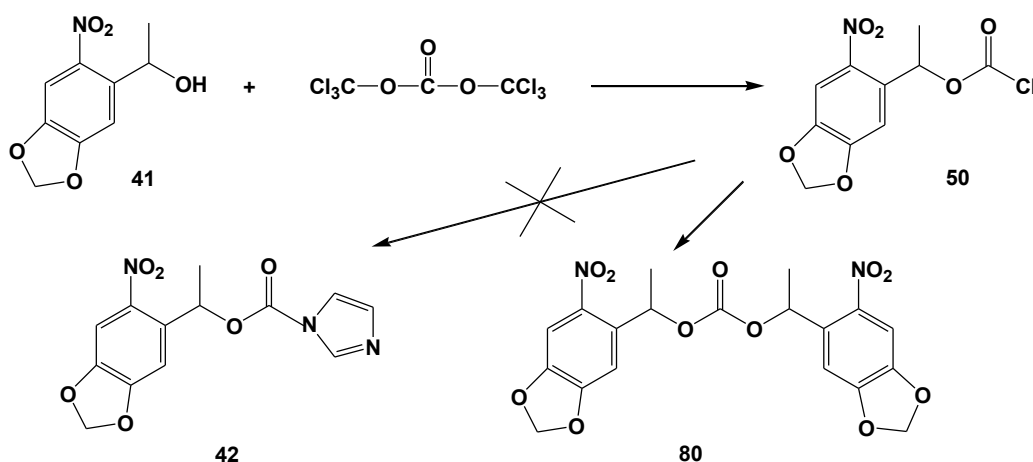
Po oczyszczeniu i zanalizowaniu okazało się, że głównym produktem tej reakcji jest symetryczny węglan MeNPO-H (**80**). Podejście to nie doprowadziło do powstania oczekiwanego produktu **54**. Nie udało się doprowadzić do przereagowania alkoholu bez jednoczesnego wytworzenia się symetrycznego węglanu. Potwierdzeniem uzyskania symetrycznego węglanu MeNPO-H (**80**), była analiza masowa, jak również widmo ^1H NMR. Przeprowadziłam ponownie próbę otrzymania **54**. Reakcję przeprowadziłam używając takich samych ilości stechiometrycznych substratów, jednak w tym przypadku zmieniłam rozpuszczalnik na eter dietylowy, a pirydynę zastąpiłam trietyloaminą. Również w tym przypadku produktem końcowym, okazał się symetryczny węglan MeNPO-H (**80**).

Postanowiłam zmienić sposób generowania chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonylowego (**50**). Rozpuściłam trifosgen (148 mg; 0,5 mmola) w 4 ml eteru dietylowego, następnie dodałam 1/3 równoważnika molowego pirydyny (0,054 ml; 0,5 mmola), po 2 minutach dodałam pozostałą ilość pirydyny (2/3, 0,108 ml; 1 mmol). Po 10 minutach od momentu dodania całej ilości pirydyny, dodałam alkohol α -metylo-6-nitropiperonylowy (316 mg; 1,5 mmola) rozpuszczony w 4 ml eteru dietylowego. Po 15 minutach można było zaobserwować (analiza TLC) całkowite przereagowanie **41**. Reakcję odfiltrowałam, zatężyłam pod zmniejszonym ciśnieniem i odparowałam z toluenem w celu usunięcia pirydyny. Również w tym przypadku przypuszczając, że utworzył się chloromrówczan α -metylo-6-nitropiperonylu, przeprowadziłam reakcję z pentafluorofenolem. Do mieszaniny dodałam tak jak poprzednio pentafluorofenol (184 mg; 1 mmol) rozpuszczony w 4 ml tetrahydrofuranu, trietyloaminę (0,696 ml; 5 mmola) i niewielką ilość DMAP. Po

godzinie wytworzył się produkt (analiza TLC). Reakcja nie zaszła jednak do końca. Dodałam ponownie 1 mmol pentafluorofenolu. W tym przypadku również uzyskałam jako główny produkt symetryczny węglan MeNPO-H (**80**). Inny sposób generowania chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonylowego nie doprowadził do otrzymania **54**.

Podjęłam następną próbę uzyskania **54**. Zmieniłam temperaturę reakcji, w której wytwarzał się chloromrówczan α -metylo-6-nitropiperonylowy. Reakcję prowadziłam w temperaturze -2 do -5°C . Po wytworzeniu **50**, reakcja z pentafluorofenolem prowadzona była tak jak w poprzednich próbach. W tym przypadku uzyskałam pochodną pentafluorofenylo α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylową z wydajnością 5%. W celu potwierdzenia, że otrzymany produkt to **54** wykonałam analizę masową, jak również widmo magnetycznego rezonansu jądrowego dla jądra fluoru (^{19}F NMR).

Sprawdziłam również, czy możliwe jest uzyskanie imidazolowej pochodnej α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej (**42**) (schemat 25).

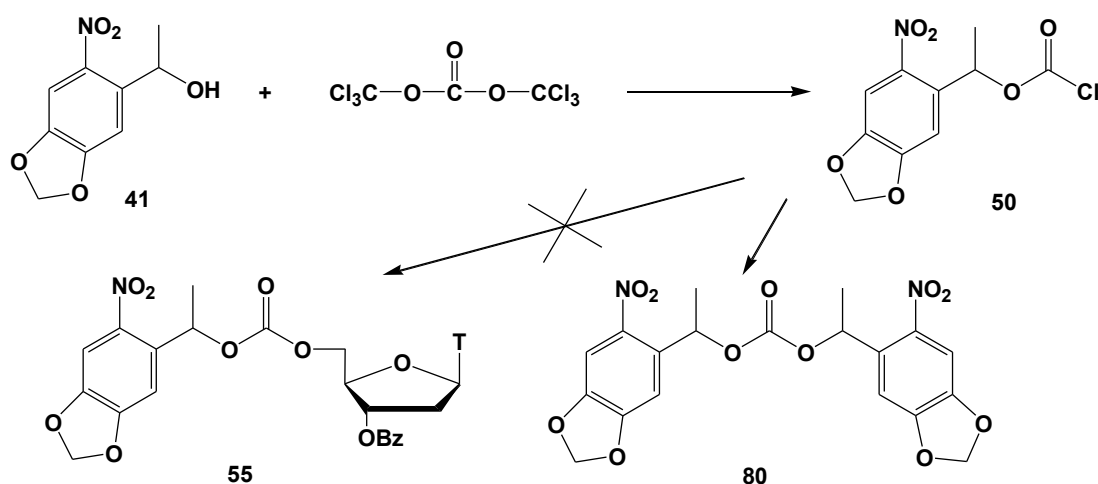


Schemat 25. Otrzymywanie pochodnej imidazolowej α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej z chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonylu

W pierwszej kolejności wytworzyłam chloromrówczan α -metylo-6-nitropiperonylowy (**50**) w następujący sposób: do trifosgeny (148 mg; 0,5 mmola) rozpuszczonego w 2 ml tetrahydrofuranu dodałam alkohol α -metylo-6-nitropiperonylowy (316 mg; 1,5 mmola) rozpuszczony w 3 ml tetrahydrofuranu. Po dodaniu mieszaninę mieszałam przez 5 minut na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej. Następnie dodałam pirydynę (0,163 ml; 1,5 mmola), która była czynnikiem nukleofilowym tej reakcji. Po dodaniu pirydyny wytrącił się chlorowodorek pirydyny. Po 1,5 godziny analiza TLC wykazała (chlerek metylenu /

metanol, 95:5, v/v) wykazała całkowite przereagowanie **41**. Przypuszczając, że utworzył się chloromrówczan α -metylo-6-nitropiperonylu, przeprowadziłam reakcję z imidazolem. Do mieszaniny dodałam imidazol (102 mg, 1,5 mmola) rozpuszczony w 2 ml tetrahydrofuranu i pirydynę (0,163 ml; 1,5 mmola). Po jednej godzinie, ani analiza TLC, ani analiza ^1H NMR nie wykazały utworzenia **42**. W reakcji głównym produktem okazał się symetryczny węglan MeNPO-H (**80**). Przeprowadziłam próbę w której, generowanie chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonylowego (**47**) odbywało się w temperaturze 0°C . Jednak również w tym przypadku, nie otrzymałam oczekiwanego **42**.

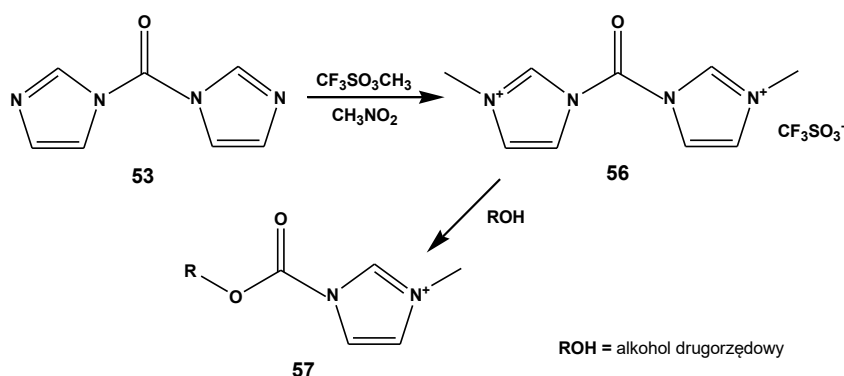
Przeprowadziłam jeszcze jedną próbę (schemat 26). Postanowiłam otrzymać pochodną 5'- α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylo 3'-O-benzoilotymidyny. W pierwszej kolejności wytworzyłam chloromrówczan α -metylo-6-nitropiperonylowy (**50**) w taki sam sposób jak w przypadku próby syntezy **42**. Po wytworzeniu chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonylowego (**50**), do mieszaniny dodałam 3'-O-benzoilotymidynę (250 mg, 0,72 mmola) i niewielką ilość DMAP. Postęp reakcji obserwowałam za pomocą TLC. Można było zaobserwować powstawanie produktu. Jednak analiza ^1H NMR i tym razem nie potwierdziła powstania produktu **55**. Również w tym przypadku, powstającym głównym produktem okazał się symetryczny węglan MeNPO-H **80**.



Schemat 26. Otrzymywanie pochodnej 5'- α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylo 3'-O-benzoilotymidyny z chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonylu

Z przytoczonych opisów wybranych prób, jasno wynika, że otrzymanie pochodnej α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej nie udało się. Wprawdzie w jednej z prób uzyskałam pożądany związek, pochodną pentafluorofenylo α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylową, jednak z bardzo niską wydajnością (5%). Dlatego zdecydowałam się poszukać skuteczniejszego sposobu wprowadzania grupy MeNPoc w położenie 5'-OH nukleozydów niż generowanie *in situ* aktywnych analogów chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylu. Po przeprowadzeniu powyżej opisanych prób nadal nie chciałam otrzymywać chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylu w większej skali ze względu na toksyczność fosgenu a zastosowanie trifosgenu, który jest drogim odczynnikiem, okazało się na tym etapie badań nieskuteczne.

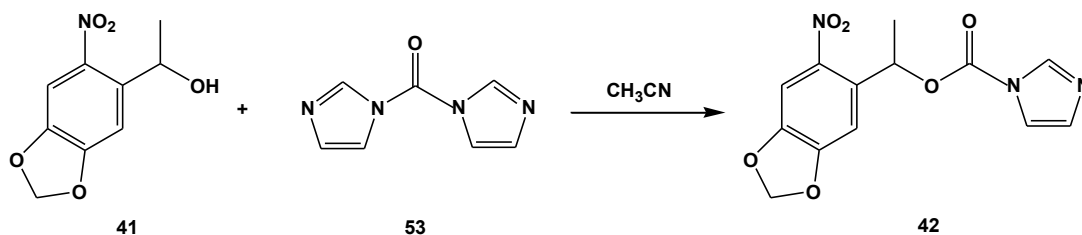
Inna z metod otrzymywania pochodnych nukleozydowych blokowanych w położeniu 5' grupami ochronnymi typu węglanowego, została opisana przez M.C. Pirrunga i współ.²¹⁷ Polega ona na wykorzystaniu N,N'-karbonylodiimidazolu (CDI), który w reakcji z bardzo efektywnie działającym czynnikiem metylującym jakim jest trifluorometanosulfonian metylu ulega bis-N,N'-metylowaniu w nitrometanie (**56**) (schemat 27).^{217;218}



Schemat 27. Otrzymywanie pochodnej alkoksykarbonylometyloimidazolowej

Następnie tę aktywną pochodną CDI (**56**) poddaje się reakcji z jednym równoważnikiem molowym alkoholu drugorzędowego uzyskując aktywną pochodną karbaminianową (**57**) (np. triflan alkoksykarbonylo-N-metyloimidazoliowy) zdolną do reakcji z drugą cząsteczką alkoholu. Reaktywność powstałego produktu **57** w reakcjach z alkoholami wynika z obecności czwartorzędowego atomu azotu w pierścieniu imidazolowym. W ten sposób otrzymano 5'-węglanowe pochodne nukleozydów zarówno typu MeNPoc jak i z grupą 3',5'-O-dimetoksybenzoinksykarbonylową.

Z drugiej strony, w literaturze można znaleźć informacje na temat reakcji CDI z alkoholami prowadzące do trwałych karbaminianów imidazolowych.²¹⁹ Postanowiłam skorzystać z tego faktu i zaproponowałam syntezę nowego odczynnika do wprowadzania grupy MeNPoc w pozycję 5'-OH nukleozydu. W reakcji alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego z N,N'-karbonyldiimidazolem w acetonitrylu otrzymałam imidazolid MeNPoc (**42**) jako trwały, krystaliczny związek (schemat 28).



Schemat 28. Otrzymywanie imidazolidu MeNPoc

Związek **42** oczyściłam wykorzystując do tego celu chromatografię kolumnową na silikażelu. Reakcja otrzymywania **42** przebiega z 96% wydajnością. Strukturę otrzymanego imidazolidu MeNPoc (**42**) potwierdziłam za pomocą widm protonowego rezonansu magnetycznego. Podczas długiego okresu przechowywania związku bez dostępu wilgoci w lodówce związek nie ulega rozkładowi.

N-metylowanie reszty imidazolowej tego odczynnika **42** powinno przekształcić go w aktywną formę N-metyloimidazoliową **43**. Postanowiłam zbadać:

1. użycie innych, obok triflanu (trifluorometanosulfonianu) metylu, czynników metylujących – takich jak, siarczan dimetylu, jodek metylu;
2. użycie innych, obok nitrometanu, rozpuszczalników dla reakcji metylowania-acetonitryl, pirydyna, N,N'-dimetyloformamid;
3. możliwość „dezaktywacji” użytego w nadmiarze czynnika metylującego jako etap poprzedzający użycie aktywnego karbaminianu w reakcji acylowania nukleozydu - dezaktywacja czynnika metylującego miałyby zapobiec ewentualnemu metylowaniu nukleozasad nukleozydowych.

W celu sprawdzenia jak zachodzą reakcje metylowania, w pierwszej kolejności przeprowadziłam próby metylowania N,N'-karbonyldiimidazolu za pomocą $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ i $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$ (Tabela 4). W tabeli 4 porównałam przesunięcia sygnałów pochodzące od N,N'-karbonyldiimidazolu przed i po metylowaniu.

Tabela 4. Metylowanie N,N'-karbonyldiimidazolu (CDI) za pomocą $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ i $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$ w nitrometanie

CDI	CDI ⁺ - CH ₃ metylowanie $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$	CDI ⁺ - CH ₃ metylowanie $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$
8,20 ppm (s, 2H, 2xCH)	8,86 ppm (s, 2H, 2xCH)	8,93 ppm (s, 2H, 2xCH)
7,53 ppm (m, 2H, 2xCH)	7,44 ppm (m, 2H, 2xCH)	7,43 ppm (m, 2H, 2xCH)
7,26 ppm (m, 2H, 2xCH)	7,18 ppm (m, 2H, 2xCH)	7,20 ppm (m, 2H, 2xCH)
	3,99 ppm (s, 6H, 2xCH ₃)	3,93 ppm (s, 6H, 2xCH ₃)
	4,121 ppm ($\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$) (s, 3H, CH ₃)	3,731 ppm ($(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$) (c, 6H, 2xCH ₃)
	4,339 (CH_3NO_2) (s, 3H, CH ₃)	4,339 (CH_3NO_2) (s, 3H, CH ₃)

Reakcje metylowania CDI (1 równoważnik molowy, 0,5 mmola, 81 mg) prowadziłam w nitrometanie (1 ml). W przypadku metylowania siarczanem dimetylu użyłam dwukrotny nadmiar (2 równoważniki molowe, 1 mmol, 47 μl) tego reagenta. Postęp reakcji metylowania obserwowałam wykorzystując protonowy rezonans magnetyczny ^1H NMR. Po 10 minutach można było zaobserwować tworzenie się bismetylowego N,N'-karbonyldiimidazolu, jednak nadal pozostawał nieprzereagowany CDI, dlatego też dodałam kolejne 2 równoważniki molowe siarczanu dimetylu. Po godzinie na podstawie zrobionego widma ^1H NMR można było zaobserwować całkowite metylowanie CDI z jednoczesnym utworzeniem N,N'-dimetylokarbonyldiimidazolu. Sygnał pochodzący od grup metylowych N,N'-dimetylokarbonyldiimidazolu wykazywał przesunięcie na widmie ^1H NMR przy 3,93 ppm. Taką samą reakcję metylowania CDI przeprowadziłam używając jako reagenta metylującego trifluorometanosulfonianu metylu. W tym przypadku wystarczył dwukrotny nadmiar $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$, aby nastąpiło całkowite metylowanie CDI, jak również czas potrzebny do zajścia reakcji był znacznie krótszy. Utworzenie N, N'-dimetylokarbonyldiimidazolu nastąpiło już po 5 minutach. Sygnał pochodzący od grup metylowych N,N'-dimetylokarbonyldiimidazolu wykazywał przesunięcie na widmie ^1H NMR przy 3,99 ppm.

Po sprawdzeniu jak przebiegają reakcje metylowania na związku wzorcowym (CDI) podjęłam próby metylowania imidazolidu MeNPoc (**42**) wykorzystując oba reagenty metylujące ($\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ i $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$), jak również jako środowiska reakcji użyłam kilku innych rozpuszczalników.

Pierwsze próby metylowania MeNPocI (**42**) za pomocą trifluorometanosulfonianu metylowego czy siarczanu dimetylu prowadziłam w acetonitrylu. Można było zaobserwować, że cały imidazolid α -metylo-6-nitropiperonyloksylowy (**42**) nie przekształcił się w jego aktywną formę metylową, a reakcja bardzo rozciągnęła się w czasie (3 godziny). Okazało się, że reakcja metylowania prowadzona w nitrometanie będzie znacznie szybciej, gdyż użycie innych rozpuszczalników aprotycznych nie tylko spowalnia reakcję N-metylowania MeNPocI, ale także prowadzi do ubocznych reakcji czynnika metylującego np. z rozpuszczalnikiem. Przeprowadziłam również reakcje metylowania MeNPocI za pomocą $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ w DMF. W rozpuszczalniku tym reakcja metylowania przebiega znacznie wolniej, po 2 godzinach można było zaobserwować 60% przereagowania MeNPocI (**42**) (analiza ^1H NMR), dlatego też uznałam, że DMF nie jest odpowiednim rozpuszczalnikiem dla badanej reakcji metylowania.

We wszystkich reakcjach analiza TLC nie była odpowiednim sposobem analizy przebiegu reakcji metylowania MeNPocI (**42**), gdyż tworzący się **43** jako reaktywny czynnik acylujący, ulegał najprawdopodobniej szybkiej hydrolizie i ostatecznie mogłam, zaobserwować tylko obecność alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego. Chcąc się upewnić, że otrzymałam właściwy produkt przebieg reakcji obserwowałam wykorzystując do tego celu widma ^1H NMR.

Reakcje prowadzone w nitrometanie przebiegały bardzo szybko i wydajnie. W pierwszej kolejności przeprowadziłam reakcję metylowania MeNPocI za pomocą siarczanu dimetylu. Gdy użyłam równomolowych ilości MeNPocI i $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$, reakcja metylowania nigdy nie zachodziła do końca, dlatego też w przypadku tego reagenta stosowałam dość duży jego nadmiar (ok. czterokrotny). W takim przypadku można było zaobserwować całkowite metylowanie MeNPocI, jednak czas metylowania tym reagentem wynosił ok. 30 minut. Analiza ^1H NMR potwierdziła utworzenie N-metyloimidazolidu MeNPoc (**43**). Można było zaobserwować pojawienie się sygnału przy 4,33 ppm pochodzącego od grupy metylowej, przy atomie azotu pierścienia imidazolowego związku **43**. Chcąc, aby reakcje metylowania przebiegały znacznie szybciej wykorzystałam do tego celu trifluorometanosulfonian metylu. W tym celu przeprowadziłam reakcję metylowania MeNPocI za pomocą $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ w nitrometanie stosując równomolowe ilości wyjściowych substratów. W przypadku tak silnego reagenta metylującego jakim jest trifluorometanosulfonian metylu, reakcja metylowania przebiegała praktycznie natychmiast. Przebieg reakcji metylowania analizowałam za pomocą ^1H NMR. Widma ^1H NMR wykonałam po 30 sekundach, 1 min., 2 min., 4 min. oraz 16 min.

Już po 30 sekundach można było zaobserwować całkowite metylowanie MeNPocI. Można było zaobserwować jednocześnie zanikanie sygnału grupy metylowej czynnika metylującego i pojawienie się sygnału grupy metylowej przy atomie azotu pierścienia imidazolowego związku MeNPocIMe⁺X⁻ (**43**).

Stwierdziłam, że do metylowania można wykorzystać obok trifluorometanosulfonianu metylowego (CF₃SO₃CH₃), także znacznie tańszy siarczan dimetylu ((CH₃O)₂SO₂), chociaż ten pierwszy reagent metylujący reaguje kilkakrotnie szybciej.

Przesunięcia chemiczne poszczególnych protonów substratu czyli MeNPocI, jak również jego N-metylowej pochodnej umieszczono w tabeli 5.

Tabela 5. Metylowanie MeNPoc za pomocą CF₃SO₃CH₃

MeNPocI	MeNPocI ⁺ - CH ₃ metylowanie CF ₃ SO ₃ CH ₃
8,156 ppm (s, 1H, CH)	9,880 ppm (s, 1H, CH)
7,532 ppm (s, 1H, CH)	7,470 ppm (s, 1H, CH)
7,431 ppm (m, 1H, CH)	7,781 ppm (m, 1H, CH)
7,091 ppm (m, 1H, CH)	7,446 ppm (m, 1H, CH)
7,016 ppm (s, 1H, CH)	7,358 ppm (s, 1H, CH)
6,611 ppm (q, 1H, J=6,28, CH)	6,711 ppm (q, 1H, J=6,28, CH)
6,142 ppm (m, 2H, CH ₂)	6,141 ppm (m, 2H, CH ₂)
1,801 ppm (d, 3H, J=6,28, CH ₃)	1,877 ppm (d, 3H, J=6,28, CH ₃)
	4,130 ppm (s, 3H, CH ₃)
	4,121 ppm (CF ₃ SO ₃ CH ₃) (s, 3H, CH ₃)
	4,339 (CH ₃ NO ₂) (s, 3H, CH ₃)

Wiedząc, że trifluorometanosulfonian metylu jest bardzo silnym i efektywnym czynnikiem metylującym postanowiłam sprawdzić czy równie szybko i skutecznie zajdzie metylowanie, jeżeli do metylowania użyję 0,9 mmola CF₃SO₃CH₃ na 1 mmol MeNPocI, oraz rozcieńczę środowisko reakcji. W tym celu przeprowadziłam następującą próbę: imidazolid α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowy (30,5 mg; 0,1 mmola) rozpuściłam w 0,2 ml nitrometanu i dodałam 0,112 ml roztworu trifluorometanosulfonianu metylu w nitrometanie, który zawierał,

0,09 mmola $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ (10,18 μl). Już po 30 sekundach można było zaobserwować całkowite metylowanie MeNPocI (analiza $^1\text{H NMR}$). Stwierdziłam że, nawet po dodaniu czynnika metylującego rozpuszczonego w rozpuszczalniku (CH_3NO_2), co powoduje rozcieńczenie środowiska reakcji, nie ma to wpływu na szybkość i przebieg reakcji.

Z analizy widm $^1\text{H NMR}$ wynikało, że lepszym czynnikiem metylującym okazał się $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ niż $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$. Reakcja metylowania $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$ była zakończona dopiero po upływie 30 minut i to w przypadku stosowania dużego nadmiaru tego odczynnika, natomiast przy użyciu $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ reakcja zachodziła praktycznie natychmiast.

Zoptymalizowałam dwie procedury przygotowania metylowej pochodnej imidazolidu α -metylo-6-nitropiperonyloksylu. Optymalizacja reakcji metylowania dotyczyła reakcji metylowania za pomocą siarczanu dimetylu, jak również trifluorometanosulfonianu metylu.

Dla dalszego wykorzystania reagenta N-metyloimidazoliowego do wprowadzenia blokady 5'-MeNPoc konieczne jest użycie odczynnika, w którym nie ma już wolnego czynnika metylującego (TFMSMe, *ang.* magic methyl). Stwierdziłam, że jego dezaktywacja następuje w ciągu niespełna minuty w bezwodnej pirydynie, która jest zresztą stosowana jako środowisko reakcji blokowania grupy 5'-OH nukleozydu. Przeprowadziłam następującą próbę, aby sprawdzić jak reaguje pirydyna z czynnikiem metylującym. Rozpuściłam 5 μl $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$ w 100 μl nitrometanu i dodałam 25 μl pirydyny. Z analizy $^1\text{H NMR}$ można było zaobserwować, że metylowanie pirydyny zachodzi tak samo szybko, jak metylowanie MeNPocI. Przesunięcia chemiczne sygnałów pochodzących od pirydyny i soli N-metylopirydyniowej zamieściłam w tabeli 6.

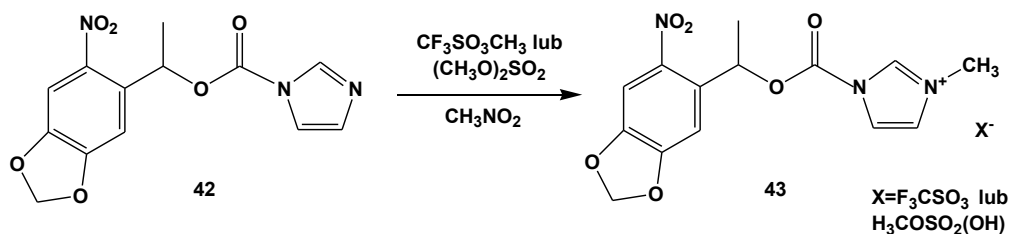
Tabela 6. Metylowanie pirydyny za pomocą $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$

Pirydyna	sól N-metylopirydyniowa
8,612 (m, 1H, CH_{orto})	8,881 (m, 1H, CH_{orto})
7,688 (m, 2H, CH_{para})	8,492 (m, 2H, CH_{para})
7,294 (m, 2H, CH_{meta})	8,047 (m, 2H, CH_{meta})
	4,485 (s, 3H, CH_3)

Fakt, że metylowanie pirydyny zachodzi tak samo szybko, jak metylowanie MeNPocI mogłam wykorzystać, aby dezaktywować pozostały, a nieprzereagowany podczas

metylowania trifluorometanosulfonian metylu. Wniosek ten mogłam wysnuć na podstawie próby jaką przeprowadziłam: do 15 mg MeNPocI rozpuszczonego w 100 μl nitrometanu dodałam 5 μl $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$. Właściwie od razu można było zaobserwować metylowanie **42** (analiza ^1H NMR), a oprócz tego nadal pozostawał nieprzereagowany $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{CH}_3$. Po 5 minutach dodałam 25 μl pirydyny, która natychmiast uległa reakcji z pozostałym, a nieprzereagowanym trifluorometanosulfonianem metylu.

Reasumując, opracowałam nowy reagent pozwalający z wyższymi wydajnościami od opisanych w literaturze, także patentowej, otrzymywać pochodne 5'-MeNPoc N-blokowanych nukleozydów (schemat 29).



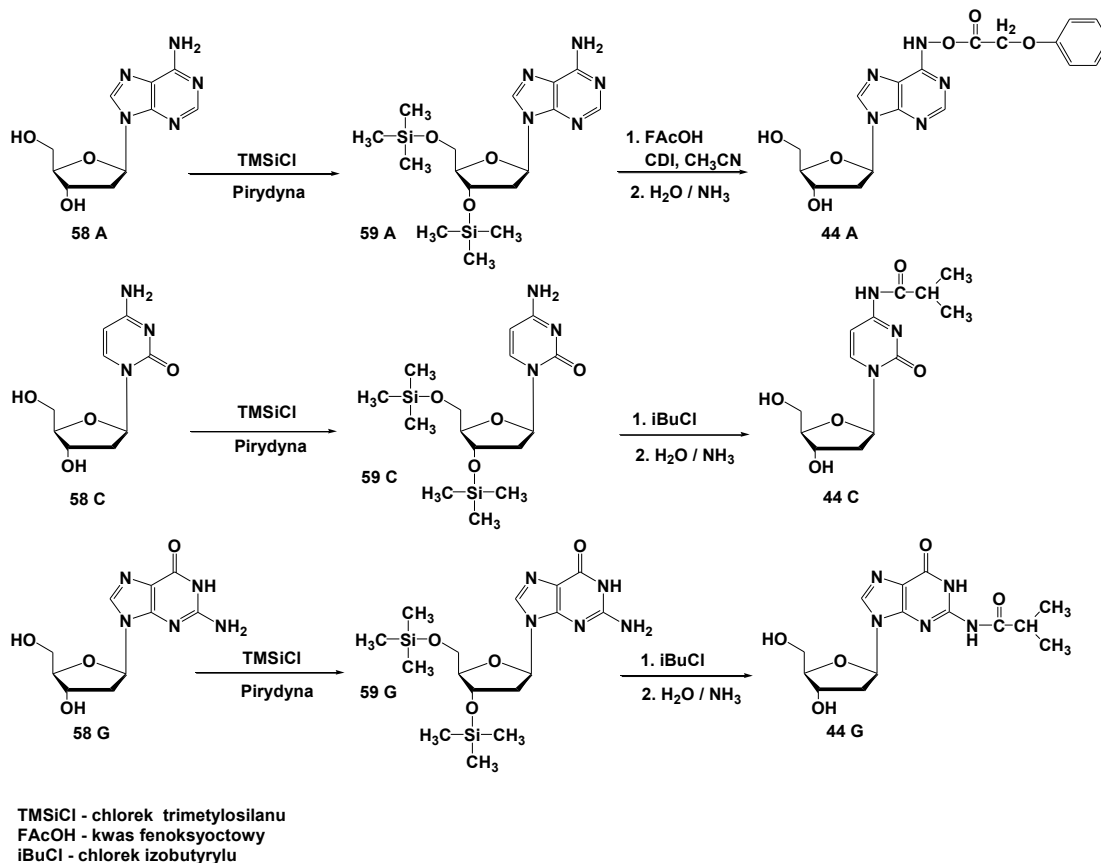
Schemat 29. Metylowanie pochodnej imidazolowej α -metylo-6-nitropiperonyloksylu

5.1.3. Synteza amidofosforynów nukleozydów blokowanych na funkcji 5'-OH grupą α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylową

Otrzymany reagent N-metyloimidazoliowy **43** użyłam do syntezy blokowanych grupą fotolabilną amidofosforynów nukleozydowych. Zestawienie grup N-ochronnych kompatybilnych z fotolabilną grupą typu o-nitrobenzylowego (5'-O-MeNPoc) przedstawia się następująco dA^{FAc} , dC^{iBu} , dG^{iBu} , dT . Takie grupy ochronne grup aminowych na zasadach są wymagane, kiedy myślimy o zastosowaniu fotolabilnej grupy ochronnej na funkcji 3' lub 5' nukleozydu.^{213;215;220}

Zasady heterocykliczne jednostek amidofosforynowych wykorzystanych w syntezie oligonukleotydów wymagają ochrony grup egzoaminowych stanowiących potencjalne centra reaktywne w trakcie przyłączania kolejnych amidofosforynów. Blokady grup egzoaminowych są trwałe we wszystkich warunkach reakcji stosowanych w syntezie DNA. Usuwa się je postsyntetycznie działając stężonym wodnym roztworem amoniaku w 50°C. Najczęściej

stosowanymi do tego celu grupami pozostają grupa benzoilowa dla reszty adeniny i cytozyny oraz grupa izobutyrylowa dla reszty guaniny.



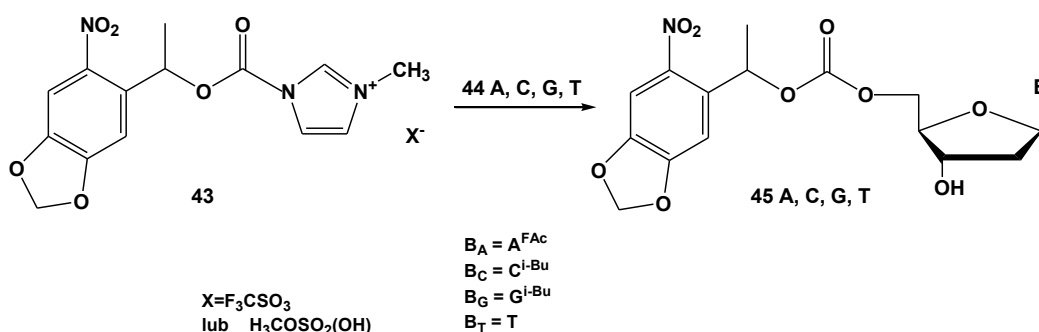
Schemat 30. Synteza blokowanych na zasadzie nukleozydów

Chcąc uzyskać amidofosforyny nukleozydów blokowanych grupą fotolabilną MeNPoc, która to grupa będzie odblokowana pod wpływem światła, należało zastosować w przypadku adeniny i cytydyny inne blokady grup egzoaminowych. Cytydina, nie może być chroniona blokadą benzoilową, gdyż ulega fotodegradacji podczas naświetlania światłem ultrafioletowym o długości fali wymaganej do odblokowania grupy MeNPoc. Dlatego też do ochrony funkcji egzoaminowej użyłam grupę izobutyrylową.

W pierwszej kolejności uzyskałam odpowiednio blokowane nukleozydy dA^{FAc} , dC^{iBu} , dG^{iBu} (schemat 30). Nukleozydy **58 A**, **C**, **G** zablokowałam na funkcji 3'-OH i 5'-OH grupą trimetylosililową w celu uniknięcia reakcji ubocznych z udziałem grup hydroksylowych. Następnie zablokowane nukleozydy **59 A**, **C**, **G** poddałam reakcji z kwasem fenoksyoctowym lub chlorkiem izobutyrylu, aby wprowadzić odpowiednie grupy blokujące na funkcję

egzoaminową. Na ostatnim etapie, w reakcji hydrolizy odblokowałam funkcje 3'-OH i 5'-OH nukleozydu uzyskując oczekiwane produkty **44 A, C, G**.

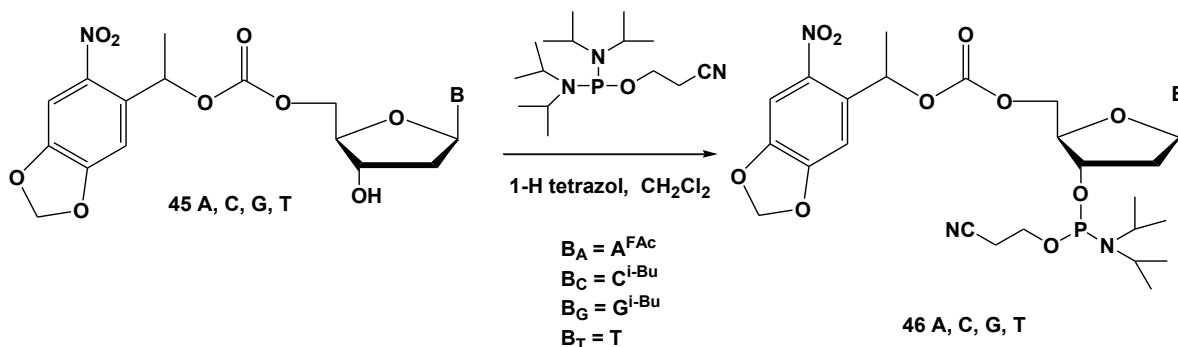
Następnym krokiem było otrzymanie pochodnych 5'-MeNPoc wszystkich czterech deoksynukleozydów dA^{FAc}, dC^{iBu}, dG^{iBu}, dT. W pierwszym etapie wytworzyłam N-metyloimidazolid α -metylo-6-nitropiperonylowy (**43**), który miał posłużyć do wprowadzenia grupy MeNPoc na funkcję 5'-OH nukleozydu. Po wygenerowaniu **43** w celu dezaktywacji pozostałego, a nieprzereagowanego czynnika metylującego (trifluorosulfonianu metylu lub siarczanu dimetylu) dodawałam pirydynę i pozostawiałam reakcję na 15 minut. Po tym czasie do reakcji dodawałam odpowiednio blokowany nukleozyd **44 A, C, G** i **44 T**. Reakcje otrzymywania **45 A, C, G, T** prowadzone były w pirydynie, w temperaturze pokojowej. We wszystkich przypadkach produkt otrzymywałam już po jednej godzinie (schemat 31).



Schemat 31. Synteza nukleozydów blokowanych na funkcji 5'-OH grupą fotolabilną MeNPoc

Następnie otrzymane pochodne nukleozydowe **45 A, C, G, T** zostały poddane reakcji z 2-cyanoetylo N,N,N',N'-tetraizopropylodiamidofosforynem w celu uzyskania odpowiednich 3'-amidofosforynów **46 A, C, G, T** gotowych do zastosowania w syntezie scalonych bibliotek oligonukleotydowych (schemat 32) metodami fotolitograficznymi. Reakcje otrzymywania **46 A, C, G, T** przebiegały w następujący sposób: odpowiedni nukleozyd blokowany na funkcji 5'-OH grupą MeNPoc **45 A, C, G, T** rozpuściłam w chlorku metylenu. W przypadku **45A** związek rozpuściłam w mieszaninie chlorek metylenu / acetonitryl (1 : 1). Następnie dodawałam 2-cyanoetylo N,N,N',N'-tetraizopropylodiamidofosforyn i 1-H tetrazol (w trzech porcjach). Reakcje prowadzone były w temperaturze pokojowej. Po godzinie nastąpiło powstanie amidofosforynów **46 A, C, T**, natomiast reakcja otrzymywania **46 G** przedłużyła się do dwóch godzin. Uzyskane amidofosforyny **46 A, C, G, T** oczyszczałam na kolumnie

chromatograficznej. Po oczyszczeniu poddałam produkty liofilizacji z benzenu. Proces ten ma na celu usunięcie resztek rozpuszczalników, które mogą podczas dłuższego przechowywania powodować rozpad związków albo zakłócać syntezę oligonukleotydów z wykorzystaniem amidofosforynów. Ich miejsce „zajmuje” mniej lotny i nie powodujący destrukcji związku benzen.



Schemat 32. Synteza amidofosforynów nukleozydowych blokowanych grupą fotolabilną MeNPoc

Uzyskane amidofosforyny (**46 A, C, G, T**) były mieszaniną diastereoizomerów, ponieważ podczas fosfitylowania powstaje nowe centrum chiralne znajdujące się na atomie fosforu. Otrzymane związki były charakteryzowane za pomocą ^{31}P NMR (Tabela 7). W tabeli zamieściłam również wydajności uzyskanych amidofosforynów **46 A, C, G, T**.

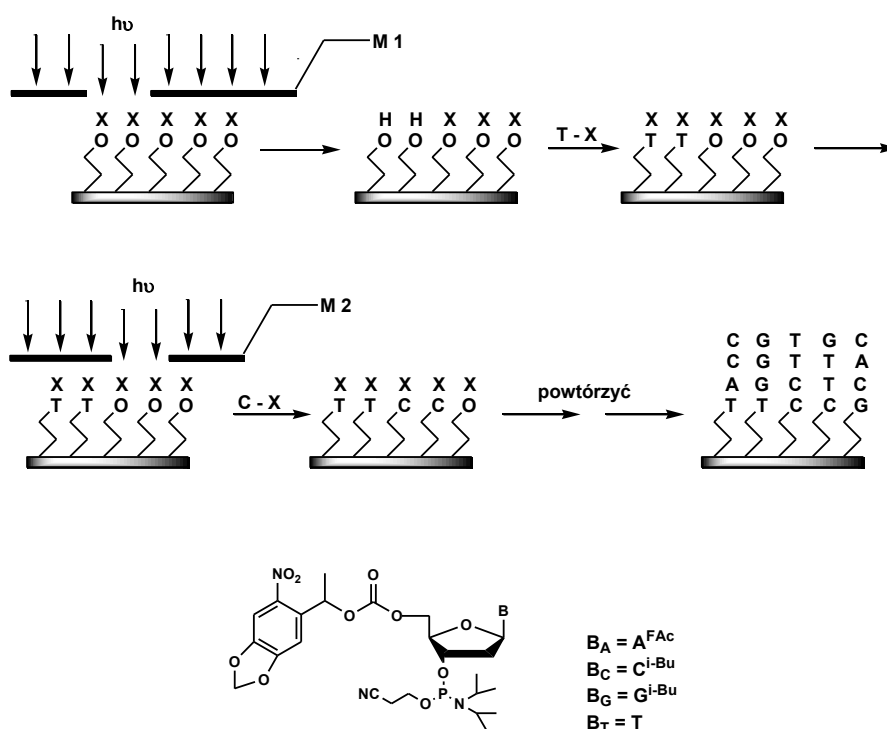
Tabela 7. Charakterystyka otrzymanych 3' amidofosforynów nukleozydów blokowanych na funkcji 5' grupą fotolabilną MeNPoc

związek	46 A	46 C	46 G	46 T
wydajność	46,5%	89%	76%	86%
^{31}P NMR	+149,23	+149,48	+148,88	+149,01
(ppm)	+149,14	+149,21	+148,72	+148,79

5.1.4. Potwierdzenie fotolabilności grupy α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej

Otrzymane amidofosforyny nukleozydowe (nukleozydy) blokowane na funkcji 5'-OH grupą fotolabilną α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylową są stosowane do budowy bibliotek kombinatorycznych.

Syntezę i-SOCL prowadzi się na podłożu szklanym funkcjonalizowanym za pomocą bis (2-hydroksyetylo)aminopropylotrietoksyilanu.²²¹ Po przyłączeniu łącznika z fotolabilną blokadą grupy hydroksylowej (α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonyl, MeNPoc) przeprowadza się naświetlenie przez odpowiednią maskę. W Affymetrix wykorzystuje się do tego celu maszynę litograficzną, taką jaka jest używana w produkcji elektronicznych obwodów scalonych.²²¹ Następuje odblokowanie grup ochronnych łącznika w miejscach naświetlania. Następnie całą płytę poddaje się reakcji z odpowiednim 3'-O-(2-cyanoetylo-N,N-diizopropylamidofosforynem) 5'-O-MeNPoc-N-acylo-2'-deoksynukleozydu. W kolejnym kroku, po naświetleniu płyty przez następną maskę przyłącza się następny amidofosforyn nukleozydu.¹ Takie postępowanie prowadzi ostatecznie do syntezy i-SOCL o z góry założonej strukturze (Rys. 5). Należy podkreślić, że postępowanie to ma wszelkie cechy syntezy kombinatorycznej, tzn. jednocześnie prowadzi się odblokowanie, a potem przyłączanie kolejnych amidofosforynów we wszystkich wybranych miejscach otrzymanej biblioteki SOCL. Poprzez łączenie etapów wspólnych synteza biblioteki oligonukleotydomowej z 4 nukleotydów, w której najdłuższy oligonukleotyd ma długość n nie wymaga więcej niż 4 razy n kroków syntetycznych.



Rys. 5 Schemat syntezy i-SOCL metodą amidofosforynową z wykorzystaniem fotolabilnej grupy ochronnej (MeNPoc) w położeniu 5'. Grupy fotolabilne X usuwane są poprzez naświetlenie przez odpowiednie maski M^1 i M^2

W moich badaniach chciałam sprawdzić właściwości fotochemiczne otrzymanej grupy α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej, które to są już opisane w literaturze.^{198;215}

Przeprowadziłam naświetlenie nukleozydów blokowanych na funkcji 5' grupą MeNPoc (**45 A, C, G, T**) przy użyciu wysokociśnieniowej rtęciowej lampy łukowej o mocy 200 W. Lampa ta emituje promieniowanie w całym zakresie światła ultrafioletowego.

Wiadomo, że kancerogeny i teratogeny wpływ promieniowania ultrafioletowego jest spowodowany zmianą struktury DNA odpowiedzialnego za przekazywanie informacji genetycznej. Maksimum absorpcji dla kwasów nukleinowych występuje przy $\lambda = 260$ nm. Nawet niewielka modyfikacja w nici DNA, tj. zmiana 1 na 10^7 par zasad, może wywołać znaczące efekty biologiczne. Za absorpcję promieniowania ultrafioletowego odpowiedzialne są zasady purynowe i pirymidynowe, w których zachodzą przejścia elektronowe typu: $\pi\text{-}\pi^*$ i $n\text{-}\pi^*$. Przejście elektronowe $n\text{-}\pi^*$ jest częściowo wzbronione, dlatego zachodzi w niewielkim stopniu, o czym świadczą niskie wartości molowych współczynników absorpcji. Naświetlanie kwasów nukleinowych promieniowaniem o długości fali $\lambda < 300$ nm powoduje, jak już wspomniano wzbudzenie reszt purynowych i pirymidynowych, w wyniku czego ulegają one różnym przemianom fotochemicznym. Do najważniejszych przemian zasad pirymidynowych należą: fotohydratacja, fotodimeryzacja i fotoaddycja prowadzące do utworzenia adduktów 4-4'. W celu wyeliminowania reakcji ubocznych, użyłam szkła pyreksowego. Szkło pochłania emitowane przez lampę promieniowanie o krótkiej długości światła, a przepuszcza promieniowanie od 320 nm. W moim przypadku jest to zakres wystarczający, gdyż grupa MeNPoc ulega odblokowaniu pod wpływem światła ultrafioletowego o długości fali $\lambda = 360$ nm.

W probówce Ependorfa umieszczałam 0,8 mg odpowiednich nukleozydów **45 A, C, G, T**. Następnie dodawałam 0,5 ml rozpuszczalnika. Naświetlania prowadziłam w metanolu lub dioksanie. Rozpuszczone związki poddałam naświetlaniu wysokociśnieniową rtęciową lampą łukową o mocy 200 W. Po 20 minutach naświetlania analiza TLC wykazała całkowite odblokowanie **45C**, z wytworzeniem odpowiedniego nukleozydu **44C**. W przypadku odblokowania **45A, G, T** konieczne było wydłużenie czasu naświetlania do jednej godziny, aby uzyskać odpowiednie nukleozydy **44A, G, T**.

W ten sposób potwierdziłam właściwości fotolabilne grupy α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej nukleozydów blokowanych na funkcji 5' grupą MeNPoc (**45 A, C, G, T**), otrzymanych na innej drodze niż jest to opisane w literaturze.^{198;215}

5.2. Modyfikacje metody fosfortriestrowej

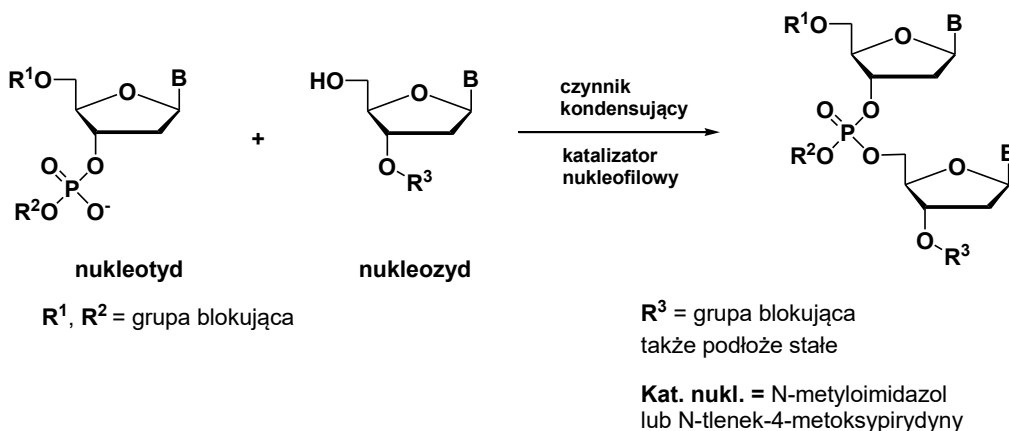
Zasadniczym etapem syntezy oligonukleotydów jest tworzenie wiązania internukleotydu. Obecnie w syntezie laboratoryjnej i w syntezie na skalę przemysłową (synteza antysensowych oligonukleotydów przez Isis Pharmaceuticals Inc., USA) najszerszej stosowana jest metoda amidofosforynowa. Jej wykorzystanie jest znacznie szersze niż dwóch innych metod, które opierają się na użyciu czynników kondensujących do wytworzenia wiązań internukleotydu, metody fosfortriestrowej i metody H-fosfonianowej.

W metodzie fosfortriestrowej, która jest ostatnio mniej popularna, niż amidofosforynowa użycie różnych czynników kondensujących i czynników fosforylujących w połączeniach z nukleofilowym atomem tlenu (np.: w 4-podstawionych N-tlenkach pirydyny), powoduje wzrost szybkości tworzenia wiązania internukleotydu. Zastosowanie tych katalizatorów w syntezie oligonukleotydów metodą fosfortriestrową na podłożu stałym pozwala zredukować czas 1 cyklu elongacji na podłożu polimerowym do 10 minut.

W moich próbach modyfikacji metody fosfortriestrowej postawiłam sobie następujące cele:

1. użycie nukleozydu zamiast nukleotydu;
2. synteza na podłożu stałym (opracowana modyfikacja ma być wykorzystana w wariantach syntezy na podłożu stałym)
3. uniezależnienie od kierunku syntezy łańcucha oligonukleotydu ($3' \rightarrow 5'$, ale także $5' \rightarrow 3'$).

Rozwiązania te odniosłam do syntezy metodą fosfortriestrową (schemat 33) na podłożu stałym z możliwością zastosowania fotolabilnych grup ochronnych.

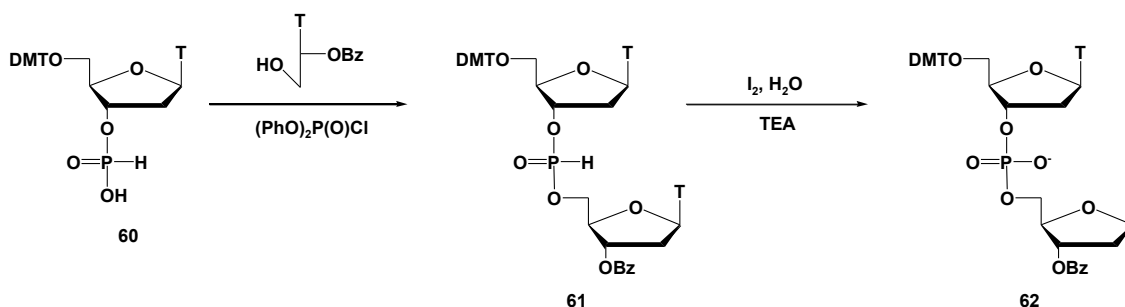


Schemat 33. Synteza oligonukleotydów metodą fosfortriestrową

5.2.1. Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym metoda H-fosfonianową

Zanim przystąpiłam do optymalizacji reakcji fosforylacji i kondensacji w metodzie fosfortriestrowej sprawdziłam możliwość zawiązania wiązania internukleotydu metodą H-fosfonianową.

W połowie lat 80-tych Garegg i współ.²²² oraz równolegle Matteucci i Froehler²²³ odnotowali, że 3'-O-H-fosfonian 5'-O-blokowanego deoksynukleozydu (**60**) ulega szybkiej reakcji z 3'-O-benzoylotymidyną w obecności czynnika aktywującego, takiego jak TPSCl, chlorek benzenosulfonylu, difenylchlorofosforan lub chlorek piwaloilu (schemat 34), w wyniku czego powstaje odpowiedni (3'→5') H-fosfonian dinukleozydu (**61**).



Schemat 34. Synteza oligonukleotydów metodą H-fosfonianową

W miarę rozwoju metody H-fosfonianowej, jako czynnik aktywujący zaczęto wykorzystywać prawie wyłącznie chlorek piwaloilu,²²⁴ a następnie chlorek adamantoilu.²²⁵ Pozwoliło to na automatyzację procedury syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym. Jej zaletą jest wyższa trwałość nukleozydowych prekursorów oraz brak konieczności blokowania grupy fosforynowej w trakcie syntezy. W metodzie H-fosfonianowej grupa 5'-hydroksylowa rosnącego łańcucha oligonukleotydu reaguje z 3'-H-fosfonianem nukleozydu aktywowanym za pomocą halogenku acylowego takiego jak chlorek piwaloilu. Proces utleniania do pochodnej fosforodiestrowej jest realizowany po zakończeniu syntezy całego łańcucha oligonukleotydu, jednocześnie w stosunku do wszystkich internukleotydujących wiązań H-fosfonianowych. Jako czynnik utleniający stosuje się roztwór jodu w obecności wody lub roztwór wodorotlenku tert-butyłowego. Pozostałe etapy cyklu syntetycznego są identyczne jak w metodzie amidofosforynowej za wyjątkiem etapu blokowania nieprzereagowanych grup 5'-hydroksylowych.

W moich badaniach sprawdziłam możliwość tworzenia wiązania internukleotydogo metodą H-fosfonianową w taki sposób, że etapy fosforylacji i kondensacji były rozdzielone. Wolną grupę hydroksylową rosnącego łańcucha oligonukleotydogo fosfonylowałam fosforynem difenylowym²²⁶⁻²²⁸ na podłożu stałym. Następnie przeprowadziłam reakcję hydrolizy grupy fenylovej 10 % wodnym roztworem pirydyny. Uzyskany H-fosfonian w reakcji kondensacji z nukleozydem wobec chlorku piwaloilu utworzył na podłożu stałym H-fosfoniano diester. Opis przeprowadzonej próby zamieściłam w tabeli 8. Do syntezy użyłam podłoże stałe niosące nukleozyd, takie jakie jest wykorzystywane do syntezy oligonukleotydogo. W kolumnie reakcyjnej umieściłam 10 mg podłoża „Primer” z załadowaną 5'-O-dimetoksytrytylotymidyną. Podłoże odtrytylowałam na syntetyzerze za pomocą 3% kwasu dichlorooctowego. Następnie przeprowadziłam reakcje fosforylacji i kondensacji (tabela 8).

Tabela 8. Synteza oligonukleotydogo na podłożu stałym metodą H-fosfonianową

Nr operacji	Funkcja	Objętość użytych reagentów [ml]	Czas [min]
1	Odtrytylowanie na syntetyzerze (101)* (3% kwas dichlorooctowy)		
2	Przemycie acetonitrylem	3 x 1	3
2	Fosforylacja: 0,5 M (PhO) ₂ P(O)H w pirydynie	2 x 0,5	2 x 5
3	Przemycie acetonitrylem	3 x 1	3
4	Hydroliza: Py-H ₂ O 9:1	0,5	30
5	Przemycie acetonitrylem, odwirowanie kolumny, przemycie acetonitrylem	3 x 1 3 x 1	3 3
6	Kondensacja: 0,1 M DMTrT w pirydynie 0,3 M chlorek piwaloilu w acetonitrylu	0,3 0,3	6
7	Przemycie acetonitrylem	3 x 1	3
8	Odtrytylowanie na syntetyzerze (82)* (3% kwas dichlorooctowy)		

* Odczyt względnej ilości kationu dimetoksytrytylowego (DMT⁺)

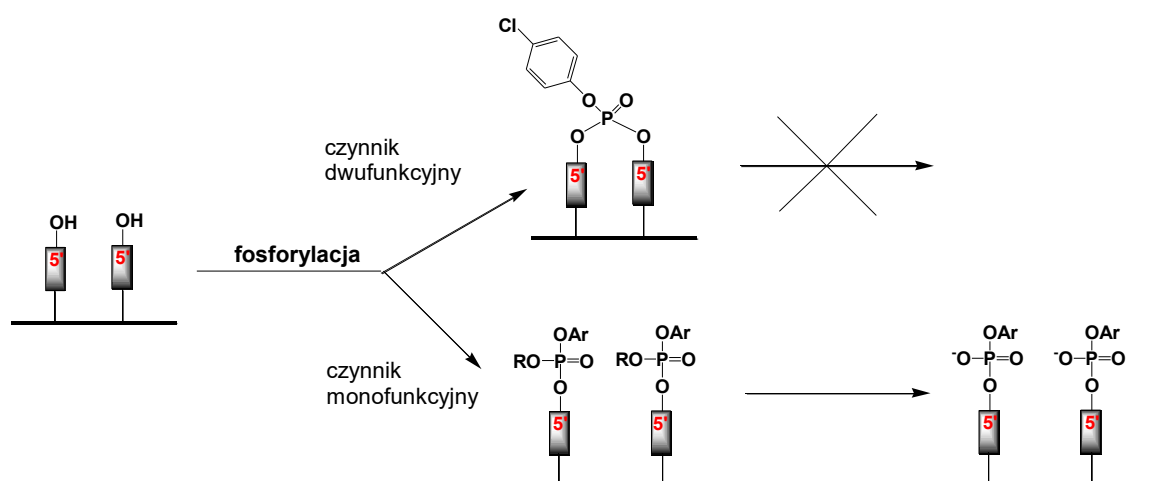
Przeprowadziłam kilka prób syntezy zmodyfikowaną metodą H-fosfonianową. Odstąpiłam jednak od prób wykorzystania metody H-fosfonianowej, ze względu na niestabilność w środowisku zasadowym H-fosfonianowych diestrowych oligonukleotydogo. Co więcej, trudno było zoptymalizować czas potrzebny do odblokowania grupy fenylovej z utworzonego wiązania H-fosfonianowego, co prowadziło do obniżenia wydajności procesu. Również

użycie bifunkcyjnego czynnika fosfonylującego, fosforanu difenylowego mogło powodować obniżenie wydajności reakcji fosforylacji, poprzez utworzenie H-fosfonianowych pirofosforanów.

5.2.2. Fosforylacja. Otrzymywanie monofunkcyjnych reagentów fosforylujących

Myśląc o otrzymaniu oligonukleotydu na chipie chciałam zapewnić rosnącemu łańcuchowi oligonukleotydu jak największą trwałość. Z tego powodu zrezygnowałam z dalszych prób metodą H-fosfonianową, a zwróciłam się w stronę metody fosfortriestrowej. Po pierwsze, należało rozwiązać problem wydajnej fosforylacji. Fosforylacja nukleozydowych grup hydroksylowych będzie odbywała się na podłożu stałym, dlatego ważne jest, aby była ona jak najbardziej wydajna. Należy użyć monofunkcyjnego reagentu fosforylującego, który z racji swej monofunkcyjności nie może spiąć dwóch sąsiadujących łańcuchów oligonukleotydowych.

W pierwszej kolejności postawiłam sobie pytanie, jaki powinien być monofunkcyjny reagent fosforylujący, aby reakcje przebiegały jak najbardziej efektywnie i wydajnie. Po pierwsze powinien być dostatecznie reaktywny, aby przereagować z grupą 3'-OH (lub 5'-OH) deoksyrybonukleotydu. Po drugie łatwe powinno być przekształcenie uzyskanego fosfortriestru do blokowanego fosfordiestru. Fosfordiester powinien na tym etapie nieść grupę ochronną, którą będzie można skutecznie odblokować po zakończeniu syntezy oligonukleotydu.



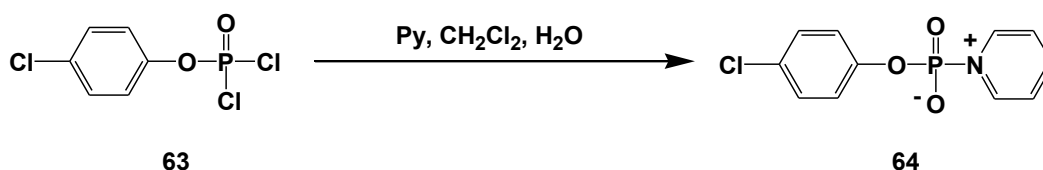
Schemat 35. Fosforylacja nukleozydowych grup hydroksylowych czynnikiem dwufunkcyjnym i monofunkcyjnym

Jeżeli do fosforylacji użyłabym czynnika dwufunkcyjnego, mogłoby to doprowadzić do spięcia ze sobą, dwóch grup hydroksylowych sąsiadujących ze sobą łańcuchów. W ten sposób dalsze wydłużenie łańcucha nie byłoby możliwe (schemat 35). Dlatego też, zwróciłam się w stronę użycia monofunkcyjnych reagentów fosforylujących. W tym przypadku każda grupa hydroksylowa przyłączonego do podłoża nukleozydu ulegnie reakcji fosforylacji. W następnej kolejności będzie można odblokować grupę ochronną, bądź za pomocą zasady lub wykorzystując światło UV w przypadku użycia czynnika monofunkcyjnego z grupą fotolabilną. Powstanie wówczas fosfordiester (schemat 35), który następnie w reakcji kondensacji z nukleozydem może wytworzyć wiązanie internukleotyde.

Opracowałam syntezę kilku monofunkcyjnych reagentów fosforylujących, które z racji swej monofunkcyjności nie są zdolne do spięcia dwóch sąsiadujących na podłożu stałym łańcuchów oligonukleotydocy. Do otrzymania tych czynników wykorzystałam reagent fosforylujący Efimova (p-chlorofenilo pirydynylo fosforan (**64**)). Użycie reagentów w następujących stosunkach:

p-chlorofenilo dichlorofosforan (63)	1 mmol;
pirydyna	6 mmoli;
dichlorometan	1,5 ml;
woda	0,9 mmola (16 µl);

pozwalają na szybkie przygotowanie czynnika fosforylującego z wysoką wydajnością (schemat 36).



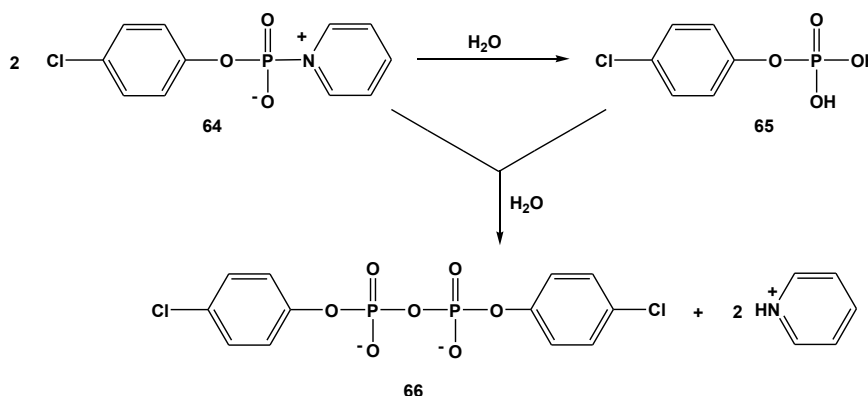
Schemat 36. Czynniki fosforylujący Efimova

Stosunek ilości reagentów określiłam przeprowadzając szereg reakcji, w których zmieniałam ilości reagentów (Tabela 9).

Tabela 9. Optymalizacja syntezy czynnika Efimova.

Nr	p-chlorofenylo dichlorofosforan [mmol]	pirydyna [mmol]	chlorek metyleny [ml]	acetonitryl [ml]	woda [mmol]	produkty uboczne %
1	1	4	1,7		1	31
2	1	4	1,7		0,7	22
3	1	4		1,7	1	32
4	1	6	1,5		1	20
5	1	6		1,5	1	17
6	1	6	1,5		0,9	13

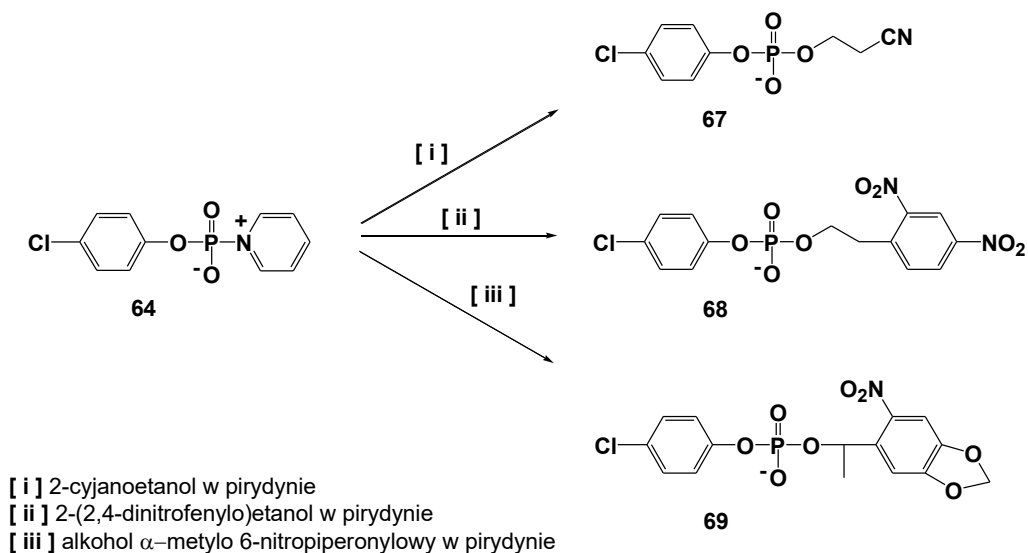
Stosowałam także rozpuszczalniki inne niż pirydyna do reakcji wytworzenia czynnika Efimova: chlorek metylenu i acetonitryl. Stosunek ilości użytej wody do p-chlorofenylo dichlorofosforanu (**63**), chciałam zoptymalizować, w celu uniknięcia tworzenia się produktów ubocznych, które towarzyszyły powstaniu p-chlorofenylo pirydynylo fosforanu (**64**) (schemat 37). Wytworzony p-chlorofenylo pirydynylo fosforan w widmie ^{31}P NMR wykazywał przesunięcie pochodzące od atomu fosforu przy $-10,86$ ppm.

**Schemat 37.** Reakcje uboczne towarzyszące tworzeniu czynnika fosforylującego Efimova

Próby optymalizacji czynnika Efimova doprowadziły do ograniczenia tworzących się produktów ubocznych, p-chlorofenylo fosforanu (**65**) i bis(p-chlorofenylowego) pirofosforanu (**66**) do 13 %. Przebieg reakcji obserwowałam za pomocą widm ^{31}P NMR, porównując integrację tworzącego się produktu **64** i produktów ubocznych **65** i **66**.

Następnie przystąpiłam do otrzymania monofunkcyjnych reagentów fosforylujących. Wiadomo, że grupa 2-cyanoetylowa jest dobrą grupą odchodzącą, usuwaną na końcu syntezy w łagodnych zasadowych warunkach. Podczas jej odblokowania następuje reakcja β -eliminacji. Reakcja otrzymywania p-chlorofenylo 2-cyanoetylo fosforanu (**67**) była reakcją

sprawdzając, jak będzie przebiegała reakcja kondensacji wytworzonego monofunkcyjnego czynnika z nukleozydem, w nowym wariantcie syntezy oligonukleotydów metodą fosfortriestrową. W pierwszej kolejności wytworzyłam p-chlorofenylo pirydynylo fosforan (**64**) wykorzystując zoptymalizowaną syntezę tego związku. Związek **64** w reakcji z 2-cyanoetanolem w bezwodnej pirydynie utworzył p-chlorofenylo 2-cyanoetylo fosforan (**67**) z wydajnością 67% (schemat 38). Otrzymany związek **67** oczyściłam na kolumnie chromatograficznej w fazie odwróconej (aceton-woda). Produkt **67** analizowałam wykorzystując fosforowy rezonans magnetyczny. Atom fosforu otrzymanego czynnika **67** wykazywał na widmie przesunięcie przy $\delta = -5,28$ ppm. W widmie sprzężonym obserwowałam sygnał w postaci trypletu. Sprzężenie pochodziło od grupy metylenowej znajdującej się w sąsiedztwie atomu fosforu p-chlorofenylo 2-cyanoetylo fosforanu (**67**).



Schemat 38. Reakcje otrzymywania monofunkcyjnych reagentów fosforujących

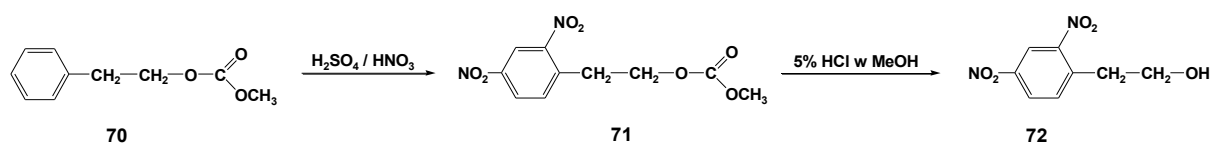
Zainteresowałam się orto i para podstawionymi pochodnymi β -fenyloetanolu, które wchodzi w skład grup blokujących w metodzie fosfortriestrowej.^{14;23;24;153;155;160} Z badań Pfleiderera wynika, że pochodna 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowa jest bardziej labilna niż grupa 2-cyanoetylowa.^{23;157;159;176;229}

Odblokowaniu grup, których mechanizm odblokowania związany jest z bezpośrednim atakiem nukleofilowym na atom fosforu, często towarzyszy rozerwanie wiązania internukleotydowego (ang. wrong break-down). W metodzie fosfortriestrowej użycie β -eliminacyjnych grup ochronnych na funkcji fosforanowej uważa się za ulepszenie tej

metody. Związane jest to z przekształceniem fosforotriestru do fosfordiestru bez nukleofilowego ataku na atom fosforu, co mogłoby spowodować rozerwanie wiązania internukleotydowego. Do takich grup ochronnych należą: grupa β -cyjanoetylowa (CE), metylowe pochodne grupy β -cyjanoetylowej, grupy β -(alkilosylfonylo)- i β -(arylosulfonylo)etylowe. Grupy te są stosunkowo czułe na warunki zasadowe i ich odblokowanie następuje już pod wpływem działania amoniaku. Grupa 2-(4-nitrofenylo)etylowa (NPE), która jest grupą bardziej labilną, jest odblokowana za pomocą DBU (1,8-diazabicyclo [5.4.0]undec-7-ene).¹⁵⁶

W swoich badaniach wykorzystałam grupę 2-(2,4-dinitrofenylo)etylową do uzyskania nowego monofunkcyjnego czynnika fosforylującego. Przez wprowadzenie do pierścienia kolejnej grupy nitrowej, wzrasta jej labilność w warunkach zasadowych.

W pierwszej kolejności zsyntezowałam 2-(2,4-dinitrofenylo)etanol, który miał posłużyć do wytworzenia nowego czynnika fosforylującego (schemat 39).



Schemat 39. Synteza alkoholu 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowego¹⁵⁷

Produktem wyjściowym w tej reakcji był octan fenyletylu (**70**), który poddałam reakcji nitrowania w mieszaninie stężonych kwasów azotowego i siarkowego (-10°C). W celu poprawnego nitrowania pierścienia fenylowego należało użyć świeżo przygotowany dymiący kwas azotowy. W następnej kolejności uzyskany związek **71** poddałam reakcji kwasowej hydrolizy w celu usunięcia grupy estrowej. Produkt końcowy **72** po wstępnym oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej uzyskałam z wydajnością 55% po krystalizacji.

Kolejnym etapem było otrzymanie p-chlorofenilo pirydinylo fosforanu (**64**) który, w reakcji z 2-(2,4-dinitrofenylo)etanolem (**72**) w pirydynie utworzył oczekiwany p-chlorofenilo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo fosforan (**68**) z 68% wydajnością (schemat 38). Powstający produkt **68** analizowałam wykorzystując fosforowy rezonans magnetyczny ^{31}P NMR. Atom fosforu otrzymanego czynnika **68** wykazywał na widmie przesunięcie przy $\delta = -5,70$ ppm. W widmie sprzężonym obserwowałam sygnał w postaci trypletu. Sprzężenie pochodziło od grupy

metylenowej znajdującej się w sąsiedztwie atomu fosforu p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo fosforanu (**68**).

Jak wcześniej wspomniałam, opracowany przeze mnie nowy wariant syntezy oligonukleotydów metodą fosfortriestrową będzie również zastosowany w wariacie syntezy z użyciem fotolabilnych grup ochronnych. Dlatego też, należało przygotować monofunkcyjny reagent fosforylujący z fotolabilną grupą ochronną. W moim przypadku jest to grupa α -metylo-6-nitropiperonylowa. Synteza alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego (**41**) użytego do blokowania funkcji fosforanowej nukleotydu została opisana w rozdziale 5.1.1.²³⁰ Wiadomo, że grupy fotolabilne mogą być zastosowane jako blokady terminalnej funkcji fosforanowej w czasie syntezy oligonukleotydu, stąd pomysł uzyskania p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo fosforanu (**69**). W pierwszej kolejności wytworzyłam p-chlorofenylo pirydynylo fosforan (**64**), który w reakcji z alkoholem α -metylo-6-nitropiperonylowym (**41**) w pirydynie utworzył oczekiwany p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylowy fosforan (**69**) z 70 % wydajnością (schemat 38). Związek **69** analizowałam za pomocą ³¹P NMR. Na widmie można było zaobserwować przesunięcie pochodzące od atomu fosforu produktu **69** przy – 5,90 ppm. W widmie sprzężonym obserwowałam sygnał w postaci dubletu. Sprzężenie pochodziło od grupy metinowej znajdującej się w sąsiedztwie atomu fosforu p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo fosforanu (**69**).

5.2.2.1. Wytwarzanie wiązania fosfortriestrowego z wykorzystaniem monofunkcyjnych reagentów fosforylujących

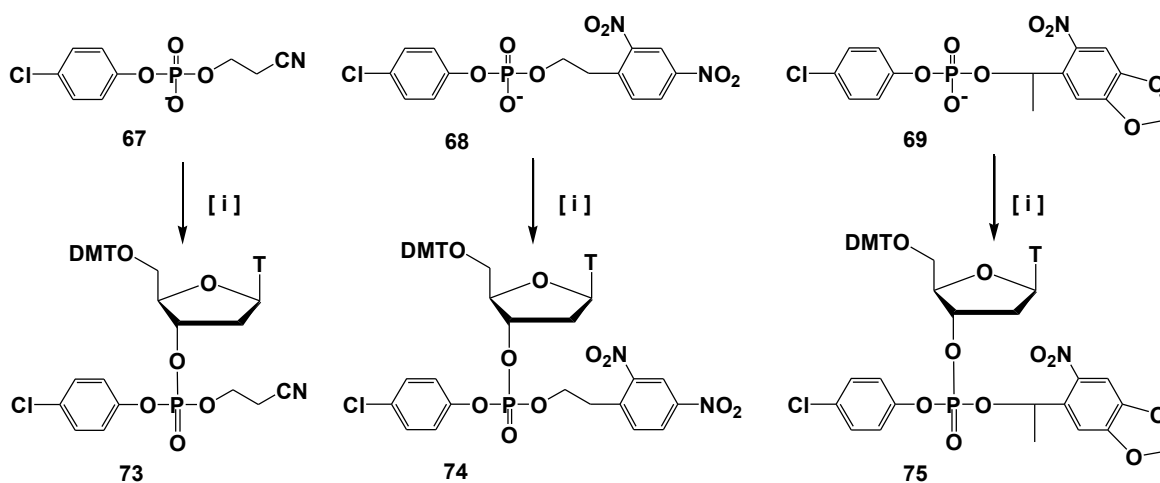
Następnym krokiem było sprawdzenie czy wytworzone monofunkcyjne czynniki fosforylujące **67**, **68**, **69** utworzą z nukleozydem wiązanie fosfortriestrowe, jak szybko i czy będą to reakcje przebiegające ilościowo. Do prób wytworzenia wiązania fosfortriestrowego jako związek modelowy użyłam 5'-O-dimetoksytrytylotymidynę (**5'-DMTrT**).

W pierwszej kolejności podjęłam próbę wytworzenia wiązania fosfortriestrowego wykorzystując p-chlorofenylo 2-cyanoetylo fosforan (**67**) (schemat 40). Związek **67** w reakcji z 5'-DMTrT w pirydynie w obecności N-tlenku 4-metoksyperydydy, jako katalizatora nukleofilowego, oraz TPSCl utworzył p-chlorofenylo 2-cyanoetylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforan (**73**). Należy pamiętać o kolejności dodawania substratów, aby uniknąć powstania pirofosforanu. W przypadku utworzenia się

pirofosforanu, powinno się umieć go aktywować i przekształcać dalej w rosnący oligonukleotyd, aby uzyskać pożądane fosforotriestry z jak najwyższymi wydajnościami. Ten problem zostanie poruszony w dalszej części „Badań własnych” (rozdział 5.2.3.). Przeprowadziłam następujące doświadczenie, które doprowadziło do powstania wiązania fosforotriestrowego **73**. W pierwszej kolejności do p-chlorofenylo 2-cyanoetylo fosforanu (**67**) dodałam 5'-DMTrT, N-tlenek 4-metoksypirydyny w pirydynie (5'-DMTrT i N-tlenek 4-metoksypirydyny odparowałam dwukrotnie z bezwodną pirydyną). W następnej kolejności dodałam TPSCl, co jest ważne, aby zmniejszyć ilość pirofosforanu powstającego podczas reakcji kondensacji. Przebieg reakcji kontrolowałam za pomocą TLC. Analizę otrzymanego produktu **73** przeprowadziłam również, wykorzystując do tego celu fosforowy rezonans magnetyczny ^{31}P NMR. Na widmie można było zaobserwować przesunięcia chemiczne sygnałów, które towarzyszyły wytworzonemu wiązaniu fosforotriesterowemu **73**. Powstały dwa sygnały, przy $-7,42$ ppm i $-7,71$ ppm. W widmie sprzężonym obserwowałam sygnały w postaci dwóch kwartetów. Sprzężenia pochodziły od ugrupowania metylenowego grupy 2-cyanoetylowej i od atomu wodoru 3' pierścienia cukrowego tymidyny.

Tę samą procedurę wykorzystałam do uzyskania p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**74**) (schemat 40). Również w tym przypadku potrafiłam wytworzyć wiązanie fosforotriestrowe, którego tworzenie mogłam obserwować za pomocą TLC, jak również na widmie fosforowego rezonansu magnetycznego. W tym przypadku przesunięcia chemiczne sygnałów, jakie towarzyszyły powstaniu p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**74**) były następujące: $-7,87$ ppm, $-8,03$ ppm. W widmie sprzężonym obserwowałam sygnały w postaci dwóch kwartetów. Sprzężenia pochodziły od ugrupowania metylenowego grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej i od atomu wodoru 3' pierścienia cukrowego tymidyny.

Wytworzyłam również wiązanie fosforotriestrowe z monofunkcyjnym reagentem fosforylującym z fotolabilną grupą ochronną, p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo fosforanem (**69**) (schemat 40). W tym przypadku jako czynnika nukleofilowego użyłam N-metyloimidazolu, który jest reagentem znacznie tańszym, niż N-tlenek 4-metoksypirydyny. Otrzymany p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforan (**75**) wykazuje sygnały o przesunięciach chemicznych na widmie ^{31}P NMR przy $-7,51$ ppm i $-7,63$ ppm. W widmie sprzężonym obserwowałam sygnały w postaci dwóch trypletów. Sprzężenie pochodziło od ugrupowania metinowego grupy α -metylo-6-nitropiperonylowej i od atomu wodoru 3' pierścienia cukrowego tymidyny.



[i] 5'-DMT-T, TPS, N-tlenek 4-metoksypirydyny
(lub N-metyloimidazol), pirydyna, temp. pok.

Schemat 40. Tworzenie wiązania fosforotriestrowego z wykorzystaniem monofunkcyjnych czynników fosforylujących

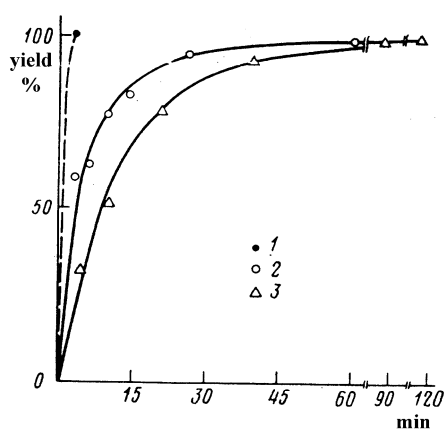
5.2.2.2. Reakcje odblokowania grup ochronnych z atomu fosforu uzyskanych fosforotriestrów

Po otrzymaniu fosforotriestrów z monofunkcyjnymi czynnikami fosforylującymi **73,74,75**, następnym etapem, była reakcja selektywnego odblokowania grup ochronnych z trójestrowego atomu fosforu, aby można było przeprowadzić kolejną reakcję przyłączenia nukleozydu. Odblokowanie grupy 2-cyanoetylowej oraz 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej, przeprowadziłam w środowisku zasadowym, używając do tego celu silną zasadę, jaką jest tetrametyloguanidyna (TMG).

W przypadku kiedy do syntezy w nowym wariantcie metody użyjemy do zablokowania funkcji fosforanowej grupę 2-cyanoetylową natrafimy na pewien problem. W przypadku odblokowania grupy 2-cyanoetylowej z **73** za pomocą TMG, odblokowanie prowadzone w dioksanie nastąpi dopiero po 2 godzinach.²³¹

Myśląc o syntezie oligonukleotydu na syntetyzerze należało zastosować reagent usuwający grupy ochronne z funkcji fosforanowej bardziej efektywnie i dla którego czas odblokowania nie przekroczy 2-3 minut. Taka procedura została już w literaturze opisana przez Popova i współ. Użyli oni 2% pentametyloguanidynę (PMG) w dioksanie do całkowitego

odblokowania grupy 2-cyanoetylowej z funkcji fosforanowej oligonukleotydu P-Tp(CIPh)(CNEt), syntetyzowanego na podłożu polimerowym. PMG jest bardzo silną zasadą, działającą efektywnie, i czas konieczny do odblokowania grupy 2-cyanoetylowej jest bardzo krótki. Kinetykę odblokowania grupy 2-cyanoetylowej pokazano na schemacie 41. Popow i współ. porównali szybkość odblokowania grupy 2-cyanoetylowej za pomocą trzech zasad. Czas odblokowania trietyloaminą ($pK_a=11$) w acetonitrylu, jak również 2 % tetrametyloguanidyną w dioksanie jest znacznie dłuższy. W przypadku 2 % TMG wynosi prawie dwie godziny. Gdy do odblokowania zostanie użyta 2 % pentametyloguanidyna ($pK_a=13,8$) w dioksanie czas ten skraca się do około 3 minut. Popow i współ. zbadali również inne rozpuszczalniki reakcji odblokowania pentametyloguanidyną (PMG) niż dioksan.

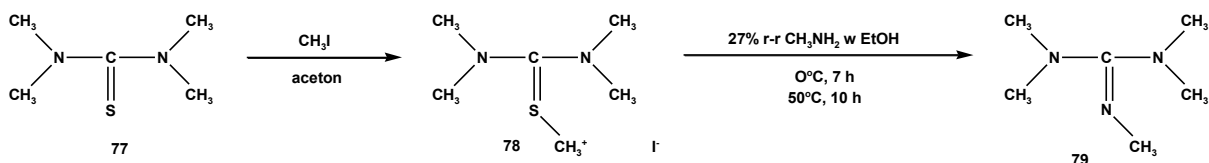


Schemat 41. Kinetyka odblokowania grupy 2-cyanoetylowej z polimeru-nukleotydu P-Tp(CIPh)(CNEt) za pomocą (1) 2% PMG w dioksanie, (2) 2% TMG w dioksanie, (3) trietyloaminy w acetonitrylu²³¹

Jeśli zastosowano PMG w acetonitrylu lub pirydynie, reakcja odblokowania grupy 2-cyanoetylowej z funkcji fosforanowej, zachodziła selektywnie prawie natychmiast. Wymiennie badacze stwierdzili jednak, że powstaje w tych warunkach prawie 42% produktów ubocznych. Dioksan okazał się rozpuszczalnikiem z wyboru. W bezwodnym dioksanie pentametyloguanidyna potrzebuje zaledwie trzech minut, aby całkowicie odblokować grupę 2-cyanoetylową z dinukleozydowych fosforanów i mononukleotydów z wydajnością od 98,7-100%.

Korzystając z faktu, że pentametyloguanidyna jest najbardziej efektywnym reagentem odblokującym zasadolabilne grupy ochronne z atomu fosforu nukleotydu postanowiłam wykorzystać ją do moich badań. Pentametyloguanidyna nie jest związkiem dostępnym handlowo i dlatego musiałam ją sama zsyntezować. Popow i współ. otrzymali PMG na

drodze reakcji jodku N,N,N',N',S-pentametylotiomocznika (**78**) z 27% roztworem metyloaminy w etanolu. Brak dostępu do jodku N,N,N',N',S-pentametylotiomocznika (**78**) spowodował, iż musiałam zsyntezować także ten substrat. Uzyskany jodek N,N,N',N',S-pentametylotiomocznika (**78**) w 27% roztworze metyloaminy w etanolu przekształcałam następnie w pentametyloguanidynę (PMG, (**79**)). Etepy syntezy pentametyloguanidyny przedstawiłam na schemacie 42.



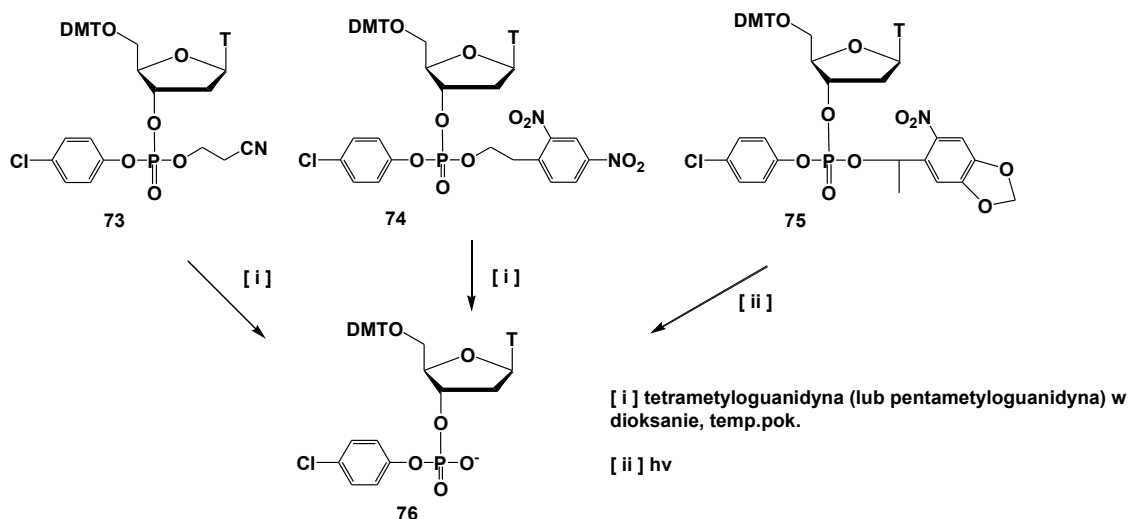
Schemat 42. Synteza pentametyloguanidyny

Po zsyntezowaniu pentametyloguanidyny przeprowadziłam próby odblokowania grupy 2-cyanoetylowej z uzyskanego fosforotriestru **73**, (schemat 43).

W pierwszej kolejności odblokowanie grupy 2-cyanoetylowej z p-chlorofenylo 2-cyanoetylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**73**) przeprowadziłam za pomocą 2% TMG w dioksanie. Przebieg reakcji kontrolowałam fosforowym rezonansem magnetycznym ³¹P NMR. Z integracji sygnałów można było obliczyć wydajność powstającego p-chlorofenylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**76**). Po jednej godzinie nastąpiło odblokowanie grupy 2-cyanoetylowej z **73** w 65 %, a po drugiej nastąpiło całkowite odblokowanie do p-chlorofenylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**76**). W obrazie widma ³¹P NMR powstał singlet przy -6,65 ppm pochodzący od **76**. Na widmie sprzężonym można było zaobserwować ten sygnał w postaci dubletu. Sprzężenie pochodziło od atomu wodoru 3' pierścienia cukrowego tymidyny, p-chlorofenylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**76**). Taki sam przebieg miało odblokowanie grupy 2-cyanoetylowej za pomocą 2% PMG. W tym przypadku czas odblokowania skrócił się do 3 minut.

W mojej pracy do syntezy metodą fosforotriestrową wprowadziłam do czasowego zablokowania funkcji fosforanowej grupę 2-(2,4-dinitrofenylo)etylową. Grupa ta opisana wcześniej przez Pfleiderera i współ.^{157;198;232-234} jest bardziej labilna niż grupa 2-cyanoetylowa, o czym wspominałam już wcześniej. Grupa 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowa zablokowanego triestru **74** bardzo szybko i do końca zostaje odblokowana pod wpływem działania tetrametyloguanidyny (schemat 43). Tak jak szybko odblokowuje 2%

pentametyloguanidyna grupę 2-cyanoetylową z fosforotriestru **73** (2-3 minut), tak samo działa tetrametyloguanidyna w przypadku odblokowania grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej fosforotriestru **74**. Wystarczy 3% TMG, aby w ciągu 4 minut nastąpiło całkowite odblokowanie grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej z **74**.



Schemat 43. Odblokowanie grup ochronnych z funkcji fosforanowej otrzymanych fosforotriestrów **73, 74, 75**.

Warunki odblokowania zoptymalizowałam dobierając odpowiednie stężenie tetrametyloguanidyny do użytego p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**74**). Zaczęłam od stężenia 0,11% TMG. Po 5 minutach grupa 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowa z **74** odblokowała się w 38 %. Przy stężeniu TMG 0,65% odblokowanie nastąpiło w 21 %, po 2 minutach. Podwyższyłam stężenie TMG do 1%-owego. Wykonałam kilka prób czasowych (Tabela 10), aby dobrać odpowiednie warunki odblokowania. Przebieg reakcji kontrolowałam analizując widma ^{31}P NMR. Z integracji sygnałów można było obliczyć wydajność powstającego p-chlorofenylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**76**) i ulegającego odblokowaniu p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**74**).

Tabela 10. Odblokowanie grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej z funkcji fosforanowej fosforotriestru **74** za pomocą 1% TMG w dioksanie

czas	74 [%]
20 s	23
3 min	47
8 min	67
13 min	87

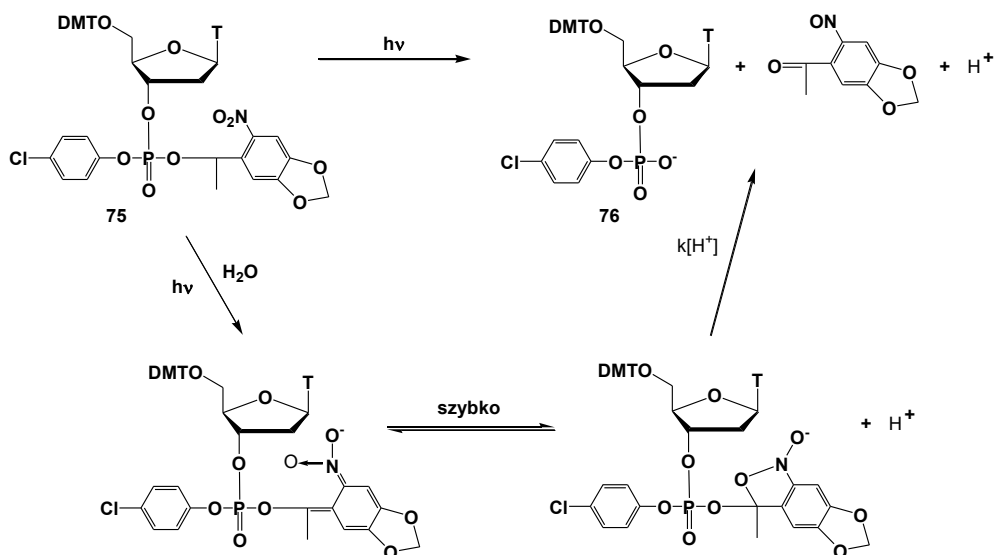
Z tabeli wynika, że po 13 minutach nie nastąpiło jeszcze całkowite odblokowanie p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**74**). Czas 13 minut wydaje się czasem zbyt długim aby zastosować 1% TMG do odblokowania grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej podczas syntezy metodą fosforotriestrową na podłożu stałym. Podjęłam kolejną próbę i do odblokowania grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej zastosowałam 3% TMG (Tabela 11). Już po 4 minutach uzyskałam całkowicie odblokowany p-chlorofenylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforan (**76**). Potwierdzeniem uzyskania **76** jest analiza TLC i ^{31}P NMR. W obrazie widma ^{31}P NMR powstał singlet przy -6,65 ppm pochodzący od **76**. Na widmie sprzężonym można było zaobserwować sygnał w postaci dubletu. Sprzężenie pochodziło od atomu 3' pierścienia cukrowego tymidyny, p-chlorofenylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**76**).

Tabela 11. Odblokowanie grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej z funkcji fosforanowej fosforotriestru **74** za pomocą 3% TMG w dioksanie

czas [s]	74 [%]
30	61
60	66
120	80
150	82
180	88
240	100

W przypadku, gdy do odblokowania grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej użyjemy 2% pentametyloguanidynę to odblokowanie zachodzi praktycznie natychmiast.

Gdy funkcja fosforanowa p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**75**) będzie zablokowana fotolabilną grupą ochronną α -metylo-6-nitropiperonylową, jej odblokowanie powinno nastąpić pod wpływem światła ultrafioletowego o długości fali $\lambda=360$ nm. Mechanizm odblokowania grupy α -metylo-6-nitropiperonylowej z **75** pokazano na schemacie 44.

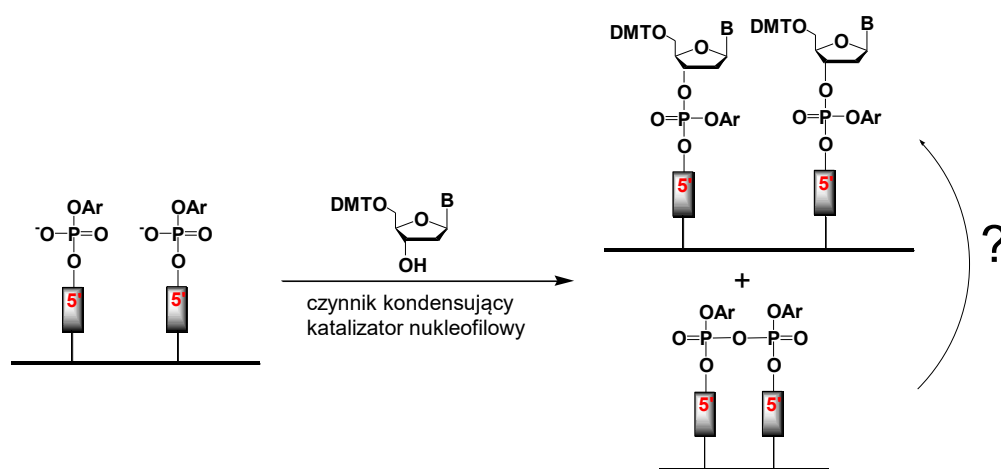


Schemat 44. Mechanizm odblokowania grupy α -metylo-6-nitropiperonylowej pod wpływem światła UV z p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**75**)

Próbkę 0,8 mg p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**75**) umieściłam w probówce Ependorfa. Następnie dodałam 0,5 ml metanolu i 5 μ l trietyloaminy. Rozpuszczony związek naświetlałam światłem wysokociśnieniowej rtęciowej lampy łukowej o mocy 200 W. Dla potwierdzenia odblokowania grupy MeNP i otrzymania **76** wykonałam widmo ^{31}P NMR. Na widmie ^{31}P NMR można było zaobserwować pojawienie się singletu przy $-7,42$ ppm pochodzącego od **76**. Na widmie sprzężonym można było zaobserwować ten sygnał w postaci dubletu. Sprzężenie pochodziło od atomu 3'-pierścienia cukrowego tymidyny, p-chlorofenylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**76**).

5.2.3. Kondensacja. Sposoby aktywacji pirofosforanów powstających podczas reakcji kondensacji

Jak już wspomniałam, kolejny problem który należało rozwiązać w przypadku kiedy myślimy o zastosowaniu metody fosfortriestrowej do syntezy oligonukleotydu na podłożu stałym w wariancie, w którym grupy nukleotydowe należą do składników immobilizowanych na podłożu stałym to problem kondensacji. Podczas kondensacji z nukleozydem znajdującym się w roztworze w obecności czynnika kondensującego i katalizatora nukleofilowego powinien tworzyć się oczekiwany fosfortriester. Może jednak nastąpić także połączenie dwóch sąsiednich łańcuchów oligonukleotydowych z wytworzeniem się symetrycznego (5'-5' lub 3'-3') pirofosforanu. Ze zjawiskiem tworzenia się symetrycznych pirofosforanów mamy do czynienia także w czasie reakcji kondensacji fosfordiestru i nukleozydu metodą fosfortriestrową w roztworze wtedy, gdy w roztworze znajduje się składnik nukleotydowy a synteza prowadzona jest na podłożu stałym. W tych przypadkach jednak konsekwencja powstawania symetrycznego pirofosforanu nie jest tak ważąca.

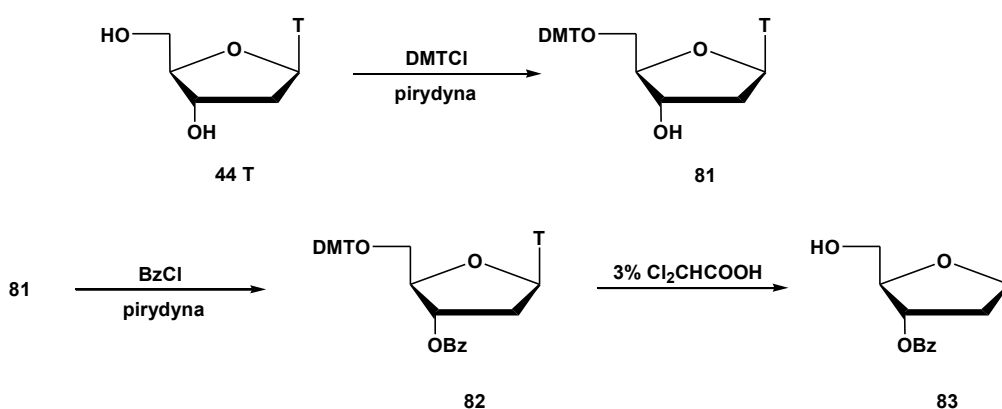


Schemat 45. Reakcja kondensacji z nukleozydem w obecności czynnika kondensującego i katalizatora nukleofilowego

Na ten problem natknęłam się podczas reakcji kondensacji w roztworze, otrzymanych monofunkcyjnych reagentów fosforylujących: p-chlorofenylo 2-cyanoetylo fosforanu (**67**), p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo fosforanu (**68**) i p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo fosforanu (**69**) z nukleozydem, gdzie oprócz produktu głównego czyli odpowiednich fosfortriestrów **73**, **74** i **75** tworzył się symetryczny pirofosforan. Jego

obecność mogłam wykryć zarówno za pomocą analizy ^{31}P NMR jak i TLC surowej mieszaniny reakcyjnej. Jego tworzenie się wydaje się nieuniknione nawet jeśli, jak wiadomo z wcześniejszych badań, nie jest on aktywnym związkiem pośrednim w syntezie oligonukleotydów metodą fosfortriestrową. Tak utworzony pirofosforan powinniśmy umieć aktywować i przekształcić go w rosnący oligonukleotyd (schemat 45).

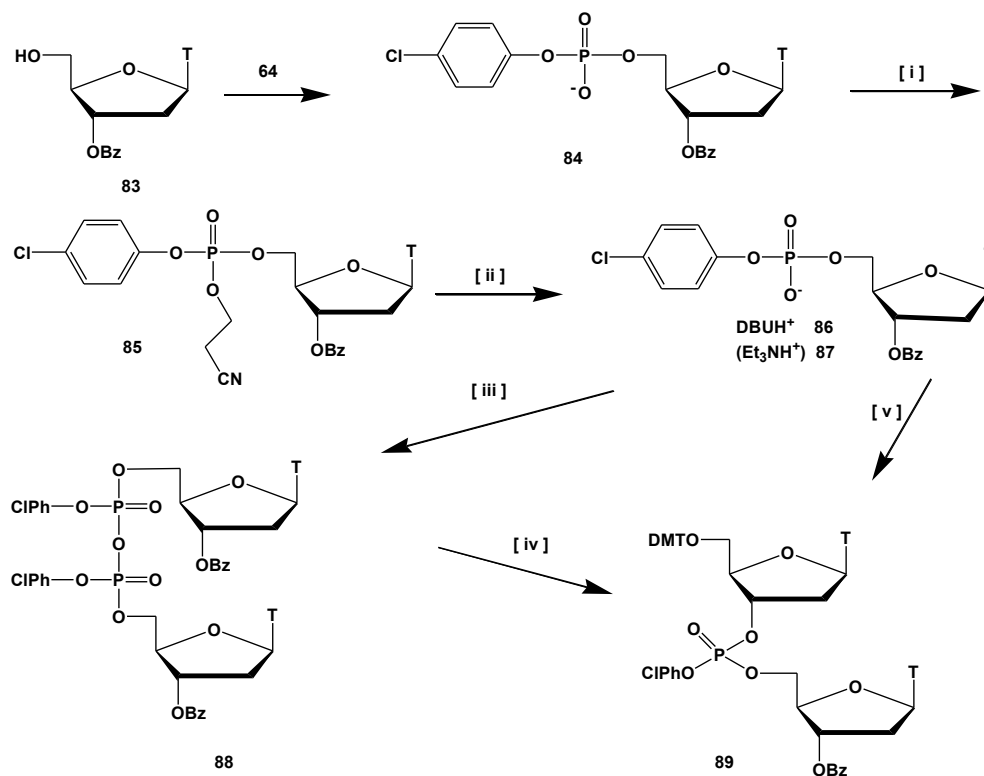
Wykorzystując jako związek modelowy 3'-O-benzoilotymidynę, sprawdziłam reaktywności tworzących się podczas reakcji kondensacji symetrycznych tetrapodstawionych pirofosforanów. W pierwszej kolejności otrzymałam 3'-O-benzoilotymidynę (schemat 46).



Schemat 46. Synteza 3'-benzoilotymidyny

Tymidynę **44 T** trytylowałam w pozycji 5'-OH chlorkiem dimetoksytrytylu. Po zablokowaniu funkcji 5'-OH przeprowadziłam reakcję benzoilowania 5'-DMTrT (**81**) chlorkiem benzoilu. Uzyskaną 3'-O-benzoilo 5'-O-dimetoksytrytylotymidynę (**82**) odtrytylowałam roztworem 2% kwasu dichlorooctowego w chlorku etylenu. Uzyskałam w ten sposób 3'-O-benzoilotymidynę (**83**). Związek **83** poddałam reakcji fosforylacji czynnikiem Efimova **64**, wytwarzając wiązanie diesterowe **84** (schemat 47). Kolejną reakcją była reakcja β -cyjanoetylowania p-chlorofenylo 3'-O-benzoilotymidyn-5'-ylo fosforanu (**84**) 2-cyjanoetanolem w obecności N-metyloimidazolu i TPSCl w bezwodnej pirydynie. Po 15 minutach można było zaobserwować całkowite przereagowanie substratów i utworzenie **85**. Następnie mieszaninę reakcyjną przerobiłam i oczyściłam na kolumnie chromatograficznej uzyskując p-chlorofenylo 2-cyjanoetylo 3'-O-benzoilotymidyn-5'-ylo fosforan (**85**) z wydajnością 81%. Otrzymany p-chlorofenylo 2-cyjanoetylo 3'-O-benzoilotymidyn-5'-ylo fosforan chciałam przekształcić w sól trietyloaminową (**86**) lub DBU (**87**). Miałam nadzieję, że utworzone

związki uda się otrzymać w formie stałej. Podjęłam próbę krystalizacji, jednak nie udało się wykrystalizować soli.



- [i] 2-cyanoetanol, TMSCl, N-tlenek 4-metoksypirydyny (lub N-metyloimidazol), w pirydynie
 [ii] DBU (Et₃N) w pirydynie, temp.pok.
 [iii] TPSCl (0.5 equiv) w pirydynie, temp.pok.
 [iv] 5'-DMTrT, N-tlenek 4-metoksypirydyny (lub N-metyloimidazol), w pirydynie, temp.pok.
 [v] 5'-DMTrT, TPSCl, N-tlenek 4-metoksypirydyny (lub N-metyloimidazol), w pirydynie, temp.pok.

Schemat 45. Reakcje sprawdzające reaktywność symetrycznych tetrapodstawionych fosforanów

Po uzyskaniu soli DBU p-chlorofenylo 3'-O-benzoylotymidyn-5'-ylo fosforanu (**86**) podjęłam próbę wytworzenia pirofosforanu **88**. Do wytworzonej *in situ* soli **86** dodałam ½ równoważnika molowego TPSCl. Po 15 minutach, wytworzył się pirofosforan **88**, który wykazywał trzy sygnały na widmie fosforowego rezonansu magnetycznego przy około -19 ppm. Do wytworzonego pirofosforanu **88** dodałam 5'-O-dimetoksytrytylotymidynę (**81**) i N-tlenek 4-metoksypirydyny. Po 20 minutach widmo ³¹P NMR wykazało przereagowanie pirofosforanu **88** i utworzenie fosfortriestru dinukleozydylowego **89**. Związek **89** wykazywał na widmie ³¹P NMR dwa sygnały przy -7,30 i -7,60 ppm pochodzące do atomu fosforu powstającego fosfortriestru dinukleozydu **89**.

Można stwierdzić, że pirofosforany powstają stosunkowo szybko, jednak równie szybko można je aktywować do fosforotriestrów, które to mają być głównym i jedynym produktem podczas reakcji kondensacji.

5.2.4. Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym modyfikowaną metodą fosforotriestrową

Mając do dyspozycji uzyskane monofunkcyjne reagenty fosforylujące, które z racji swej monofunkcyjności nie mogą spiąć dwóch sąsiadujących łańcuchów oligonukleotydowych, mogłam oczekiwać, iż wzrost łańcucha oligonukleotydowego będzie procesem bardzo wydajnym. Duże szanse dla opracowania wydajnej syntezy można związać z faktem, że utworzone pirofosforany w reakcji kondensacji udaje się łatwo aktywować i przekształcać w fosforotriestry. Postanowiłam przenieść te ustalenia do doświadczeń syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym.

5.2.4.1. Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym z wykorzystaniem czynnika Efimova

Do syntezy oligonukleotydów metodą fosforotriestrową stosowana jest procedura opracowana przez Efimova. Do wprowadzania funkcji fosforanowej do jednostki nukleozydowej wykorzystuje on p-chlorofenylo pirydynylo fosforan. W pierwszej kolejności chciałam sprawdzić jak będzie przebiegała synteza oligonukleotydów metodą fosforotriestrową na podłożu stałym z użyciem czynnika fosforylującego Efimova.

Do syntezy użyłam kolumnę, stosowaną do syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym na syntetyzerze DNA. Umieściłam w niej 14 mg podłoża „Primer” z załadowaną 5'-O-dimetoksytrytylotymidyną. Podłoże odtrytylowałam za pomocą 3% kwasu dichlorooctowego. Po odtrytylowaniu wolną grupę 5'-hydroksylową nukleozydu przyłączonego do podłoża poddałam reakcji z wcześniej otrzymanym reaktywnym czynnikiem fosforylującym, p-chlorofenylo pirydynylo fosforanem (**64**). Odczynnik fosforylujący **64** reaguje z wolną grupą hydroksylową substratu nukleozydowego, w wyniku czego powstaje fosfordiester p-chlorofenylnukleozydowy. Następnie uzyskany fosfordiester p-chlorofenyłowy w reakcji kondensacji z nukleozydem (5'-DMTrT) w obecności TPSCl i N-tlenku 4-metoksypirydyny przekształciłam w fosforotriester.

Przeprowadzone operacje, które doprowadziły do uzyskania na podłożu stałym wiązania fosfortriestrowego zestawiałam w tabeli 12.

Tabela 12. Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym metodą fosfortriestrową z użyciem czynnika Efimova.

Nr operacji	Funkcja	Objętość użytych reagentów [ml]	Czas [min]
1	Przemycie chlorkiem etylenu	3 x 1	2
2	Odtrytylowanie: 3% kwas dichlorooctowy (A=1,4055) *		
3	Przemycie chlorkiem etylenu	3 x 1	2
4	Przemycie acetonitrylem	3 x 1	2
5	Fosforylacja: czynnik Efimova**	2 x 0,5	2 x 10
6	Przemycie acetonitrylem, odwirowanie kolumny, przemycie acetonitrylem	3 x 1 3 x 1	2 2
7	Kondensacja: 0,2 M DMTTrT i 0,4 M N-tlenek 4-metoksypirydyny pirydynie TPSCI	2 x 0,3 2 x 100 mg	2 x 15
8	Przemycie acetonitrylem, odwirowanie kolumny, przemycie acetonitrylem	3 x 1 3 x 1	2 2
9	Przemycie chlorkiem etylenu	3 x 1	2
10	Odtrytylowanie: 3% kwas dichlorooctowy (A=1,3966) *		
11	Powtórzono operacje 1-9		
12	Odtrytylowanie: 3% kwas dichlorooctowy (A=1,3877) *		
13	Powtórzono operacje 1-9		
14	Odtrytylowanie: 3% kwas dichlorooctowy (A=1,3648) *		

* pomiar absorpcji roztworu kationu dimetoksytrytylowego przy λ_{\max} 504 nm

** czynnik Efimova: 1 ml pirydyny + 82 μ l dichlorofosforanu p-chlorofenyłu + 9 μ l wody, mieszanina pozostawiona na 10 minut.

Z przedstawionych wyników (tabela 12) wydaje się, że synteza oligonukleotydów metodą fosfortriestrową, wykorzystująca czynnik Efimova jako reagent fosforylujący jest możliwa. Niestety synteza nie jest powtarzalna. Nie do końca udało mi się stwierdzić, jakie czynniki mają wpływ na uzyskanie wiązania fosfortriestrowego z jak najwyższą wydajnością. Kilkakrotnie udało mi się osiągnąć prawie 100 % wydajność pierwszego przyłączenia jednostki nukleozydowej. Analizując poszczególne etapy syntezy i zmieniając ich warunki, chciałam zoptymalizować syntezę, aby była ona powtarzalna oraz przebiegała z wysoką

wydajnością. Przeprowadziłam liczne próby modyfikacji etapów syntezy, zmieniając sposób i czas fosforylacji, a także kondensacji z nukleozydem.

W syntezie metodą fosforotriestrową z użyciem czynnika fosforylującego Efimova, kluczowym etapem, który wpływa na wydajność końcową, jest etap fosforylacji. Istotną rolę odgrywa odpowiednia ilość wody użyta do utworzenia czynnika fosforylującego Efimova. Zbyt duża jej ilość może spowodować tworzenia się produktów ubocznych, p-chlorofenylo fosforanu i bis(p-chlorofenylowego) pirofosforanu, które powstają podczas generowania p-chlorofenylo pirydynylo fosforanu (**64**). Ich tworzenie mogło obniżać wydajność etapu fosforylacji. W związku z tym, zmniejszałam ilość wody potrzebną do wygenerowania czynnika Efimova nawet do 50 %, w porównaniu do ilości, jaką stosował Efimov w swojej syntezie. Jednak nie doprowadziło to do uzyskania powtarzalnych wysokich wydajności. Również dodanie do wytworzonego p-chlorofenylo pirydynylo fosforanu (**64**), podczas procesu fosforylacji N-metyloimidazolu i TPSCl, które to czynniki miały przyspieszyć tworzenie się **64**, nie wpłynęło na wynik końcowy syntezy. Dodawanie dużych nadmiarów TPSCl miało usuwać nadmiar wody podczas fosforylacji, jednak to również nie wpłynęło na wydajność końcową syntezy. Użycie TPSCl na etapie fosforylacji, pociągało za sobą możliwość tworzenia estrów sulfonowych podczas reakcji z wolnymi grupami 5'-hydroksylowymi. Nie obserwowałam jednak w doświadczeniach z TPSCl istotnego obniżenia wydajności syntezy wiązania internukleotydowego.

W efekcie pomimo zachęcających wyników syntezy w roztworze, przeniesienie tej syntezy na podłoże stałe nie zakończyło się satysfakcjonującymi wynikami.

5.2.4.2. Synteza podłoża stałego modyfikowanego sarkozyną

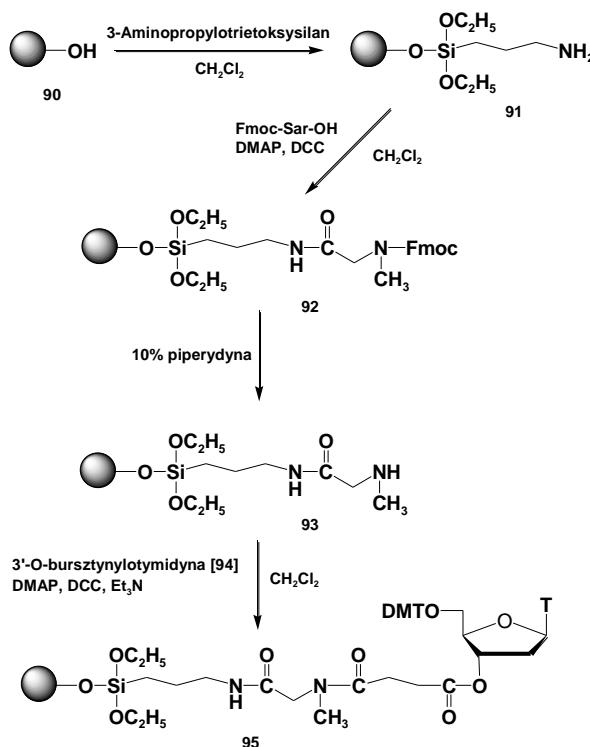
W standardowej metodzie syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym, otrzymany oligonukleotyd po syntezie odcinany jest od podłoża w wodnym roztworze amoniaku. W moim wariantcie syntezy zasadowe warunki będą miały miejsce podczas odblokowania grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej z utworzonego fosforotriestru **74**. W ten sposób można będzie przeprowadzić kolejną reakcję kondensacji w celu wydłużania łańcucha oligonukleotydowego. Użycie zasadowych warunków podczas reakcji odblokowania grupy zasadolabilnej spowodowałoby odcięcie oligonukleotydu od podłoża. Dlatego też należało przeprowadzić taką modyfikację łącznika pomiędzy nukleozydem, a podłożem, która zapewniłaby jego odporność na zasadowe warunki podczas reakcji odblokowania grupy

2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej. Taką modyfikację łącznika opisano już w literaturze chemicznej.¹³⁸ Do zabezpieczenia grupy aminowej często wykorzystuje się sarkozynę. Powstaje wówczas wiązanie amidowe, które jest trwałe w warunkach zasadowych.

W pierwszej kolejności przeprowadziłam syntezę podłoża modyfikowanego sarkozyną (schemat 46).

Podłoże CPG **90** funkcjonalizowałam 3-aminopropylotrietoksyilanem w bezwodnym chlorku metylenu. Po funkcjonalizacji wolne grupy hydroksylowe podłoża **90**, które nie przereagowały z 3-aminopropylotrietoksyilanem, zablokowałam grupami trimetylosililowymi. Następnie podłoża **91** poddałam reakcji z 9-fluorenometoksykarbonylo-N-metyloglicyną (Fmoc-sarkozyna). W kolejnej reakcji z podłoża **92** w środowisku 10% piperydyny w pirydynie nastąpiło odblokowanie grupy Fmoc z utworzeniem podłoża **93**. Podłoże **93** w reakcji z 3'-O-bursztynilotymidyną (**94**) tworzy podłoże modyfikowane sarkozyną **95**.

Tak przygotowane podłoże może być użyte z powodzeniem w nowym wariantcie syntezy metodą fosfortriestrową, wykorzystującą grupy zasadolabilne do zablokowania funkcji fosforanowej rosnącego oligonukleotydu.



Schemat 46. Synteza podłoża modyfikowanego sarkozyną

5.2.4.3. Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym modyfikowanym sarkozyną w nowym wariacie metody fosfortriestrowej

Po uzyskaniu podłoża modyfikowanego sarkozyną (**95**) mogłam przystąpić do syntezy oligonukleotydów wykorzystując nowy wariant metody fosfortriestrowej. W wariacie tym bezpośrednio na podłożu przeprowadziłam reakcję fosforylacji nowym czynnikiem fosforylującym, p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo fosforanem (**68**). Po reakcji fosforylacji następnym etapem było odblokowanie grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej. Dokonałam tego stosując 6 % tetrametyloguanidynę. Po odblokowaniu grupy zasadolabilnej w reakcji kondensacji 5'-blokowanego nukleozydu w obecności N-tlenku 4-metoksypirydyny i TPSCl wytworzyłam wiązanie triestrowe. W tabeli 13 umieściłam warunki poszczególnych etapów syntezy, które doprowadziły do powstania wiązania fosfortriestrowego.

Tabela 13. Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym modyfikowanym sarkozyną w nowym wariacie metody fosfortriestrowej.

Nr operacji	Funkcja	Objętość użytych reagentów [ml]	Czas [min]
1	Przemycie chlorkiem etylenu	2 x 2	2
2	Odtrytylowanie: 3% kwas dichlorooctowy (A=1,289)*	2 x 5	4
3	Przemycie chlorkiem etylenu	2 x 2	2
4	Przemycie acetonitrylem	2 x 2	2
5	Fosforylacja: 0,2 M p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo fosforan i 0,4 M N-tlenek 4-metoksypirydyny w pirydynie TPSCl	2 x 0,3 2 x 40 mg	2 x 15
6	Przemycie acetonitrylem	2 x 5	2
7	Przemycie dioksanem	2 x 5	2
8	6 % TMG w dioksanie	0,5	10
9	Przemycie dioksanem	2 x 5	2
10	Przemycie acetonitrylem	2 x 5	2
11	Kondensacja: 0,2 M DMTrT i 0,4 M N-tlenek 4-metoksypirydyny w pirydynie TPSCl	2 x 0,3 100 mg	2 x 15
12	Przemycie acetonitrylem	2 x 5	2
13	Przemycie chlorkiem etylenu	2 x 2	2
14	Odtrytylowanie: 3% kwas dichlorooctowy (A=0,877)*	2 x 5	4

* pomiar absorpcji roztworu kationu dimetoksytrytylowego przy λ_{\max} 504 nm

Z tabeli 13 wynika, że możliwe było przeprowadzenie sekwencji reakcji fosforylacji i kondensacji z wytworzeniem wiązania internukleotydowego. Porównując wyniki odczytu pomiaru absorpcji roztworu kationu dimetoksytrytylowego po odblokowaniu podłoża (**95**) i po wszystkich etapach syntezy, które doprowadziły do utworzenia wiązania fosfortriestrowego, można zauważyć, że wydajność (68 %) tego procesu nie jest zadowalająca. Podjąłm próby optymalizacji poszczególnych etapów syntezy w celu uzyskania jak najwyższej wydajności.

W pierwszej kolejności zbadalam czy stężenie tetrametyloguanidyny (3 %) potrzebne do odblokowania grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej jest wystarczające. Takie właśnie stężenie zastosowałam do odblokowania grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej z p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**74**), otrzymanego metodą fosfortriestrową w roztworze. Kolejno badałam, czy stężenia 3 %, 4 %, 6 %, a nawet 12 % tetrametyloguanidyny są wystarczające do odblokowania grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej. Zastosowanie coraz większego stężenia tetrametyloguanidyny do odblokowania grupy zasadolabilnej nie miało wpływu na wynik końcowy syntezy. Nadal najwyższą wydajność, którą udało się osiągnąć to wydajność 68 %. W tym przypadku mogłam stwierdzić, że do odblokowania grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej wystarczy stężenie 3 % TMG, takie jakie zastosowałam do odblokowania grupy 2-(2,4--dinitrofenylo)etylowej z p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**74**), otrzymanego na drodze syntezy metodą fosfortriestrową w roztworze.

Wydaje mi się, że najbardziej zawodnym etapem tej syntezy, jest etap pierwszy, czyli fosforylacja wolnych grup hydroksylowych przyłączonych do podłoża. Do reakcji fosforylacji użyłam 0,2 M p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo fosforan, 0,4 M N-tlenek 4-metoksyperydyny w perydynie i TPSCl. Chcąc mieć pewność, że wszystkie wolne grupy hydroksylowe przereagowały z czynnikiem fosforylującym, p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo fosforanem, reakcję fosforylacji prowadziłam dwukrotnie, stosując nową porcję odczynnika (tabela 13). Jednak to również nie poprawiło wydajności syntezy. Trudno było udowodnić, że to właśnie fosforylacja jest etapem przebiegającym z niższą wydajnością. Postanowiłam to sprawdzić, wykorzystując do tego celu metodę amidofosforynową. W kolumnie do syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym umieściłam 10 mg podłoża **95**, następnie podłoże odtrytylowałam, po czym przeprowadziłam reakcję fosforylacji wolnych grup hydroksylowych. Jeżeli fosforylacja nie zachodzi do końca, to

nadal na podłożu znajdują się wolne grupy hydroksylowe. Takie wolne grupy powinny ulec reakcji kondensacji z amidofosforem nukleozydu w obecności tetrazolu. W ten sposób chciałam sprawdzić jaka jest wydajność samego procesu fosforylacji. Po reakcji z amidofosforem nukleozydowym podłoże poddałam standardowej procedurze odtrytylowania. Obecność kationu dimetoksytrytylowego wskazuje, że fosforylacja nie była ilościowa. Z porównania odczytu pomiaru absorpcji roztworu kationu dimetoksytrytylowego można było wnioskować, że fosforylacja zachodzi z 81 % wydajnością, a 19 % wolnych grup hydroksylowych wzięło udział w reakcji kondensacji z amidofosforem nukleozydowym. Proces fosforylacji jest prośem kluczowym tej syntezy. Jednak uzyskana wydajność tego etapu nie przekraczała 80 % wydajności. Możliwe, że jest to spowodowane dużą labilnością grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej. Tym samym odczynnik p-chlorofenilo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo fosforan, nie jest jednorodny. W czasie jego syntezy (rozdział 5.2.2.) miałam duże trudności z uzyskaniem go w postaci związku wolnego od zanieczyszczeń (analiza ^{31}P NMR).

Reasumując, zbadałam możliwość prowadzenia syntezy zmodyfikowaną metodą fosfortriestrową na podłożu stałym i wykazałam, że synteza taka może zachodzić efektywnie. Obserwowałam jednak bardzo dużą niepowtarzalność wyników poszczególnych etapów syntezy. Wydajności wahały się w szerokim zakresie. Niekiedy obserwowałam wydajność bliską ilościowej, a innym razem nie przekraczającą 60 %. Wydaje się, że podstawowe trudności w badanym przeze mnie wariacie syntezy oligonukleotydów metodą fosfortriestrową, związane są z wydajnym fosforylowaniem nukleozydowych grup hydroksylowych. Badania w tym zakresie wymagałyby uwzględnienia w przyszłości, także wpływu na wydajność syntezy charakteru stosowanych podłoży stałych. Synteza oligonukleotydów w wariacie fosforylowania grup hydroksylowych na podłożu stałym, a następnie ich kondensacja z nukleozydami jest możliwa, ale wydajność metody pozostaje niezadowolająca.

6. PODSUMOWANIE

Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki można podzielić na dwie części:

1. Podjęłam próby przygotowania amidofosforynów chronionych fotolabilną węglanową grupą blokującą.
2. Opracowałam nowy wariant metody syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym, w którym wykorzystywałam również fotolabilną grupę ochronną terminalnej funkcji fosforanowej.

W literaturze brak jest bardziej szczegółowych danych zarówno na temat syntezy amidofosforynów z grupą MeNPoc, jak i na temat syntezy samego alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego. Skłoniło mnie to do opracowania własnego podejścia do syntez wyżej wymienionych związków.

W pierwszej kolejności opracowałam własne podejście otrzymywania alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego ((**41**), MeNP-OH). Udało się ten plan zrealizować, chociaż w syntezie korzystałam z ogólnie znanych procedur preparatyki związków organicznych. Procedury te dopasowałam do moich potrzeb i je zoptymalizowałam. Opracowaną przeze mnie procedurę wykorzystywałam kilkakrotnie do otrzymania kilkudziesięciogramowych ilości alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego.

Po otrzymaniu alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego następnym etapem było utworzenie pochodnej pozwalającej na wprowadzenie grupy α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej (MeNPoc) w pozycję 5'-OH nukleozydu. W pierwszej kolejności zbadałam możliwość otrzymania chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonylowego (**50**). Podjęte próby otrzymania pochodnej α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej nie były udane. Wprawdzie uzyskiwałam chloromrówczan α -metylo-6-nitropiperonylowy jednak z bardzo niskimi wydajnościami. Poszukałam skuteczniejszego sposobu wprowadzania grupy MeNPoc w położenie 5'-OH nukleozydów, niż generowanie *in situ* aktywnych prekursorów chloromrówczanu α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylu.

W tym celu skorzystałam z faktu iż reakcja N,N-karbonylodiimidazolu z alkoholami prowadzi do utworzenia trwałych karbaminianów imidazolowych. Zaproponowałam syntezę nowego odczynnika do wprowadzania grupy MeNPoc na pozycję 5'-OH nukleozydu. W reakcji alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego z karbonylodiimidazolem w acetonitrylu otrzymałam imidazolid MeNPoc (**42**) jako trwały, krystaliczny związek

Następnie opracowałam nowy reagent pozwalający z wyższymi wydajnościami od opisanych w literaturze, także patentowej otrzymywać pochodne 5'-MeNPoc N-blokowanych nukleozydów. Był nim N-metyloimidazolid α -metylo-6-nitropiperonyloksyowy (**43**).

Tak otrzymany czynnik użyłam do syntezy blokowanych grupą fotolabilną amidofosforynów nukleozydowych. W pierwszej kolejności otrzymałam pochodne 5'-MeNPoc wszystkich czterech deoksynukleozydów dA^{F_{Ac}}, dC^{iBu}, dG^{iBu}, dT (**45 A, C, G, T**). Następnie otrzymane pochodne nukleozydowe przekształciłam w odpowiednie 3'-amidofosforyny nukleozydów blokowanych na funkcji 5' grupą α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylową (**46 A, C, G, T**). Uzyskałam amidofosforyny nukleozydów blokowanych grupą fotolabilną MeNPoc wszystkich czterech zasad z wyższymi wydajnościami od tych, opisanych w literaturze. Tak otrzymane amidofosforyny służą do zastosowania w syntezie scalonych bibliotek oligonukleotydowych metodami fotolitograficznymi.

W celu potwierdzenia fotolabilności otrzymanych nukleozydów blokowanych na funkcji 5' grupą MeNPoc (**45 A, C, G, T**), przeprowadziłam naświetlenie przy użyciu wysokociśnieniowej rtęciowej lampy łukowej o mocy 200 W. Po naświetlaniu analiza TLC wykazała całkowite odblokowanie **45A, C, G, T**, z równoczesnym wytworzeniem odpowiednich nukleozydów **44A, C, G, T**. W ten sposób potwierdziłam fotolabilność uzyskanych związków **45 A, C, G, T**, na innej drodze niż jest to opisane w literaturze.

W drugiej części rozprawy opracowałam nowy wariant metody fosforotriestrowej syntezy oligonukleotydów, w którym wykorzystywałam również fotolabilną grupę do ochrony terminalnej funkcji fosforanowej.

Modyfikacje metody fosforotriestrowej objęły:

- użycie nukleozydu zamiast nukleotydu;
- opracowana modyfikacja była wykorzystana w wariacie syntezy na podłożu stałym;
- uniezależnienie od kierunku syntezy łańcucha oligonukleotydowego (3'→5', ale także 5'→3').

Synteza opracowana jest w wariacie syntezy na podłożu stałym, dlatego musiałam rozwiązać następujące problemy.

Po pierwsze rozwiązałam problem wydajnej fosforylacji. Użycie monofunkcyjnego reagenta fosforylującego, który z racji swej monofunkcyjności nie może spiąć dwóch sąsiadujących łańcuchów oligonukleotydowych, jest ważnym elementem opracowanego wariantu metody triestrowej. W tym celu opracowałam syntezę kilku monofunkcyjnych reagentów fosforylujących. Do otrzymania tych czynników wykorzystałam czynnik fosforylujący Efimova **64** (p-chlorofenylo pirydynylo fosforan), którego syntezę zoptymalizowałam.

W następnej kolejności uzyskałam następujące monofunkcyjne reagenty fosforylujące:

- p-chlorofenylo 2-cyjanoetylo fosforan (**67**);
- p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo fosforan (**68**);
- p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo fosforan (**69**).

Uzyskane czynniki fosforylujące **67**, **68**, **69** utworzyły z 5'-O-dimetoksytrytylotymidyną w obecności katalizatora nukleofilowego i czynnika kondensującego oczekiwane wiązanie fosforotriestrowe **73**, **74**, **75**. Otrzymałam w ten sposób:

- p-chlorofenylo 2-cyjanoetylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforan (**73**);
- p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforan (**74**);
- p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforan (**75**).

Następnym krokiem było odblokowanie grup ochronnych z centrum fosforowego otrzymanych fosforotriestrów **73**, **74**, **75**. Odblokowanie grupy 2-cyjanoetylowej oraz 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej, przeprowadziłam w środowisku zasadowym, używając do tego celu silną zasadę, jaką jest tetrametyloguanidyna (TMG), jak również pentametyloguanidynę (PMG). Odblokowanie grupy 2-cyjanoetylowej z p-chlorofenylo 2-cyjanoetylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**73**) przeprowadziłam za pomocą 2% TMG w dioksanie. Po dwóch godzinach nastąpiło odblokowanie grupy 2-cyjanoetylowej z **73** do p-chlorofenylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**76**). Taki sam przebieg miało odblokowanie grupy 2-cyjanoetylowej za pomocą 2% PMG. W tym przypadku czas odblokowania skrócił się do 3 minut. Gdy grupą blokującą fosforotriesteru była grupa bardziej labilna, grupa 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowa to stosując 3% TMG już po 4 minutach

uzyskałam całkowicie odblokowany p-chlorofenylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforan (**76**). Natomiast w przypadku gdy do odblokowania grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej z **74** użyłam 2% pentametyloguanidynę to odblokowanie zachodziło praktycznie natychmiast.

W przypadku, gdy funkcja fosforanowa p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**75**) była zablokowana fotolabilną grupą ochronną α -metylo-6-nitropiperonylową, jej odblokowanie nastąpiło pod wpływem światła ultrafioletowego o długości fali $\lambda=360$ nm.

Kolejny problem bardzo ważny, który rozwiązałam w przypadku opracowanego wariantu metody fosforotriestrowej to problem kondensacji. Podczas kondensacji z nukleozydem w obecności czynnika kondensującego i katalizatora nukleofilowego tworzył się oczekiwany fosforotriester, ale również następowało połączenie dwóch sąsiednich łańcuchów oligonukleotydowych z wytworzeniem pirofosforanu. Na ten problem natknęłam się podczas reakcji kondensacji w roztworze, otrzymanych monofunkcyjnych reagentów fosforylujących (p-chlorofenylo 2-cyanoetylo fosforan (**67**), p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo fosforan (**68**), p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo fosforan (**69**)) z nukleozydem, gdzie oprócz produktu głównego czyli odpowiednich fosforotriestrów tworzyły się pirofosforany. Wykorzystując jako związek modelowy 3'-O-benzoilotymidynę wytwarzałam tetrapodstawione pirofosforany, które następnie szybko i wydajnie aktywowałam do fosforotriestrów.

Mając do dyspozycji uzyskane monofunkcyjne reagenty fosforylujące i opracowaną metodę aktywowania powstałych pirofosforanów w reakcji kondensacji, mogłam oczekiwać, iż wzrost łańcucha oligonukleotydowego będzie procesem bardzo wydajnym. Ustalenia te przeniosłam do doświadczeń syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym.

W pierwszej kolejności chciałam sprawdzić jak będzie przebiegała synteza oligonukleotydów metodą fosforotriestrową na podłożu stałym z użyciem czynnika fosforylującego Efimova. Synteza oligonukleotydów metodą fosforotriestrową, wykorzystująca czynnik Efimova jako reagent fosforylujący jest możliwa. Niestety synteza nie jest powtarzalna. Nie do końca udało mi się stwierdzić, jakie czynniki mają wpływ na uzyskanie wiązania fosforotriestrowego z jak najwyższą wydajnością. Kilkakrotnie udało mi się osiągnąć prawie 100 % wydajność pierwszego przyłączenia jednostki nukleozydowej. Przeprowadziłam liczne próby modyfikacji etapów syntezy, zmieniając sposób i czas fosforylacji, a także kondensacji z nukleozydem. W efekcie pomimo zachęcających wyników

syntezy w roztworze, przeniesienie tej syntezy na podłoże stałe nie zakończyło się satysfakcjonującymi wynikami.

Wiedząc, że w standardowej metodzie syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym, otrzymany oligonukleotyd po syntezie odcinany jest od podłoża w wodnym roztworze amoniaku musiałam zmodyfikować podłoże. W moim wariacie syntezy, w warunkach zasadowych miało miejsce odblokowanie grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej z utworzonego fosfortriestru **74**. Zastosowanie standardowego łącznika bursztynylowego spowodowałoby na samym początku odcięcie „łańcucha” od podłoża. Problem ten rozwiązałam stosując podłoże modyfikowane sarkozyną **95**. Ta modyfikacja łącznika podłoża, zapewniła jego odporność na zasadowe warunki podczas reakcji odblokowania grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej.

Następnie zbadalam możliwość prowadzenia syntezy zmodyfikowaną metodą fosfortriestrową na podłożu stałym i wykazałam, że synteza taka może zachodzić efektywnie. Obserwowałam jednak bardzo dużą niepowtarzalność wyników poszczególnych etapów syntezy. Bezpośrednio na podłożu przeprowadziłam reakcję fosforylacji nowym czynnikiem fosforylującym, p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo fosforanem (**68**). W następnej kolejności po odblokowaniu grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej 6 % tetrametyloguanidyną przeprowadziłam reakcję kondensacji z 5'-O-dimetoksytrytylotymidyną, wytwarzając na podłożu stałym wiązanie fosfortriestrowe. Próbowałam optymalizować poszczególne etapy syntezy, jednak najwyższa wydajność, którą udało mi się osiągnąć to 70 %. Wydaje się, że podstawowa trudność w badanym przeze mnie wariacie syntezy oligonukleotydów metodą fosfortriestrową, polega na wydajnym fosforylowaniu nukleozydowych grup hydroksylowych.

Synteza oligonukleotydów w wariacie fosforylowania grup hydroksylowych na podłożu stałym, a następnie ich kondensacja z nukleozydami jest możliwa, ale wydajność metody pozostaje niezadowalająca.

7. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

7.1. Odczynniki chemiczne

Rozpuszczalniki

Wymienione rozpuszczalniki, przed wykorzystaniem w pracach doświadczalnych, zostały przygotowane wg zamieszczonych opisów. Rozpuszczalniki przechowywano nad sitami molekularnymi 3Å firmy Merck (Niemcy).

Nazwa rozpuszczalnika	Producent	Stopień czystości	Sposób oczyszczania
Acetonitryl	Lab-Scan, Romil	cz.d.a.	Użyto bezpośrednio.
Benzen	POCh Gliwice	cz.d.a.	Ogrzewano z wodorkiem wapnia (II)-CaH ₂ pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano; przechowywano nad sitami.
Bezwodnik octowy	POCh Gliwice	cz.	Destylowano; przechowywano nad sitami.
Chlorek etylenu	POCh Gliwice	cz., cz.d.a.	Zasypano tlenkiem fosforu (V) – P ₂ O ₅ ; następnego dnia destylowano znad P ₂ O ₅ .
Chlorek metylenu	Merck	cz.d.a.	Przechowywano nad sitami.
Chlorek metylenu	POCh Gliwice	cz.	Sączono przez kolumnę wypełnioną tlenkiem glinu (III) – Al ₂ O ₃ .
Eter dietylowy	POCh Gliwice	cz.d.a.	Destylowano znad CaH ₂ ; przechowywano nad sitami.
N,N-Dimetyloformamid (DMF)	POCh Gliwice	cz.d.a.	Destylowano pod zmniejszonym ciśnieniem; przechowywano nad sitami.
1,4-Dioksan	POCh Gliwice	cz.	Sączono przez kolumnę wypełnioną Al ₂ O ₃ , następnie ogrzewano z CaH ₂ pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano; przechowywano nad sitami.
Octan etylu	POCh Gliwice	cz.d.a.	Ogrzewano z CaH ₂ pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano; przechowywano nad sitami.
Pirydyna	Lobo Feinchemie	cz.d.a.	Destylowano znad P ₂ O ₅ , po czym ogrzewano z CaH ₂ pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano; przechowywano nad sitami; (średnia zawartość wody 10 ppm)
Pirydyna	POCh Gliwice	cz.	Kilka dni przechowywano nad wodortlenkiem potasu – KOH; pozostałe czynniki j.w.; (średnia zawartość wody 15 ppm)

Tetrahydrofuran (THF)	POCh Gliwice	cz.	Sączono przez kolumnę wypełnioną Al_2O_3 , następnie ogrzewano z CaH_2 pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano; przechowywano nad sitami.
Toluen	POCh Gliwice	cz.d.a.	Destylowano; przechowywano nad sitami

Reagenty

W pracach doświadczalnych zastosowano, po uprzednim oczyszczaniu, następujące reagenty:

Nazwa reagenta	Producent	Stopień czystości	Sposób oczyszczania
Chlorek izobutyrylu	POCh Gliwice	cz.	Destylowano
Chlorek 2,4,6-triizopropyl-benzeno sulfonylu (TPSCI)	Janssen Chimica	cz.	Przekryształizowano z heksanu
Chlorek piwaloilu	Fluka	cz.	Destylowano
Chlorek trimetylosililu (TMSiCl)	POCh Gliwice	cz.	Destylowano
Siarczan dimetylu		cz.	Destylowano
1H-Tetrazol	Fluka	cz.	Sublimowano
Trietyloamina (TEA)	Fluka	cz.d.a.	Ogrzewano z CaH_2 pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano; przechowywano nad CaH_2

Poniższe reagenty użyto do reakcji bezpośrednio, z pominięciem procedur oczyszczania.

Nazwa reagenta	Producent	Stopień czystości
Amoniak, wodny roztwór (32%)	Merck	>99%
Chlorek 4,4'-dimetoksytrytylu (DMTCl)	Z.D. Chemipan	98%
Chlorek izobutyrylu	POCh Gliwice	cz.d.a.
Chlorek sodu	POCh Gliwice	cz.
1,8-Diazabicyklo[5.4.0]-undek-7-en (DBU)	Fluka	~ 97%
4-Dimetyloaminopirydyna (DMAP)	Fluka	>98%
N-Etylodiiizopropylamina	Aldrich	99%
FMOC-sarkozyna	Fluka	>98%
Fosforyn difenylowy	Aldrich	cz.
Jodometan	Merck	>99%
Kwas dichlorooctowy	Aldrich	99%
Kwas fenoksyoctowy	Aldrich	99%
Kwas siarkowy	POCh Gliwice	-
Kwas solny (35%)	POCh Gliwice	-
2,6-Lutydyna	Aldrich	99%
Magnez	Aldrich	98%

Metyloamina, 33% roztwór w etanolu	Fluka	cz.
<i>N</i> -Metyloimidazol	Aldrich	99%
Ninhydryna	POCh Gliwice	cz.d.a.
Octan feniloetylu	Aldrich	99%
2,3,4,5,6-Pentafluorofenol	Fluka	>99%
Piperonal	Aldrich	99%
Siarczan sodu bezw.	POCh Gliwice	cz.d.a.
Sulfotlenek dimetylu (DMSO)	Ubichem	cz.
Tetrametyloguanidyna	Sigma	cz.d.a.
Tetrametylotiomocznik	Fluka	> 97%
<i>N</i> -tlenek 4-metoksypirydyny	Fluka	~ 95%
Trifluorometanosulfonian metylu	Aldrich	99+%
Trifosgen	Aldrich	98%
Tymidyna	Pharma Waldhof	97%
Woda amoniakalna	POCh Gliwice	cz.d.a.
Wodorooortofosforan sodu	POCh Gliwice	cz.
Wodorowęglan sodu	POCh Gliwice	cz
Wodzian hydrazyny (80%)	POCh Gliwice	cz

7.2. Aparatura

Widma NMR wykonano na spektrometrze Unity 300 firmy Varian (USA). Widma protonowe (^1H) rejestrowano z częstotliwością operacyjną pola magnetycznego 299,9 MHz z tetrametylosilanem (TMS) jako wewnętrznym wzorcem. Widma fosforowe (^{31}P) rejestrowano z częstotliwością 121,4 MHz z 85% kwasem ortofosforowym jako wzorcem zewnętrznym. Widma fluorowe (^{19}F) rejestrowano z częstotliwością 282,2 MHz z kwasem trifluorooctowym jako wzorcem zewnętrznym. Widmo węglowe (^{13}C) zarejestrowano z częstotliwością 75,4 MHz z TMS jako wewnętrznym wzorcem.

Widma UV wykonano przy użyciu spektrometru DU[®]-65 firmy Beckman (Niemcy). Do odtrytylowania przyłączonego do podłoża trytylowanego nukleozydu używano aparatu do automatycznej syntezy DNA: Gene Assembler Plus firmy Pharmacia LKB (Szwecja).

W celu zmierzenia zawartości wody w rozpuszczalnikach organicznych przeprowadzono miareczkowanie kulometryczne Karla-Fischera na kulometrze Metrohm 684 KF.

Naświetlania wykonano wysokociśnieniową rtęciową lampą łukową o mocy 200 W.

7.3. Techniki ogólne

Chromatografia cienkowarstwowa – TLC

Mieszaniny reakcyjne i związki chemiczne chromatografowano metodą wstępującą w cylindrycznych komorach szklanych, których ścianki wyłożono bibułą zanurzoną w eluencie w celu wysycenia atmosfery jego parami. Chromatogramy rozwijano i analizowano na płytkach analitycznych firmy Merck (Niemcy) pokrytych dwoma rodzajami absorbentu: (i) żelem krzemionkowym 60 HF₂₅₄* (* absorbent zawiera czynnik fluoryzujący przy długości fali światła wzbudzającego 254 nm) stosując następujące eluenty:

- (A) chlorek metylenu;
- (B) chlorek metylenu / metanol (9:1, v/v);
- (C) chlorek metylenu / metanol (97,5:2,5, v/v);
- (D) chlorek metylenu / metanol (95:5, v/v);
- (E) chlorek metylenu / metanol (8:2, v/v);
- (F) chlorek metylenu / heksan (7:3, v/v);
- (G) octan etylu / heksan (1:1, v/v);
- (H) aceton / heksan / trietyloamina (45:45:10, v/v/v);

oraz (ii) żelem krzemionkowym 60 F₂₅₄ silanizowanym, stanowiącym tzw. fazę odwróconą (ang. reverse phase) stosując eluenty:

- (I) aceton / woda (7:3, v/v).

W przypadku stosowania eluentu (H) uprzednio impregnowano płytki roztworem trietyloaminy.

Kolumnowa chromatografia cieczowa

Pochodne nukleozydów i ich 3'-amidofosforyny oraz inne związki pośrednie do ich otrzymywania oczyszczano stosując technikę kolumnowej chromatografii cieczowej. Jako wypełnienia kolumn użyto dwa rodzaje żelu krzemionkowego firmy Merck o następujących uziarnieniach: (i) 0,040-0,063 mm oraz (ii) 0,063-0,200 mm. Związki wymywano z kolumn stosując dwie metody: (i) metodę gradientową, polegającą na zmianie składu procentowego eluentu, a tym samym zmianie siły jego eluowania lub (ii) metodą izokratyczną, w której skład procentowy eluentu nie ulega zmianie. Wykorzystano takie same eluenty jak w przypadku chromatografii cienkowarstwowej.

Powtarzalne procedury laboratoryjne

Do typowego przerobu reakcji używano nasycony roztwór NaHCO_3 i CH_2Cl_2 . Warstwę wodną ekstrahowano trzykrotnie porcjami CH_2Cl_2 .

Organiczne ekstrakty, otrzymywane na drodze przerobu reakcji, sączono przez bezwodny siarczan sodu w celu ich odwodnienia.

Czyste produkty reakcji liofilizowano rozpuszczając je w 1,4-dioksanie lub benzenie, następnie roztwory te zamrażano w ciekłym azocie i prowadzono sublimację rozpuszczalników na linii próżniowej przez kilka do kilkunastu godzin.

7.4. Synteza alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego [41]**Synteza alkoholu α -metylo-piperonylowego [47]**

W kolbie umieszczono wiórki magnezu (2,30 g, 96 mmola) i 50 ml eteru osuszonego nad sodem. Oddzielnie przygotowano roztwór jodku metylu (5 ml, 80 mmola) w 40 ml eteru. Następnie przelano roztwór do wkraplacza zabezpieczonego przed dostępem wilgoci rurką z chlorkiem wapnia. Do kolby wprowadzono 5 ml roztworu jodku metylu w eterze (reakcja powinna rozpocząć się od razu), w przeciwnym razie kolbę ogrzewa się łagodnie na łaźni wodnej. Gdy reakcyjna mieszanina zaczęła lekko wrzeć dodawano pozostały roztwór jodku metylu w eterze, w takim tempie aby utrzymywała lekkie wrzenie (60-90 min). Gdy wrzenie cieczy było zbyt gwałtowne kolbę chłodzono wodą z lodem. Następnie mieszaninę reakcyjną ogrzewano w temperaturze wrzenia na łaźni wodnej przez 30 minut, po tym czasie chłodzono reakcję do temperatury -5°C w potłuczonym lodzie z chlorkiem sodu. Po ochłodzeniu dodano roztwór piperonalu (6 g, 40 mmoli, $R_f(\text{D})_{40}=0,78$) w 40 ml eteru w ciągu 30 minut. Nie należy dopuścić, aby temperatura mieszaniny zwiększyła się powyżej -5°C . Po wkropleniu całkowitej ilości roztworu aldehydu piperonylowego produkt reakcji wylano na 150 g potłuczonego lodu, nadmiar magnezu powinien pozostać w kolbie. Powstały zasadowy jodek magnezu rozpuszczono przez dodanie 15 ml 15% kwasu siarkowego. Następnie warstwę organiczną oddzielono od wodnej i ekstrahowano warstwę wodną czterema porcjami eteru (4x30ml). Połączone roztwory eterowe zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie suszono na lini próżniowej przez noc. Otrzymano 5,86 g alkoholu α -metylo-piperonylowego; wyd. 88%. $R_f(\text{D})_{47}=0,39$

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 6,90-6,78 (m, 3H, 3xCH aromatyczne); 5,95 (s, 2H, OCH_2O); 4,82 (q, 1H, $J=6,28$ Hz, CH alifatyczny); 1,46 (d, 3H, $J=6,28$ Hz, CH_3 alifatyczne)

Synteza octanu α -metylo-piperonylowego [48]

W kolbie umieszczono alkohol α -metylopiperonylowy (5 g, 30 mmoli), bezwodnik kwasu octowego (5,66 ml, 60 mmoli), pirydynę (12 ml, 150 mmoli) i DMAP (0,18 g, 1,5 mmoli). Zawartość kolby mieszano na mieszadle magnetycznym przez 45 minut. Po tym czasie kontrola TLC wykazała całkowite przereagowanie wyjściowego substratu **47**. Zakończono reakcję przez dodanie 5 ml metanolu i pozostawienie reakcji na 15 minut. Następnie dodano 20 ml toluenu i odparowano mieszaninę do zaniku zapachu pirydyny (czynność powtórzono czterokrotnie). Po usunięciu pirydyny dodano 10 ml NaHCO_3 i fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3x20ml). Warstwę organiczną suszono bezwodnym węglanem potasu, po czym zateżono i dalej suszono na linii próżniowej. Oczyszczano na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent chlorek metylenu. Otrzymano 6,14g **48**; wyd 98%; $R_f(\text{D})_{48}=0,70$, $R_f(\text{F})_{48}=0,28$; temp. top. poniżej temperatury otoczenia.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 6,86-6,78 (m, 3H, 3xCH aromatyczne); 5,97-5,95 (m, 2H, OCH_2O); 5,79 (q, 1H, $J=6,28$ Hz, CH alifatyczny); 2,06 (s, 3H, CH_3 alifatyczne); 1,50 (d, 3H, $J=6,28$ Hz, CH_3 alifatyczne)

Synteza octanu α -metylo-6-nitropiperonylowego [49]

W kolbie umieszczono octan α -metylopiperonylowy (3 g, 14 mmoli, $R_f(\text{F})_{48}=0,28$) i dodano bezwodnika kwasu octowego (5,23 ml; 56 mmoli). Mieszaniną ochłodzono do -5°C , dodano stężonego kwasu azotowego (1,2 ml; 28 mmoli). Mieszaninę utrzymywano w temperaturze od -5°C do -1°C przez 30 minut. Po tym czasie analiza TLC wykazała przereagowanie substratu. Dodano 6 ml NaHCO_3 w celu zobojętnienia środowiska reakcji. Warstwę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3x20ml). Połączone ekstrakty suszono bezwodnym siarczanem sodu, a następnie zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt **49** oczyszczano na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent chlorek metylenu / heksan. Otrzymano 2,23 g **49**; wyd. 61%. $R_f(\text{F})_{49}=0,33$; temp. top.=100-101,5°C.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 7,48; 7,02 (2s, 2H, 2xCH aromatyczne); 6,35 (q, 1H, $J=6,28$ Hz, CH alifatyczny); 6,12-6,11 (m, 2H, OCH_2O); 2,08 (s, 3H, CH_3 alifatyczne); 1,59 (d, 3H, $J=6,28$ Hz, CH_3 alifatyczne)

Synteza alkoholu α -metylo-6-nitropiperonylowego [41]

Do octanu α -metylo-6-nitropiperonylowego (1,3g; 5,14 mmola) umieszczonego w kolbie dodano 10 ml metanolu i 10 ml chlorku metylenu w celu dobrego rozpuszczenia substratu. Następnie dodano jeszcze 5 ml metanolu i węglan potasu (3,5g; 25,70 mmola). Po dodaniu soli mieszanina reakcyjna przyjmuje zabarwienie czerwono-pomarańczowe. Przebieg reakcji kontrolowano TLC. Po 45 minutach dodano 4 ml kwasu octowego w celu zobojętnienia reakcji, zabarwienie powróciło do pierwotnego koloru (żółtego). Warstwę nieorganiczną wytrząsano chlorkiem metylenu (3x20ml), a następnie połączone ekstrakty organiczne suszono bezwodnym siarczanem sodu i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt **41** przekryształizowało z mieszaniny chlorek metylenu / heksan (10 ml : 10 ml). Otrzymano 1,06 g **41**; wyd.98 %. $R_f(D)_{41}=0,40$; temp. top.=66-67°C.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 7,46; 7,27 (2s, 2H, 2xCH aromatyczne); 6,12-6,11 (m, 2H, OCH_2O); 5,46 (q, 1H, $J=6,28$ Hz, CH alifatyczny); 1,54 (d, 3H, $J=6,28$ Hz, CH_3 alifatyczne).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 152,41 (C-7); 146,93 (C-6); 141,56 (C-4); 138,95 (C-3); 106,36 (C-8); 105,14 (C-5); 102,92 (C-9); 65,70 (C-1); 24,21 (C-2).

FAB MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 211,1 obliczone dla $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_5$ $M=211,05$.

7.5. Synteza symetrycznego węglanu MeNPO-H [80]

Do trifosgeny (148 mg; 0,5 mmola) rozpuszczonego w 2 ml tetrahydrofuranu dodano alkohol α -metylo-6-nitropiperonylowy (**41**) (316 mg; 1,5 mmola) rozpuszczony w 3 ml tetrahydrofuranu. Mieszaninę reakcyjną mieszano przez 5 minut na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej. Następnie dodano pirydynę (0,163 ml; 1,5 mmola). Po dodaniu pirydyny wytrącił się chlorowodorek pirydyny. Po 1,5 godziny analiza TLC wykazała (chlerek metylenu / metanol, 95:5, v/v) całkowite przereagowanie **41**. Przeprowadzono krótki przerób w celu usunięcia wytworzonego chlorowodoru pirydyny. Mieszaninę odfiltrowano i przesącz zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie mieszaninę reakcyjną odparowano z toluenem w celu usunięcia pirydyny. Do uzyskanego oleju dodano pentafluorofenol (184 mg; 1 mmol) rozpuszczony w 4 ml tetrahydrofuranu, trietyloaminę (0,696 ml; 5 mmola) i szczyptę DMAP. Po jednej godzinie wytworzył się produkt (analiza TLC), reakcja jednak nie zaszła do końca. Reakcję zakończono dodając 2,5 ml wody, następnie fazę wodną ekstrahowano trzykrotnie chlorkiem metylenu. Połączone ekstrakty suszono bezwodnym węglanem potasu i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany

produkt **80** oczyszczano na kolumnie chromatograficznej, stosując jako eluent chlorek metylenu / metanol. Otrzymano 325 mg **80**; wyd. 48%. $R_f(D)_{80}=0,90$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 7,48; 7,47 (2s, 2H, 2xCH aromatyczne); 7,02; 7,00 (2s, 2H, 2xCH aromatyczne); 6,26-6,14 (m, 2H, 2xCH alifatyczne); 6,13-6,09 (m, 4H, 2xOCH₂O); 1,62 (t, 6H, 2xCH₃ alifatyczne).

FAB MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 448,1 g/mol; obliczone dla $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_{11}$ $M=448,08$ g/mol.

7.6. Synteza pochodnej pentafluorofenylo α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej [54]

Synteza **54** przebiegała dwuetapowo. W pierwszej kolejności wytworzono chloromrówczan α -metylo-6-nitropiperonylu (**50**), reakcję prowadzono w temperaturze -2 do -5°C . Rozpuszczono trifosgen (148 mg; 0,5 mmola) w 4 ml eteru dietylowego, następnie dodano 1/3 równoważnika molowego pirydyny (0,054 ml; 0,5 mmola), po 2 minutach dodano pozostałą ilość pirydyny (2/3 równoważnika molowego, 0,108 ml; 1 mmol). Po 10 minutach od momentu dodania całej ilości pirydyny, dodano alkohol α -metylo-6-nitropiperonylowy (316 mg; 1,5 mmola) rozpuszczony w 4 ml eteru dietylowego. Po 15 minutach można było zaobserwować (analiza TLC) całkowite przereagowanie **41**. Przeprowadzono przerób, w celu usunięcia wytworzonego chlorowodoru pirydyny. Reakcję odfiltrowano, zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem i odparowano z toluenem. Następnie przeprowadzono reakcję **50** z pentafluorofenolem (temperatura pokojowa). Do mieszaniny dodano pentafluorofenol (184 mg; 1 mmol) rozpuszczony w 4 ml tetrahydrofuranu, trietyloaminę (0,696 ml; 5 mmola) i szczyptę DMAP. Po godzinie wytworzył się produkt, który obserwowano w obrazie TLC, reakcja jednak nie przebiegła do końca. Dodano ponownie 1 mmol pentafluorofenolu, jednak nie zmieniło to stopnia przereagowania substratu **50**. Reakcję przerobiono przez dodanie 2,5 ml wody, następnie fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3x10ml). Połączone ekstrakty suszono bezwodnym węglanem potasu i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany produkt **54** oczyszczano na kolumnie chromatograficznej, stosując jako eluent chlorek metylenu / metanol. Otrzymano 31 mg **54**; wyd.5 %. $R_f(D)_{54}=0,72$

$^{19}\text{F NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) -77,39; -77,46 (d, 2F, 2xCF_{orto} grupy pentafluorofenylowej); -81,46 (t, 1F, CF_{para} grupy pentafluorofenylowej); -86,15 (t, 2F, 2xCF_{meta} grupy pentafluorofenylowej)

FAB MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 421,0 obliczone dla $\text{C}_{16}\text{H}_8\text{F}_5\text{NO}_7$ $M=421,02$.

7.7. Synteza imidazolidu α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowego (MeNPocI) [42]

W kolbie umieszczono alkohol α -metylo-6-nitropiperonylowy (5 g, 24 mmole) $R_f(G)_{41}=0,40$, który rozpuszczono w 48 ml acetonitrylu. Następnie dodano N,N'-karbonylodiimidazol (11,5 g, 72 mmola). Po godzinie mieszania w temperaturze pokojowej, analiza TLC (faza octan etylu / heksan 1:1, chlorek metylenu / metanol 97,5:2,5) wykazała, całkowite przereagowanie wyjściowego substratu **41**. Po tym czasie do mieszaniny reakcyjnej dodano 50 ml wody. Warstwę wodną wytrząsano trzykrotnie chlorkiem metylenu (3x50ml). Połączone ekstrakty organiczne suszono bezwodnym węglanem potasu i zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany imidazolid α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowy oczyszczono chromatograficznie na żelu krzemionkowym stosując jako eluent chlorek metylenu / octan etylu. Uzyskano 6,94 g **42**; wyd. 96%. $R_f(G)_{42}=0,11$; temp. top.=128,5-130,5°C.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 8,15 (s, 1H, CH aromatyczny grupy imidazolowej); 7,53 (s, 1H, CH aromatyczny grupy MeNPoc); 7,43 (m, 1H, CH aromatyczny grupy imidazolowej); 7,09 (m, 1H, CH aromatyczny grupy imidazolowej); 7,01 (s, 1H, CH aromatyczny grupy MeNPoc); 6,61 (q, 1H, $J=6,28$ Hz, CH alifatyczny grupy MeNPoc); 6,14 (m, 2H, OCH_2O grupy MeNPoc); 1,80 (d, 3H, $J=6,28$ Hz, CH_3 alifatyczne grupy MeNPoc);

FAB MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 305,1 obliczone dla $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_6$ $M=305,06$.

7.8. Synteza N-metyloimidazolidu α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowego [43]

a. Metylowanie imidazolidu α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowego trifluoro sulfonianem metylu

Rozpuszczono imidazolid α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowy (30,5 mg; 0,1 mmola) w 0,2 ml nitrometanu. Dodano trifluorometanosulfonianu metylu (10,18 μl ; 0,09 mmola). Przebieg metylowania obserwowano za pomocą protonowego rezonansu magnetycznego. Reakcja metylowania związku **42** była praktycznie natychmiastowa. Na widmie $^1\text{H NMR}$ można było zaobserwować sygnał pochodzący od grupy metylowej **43** przy, $\delta=4,13$ ppm. Metylowa pochodna imidazolidu α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowego **43** nie była izolowana, ani oczyszczana. Wytwarzano ją na potrzeby reakcji otrzymywania nukleozydów blokowanych na zasadzie grupami kompatybilnymi z fotolabilną grupą ochronną MeNPoc.

b. Metylowanie imidazolidu α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowego siarczanem dimetylu

Rozpuszczono imidazolid α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowy (30,5 mg; 0,1 mmola) w 0,2 ml nitrometanu. Dodano siarczan dimetyl (19 μ l; 0,2 mmola). Przebieg metylowania obserwowano za pomocą protonowego rezonansu magnetycznego. Po 30 minutach można było zaobserwować całkowite metylowanie **42**. Na widmie ^1H NMR można było zaobserwować sygnał pochodzący od grupy metylowej **43** przy $\delta=4,13$ ppm. Metylowa pochodna imidazolidu α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowego **43** nie była izolowana, ani oczyszczana. Wytwarzano ją na potrzeby reakcji otrzymywania nukleozydów blokowanych na zasadzie grupami kompatybilnymi z fotolabilną grupą ochronną MeNPoc.

^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 9,88 (s, 1H, CH aromatyczny grupy N-metyloimidazolowej); 7,78 (m, 1H, CH aromatyczny grupy N-metyloimidazolowej); 7,47 (s, 1H, CH aromatyczny grupy MeNPoc); 7,44 (m, 1H, CH aromatyczny grupy N-metyloimidazolowej); 7,35 (s, 1H, CH aromatyczny grupy MeNPoc); 6,71 (q, 1H, $J=6,28$ Hz, CH alifatyczny grupy MeNPoc); 6,14 (m, 2H, OCH_2O grupy MeNPoc); 4,13 (s, 3H, CH_3 alifatyczne grupy N-metyloimidazolowej); 1,87 (d, 3H, $J=6,28$ Hz, CH_3 alifatyczne grupy MeNPoc).

7.9. Synteza nukleozydów z grupami aminowymi blokowanymi grupami kompatybilnymi z fotolabilną grupą ochronną MeNPoc**Synteza 6-N-fenoksyacetylodeoksyadenozyny ($\text{dA}^{\text{Facy}235}$) [44A]**

Odparowano deoksyadenozynę (2,5 g; 10 mmola) trzykrotnie po 15 ml z bezwodną pirydyną. Następnie odparowaną deoksyadenozynę rozpuszczono w 40 ml pirydyny. Dodano jednorazowo chlorku trimetylosililowego (6,3 ml; 50 mmoli). Mieszaninę reakcyjną mieszano jedną godzinę w temperaturze pokojowej.

W drugiej kolbie rozpuszczono kwas fenoksyoctowy (1,8 g; 12 mmola) w 10 ml acetonitrylu. Następnie dodano trzema porcjami N,N'-karbonylodiimidazol (1,95 g; 12 mmoli) i mieszano jedną godzinę. Po godzinie mieszaninę dodano do wytworzonej równocześnie blokowanej 3',5'-O-ditrimetylosiloksydeoksyadenozyny. Reakcję pozostawiono przez noc w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji analizowano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Po zakończeniu reakcji odparowano pirydynę do 1/3 objętości. Dodano 20 ml NaHCO_3 , następnie fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3x40 ml). Fazę

organiczną suszono bezwodnym siarczanem sodu, zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem i suszono na lini próżniowej. Otrzymano 3g (7,7 mmola) **44A**; wyd. 77%. $R_f(B)_{44A}=0,44$

1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 10,92 (s, 1H, C(6)-NH); 8,70 (s, 1H, H-2); 8,68 (s, 1H, H-8); 7,41-7,27 (m, 2H, 2xCH aromatyczne grupy fenoksyacetylowej); 6,98-6,93 (m, 3H, 3xCH aromatyczne grupy fenoksyacetylowej); 6,45 (t, 1H, $J=5,2$ Hz; H-1'); 5,36-5,35 (d, 1H, OH-3'); 5,03 (s, 2H, CH₂ alifatyczne grupy fenoksyacetylowej); 4,47-4,41 (m, 1H, H-3'); 3,91-3,87 (m, 1H, H-4'); 3,69-3,49 (m, 2H, H-5',5''); 2,82-2,73 (m, 1H, H-2'); 2,38-2,31 (m, 1H, H-2'').

Synteza 4-N-izobutyrylodeoksytydyny (dC^{i-Bu}) [44C]

Deoksytydynam (227 mg; 1 mmol) odparowano dwukrotnie z bezwodną pirydyną, następnie rozpuszczono w 5 ml bezwodnej pirydyny. Dodano chlorek trimetylosililu (0,64 ml; 5 mmoli). Po 50 minutach dodano chlorek izobutyrylu (0,21 ml; 2 mmole). Po około dwóch godzinach od momentu dodania chlorku izobutyrylu, pobrano 20 μ l mieszaniny i przeprowadzono próbę hydrolizy dodając taką samą ilość wody. Analiza TLC po 10 minutach wykazała utworzenie produktu, jak również, częściowe zdjęcie blokad silylowych z pozycji 3' i 5' blokowanej deoksytydyny. Do mieszaniny dodano 1,5 ml wody i po 10 minutach 1,5 ml stężonego roztworu amoniaku. Pozostawiono przez noc w lodówce. Przerobiono ekstrahując fazę wodną chlorkiem metylenu (3x10 ml), ekstrakty suszono bezwodnym siarczanem sodu, następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Oczyszczano na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent chlorek metylenu / metanol. Otrzymano 160 mg **44C**; wyd.54%. $R_f(B)_{44C}=0,19$, $R_f(E)_{44C}=0,43$

1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 10,83 (s, 1H, C(4)-NH); 8,33-8,31 (d, 1H, $J=5,7$ Hz; H-6); 7,25-7,23 (d, 1H, $J=5,7$ Hz; H-5); 6,10 (t, 1H, $J=5,0$ Hz; H-1'); 5,27-5,29 (d, 1H, $J=3,4$ Hz; OH-3'); 5,05 (t, 1H, $J=3,8$ Hz; OH-5'); 4,24-4,18 (m, 1H, H-3'); 3,87-3,84 (m, 1H, H-4'); 3,66-3,52 (m, 2H, H-5',5''); 2,76-2,67 (m, 1H, CH grupy izobutyrylowej); 2,32-2,25 (m, 1H, H-2'); 2,05-1,97 (m, 1H, H-2''); 1,07-1,05 (d, 6H, $J=5,0$ Hz, 2xCH₃ grupy izobutyrylowej);

Synteza 2-N-izobutyrylodeoksyguanozyny (dG^{i-Bu}) [44G]

Deoksyguanozynę (2,67 g; 10 mmol) odparowano dwukrotnie z bezwodną pirydyną, następnie rozpuszczono w 50 ml bezwodnej pirydyny. Wkraplając dodano chlorek trimetylosililu (6,4 ml; 50 mmoli). Po wkropleniu całkowitej ilości chlorku trimetylosililu deoksyguanozyna uległa rozpuszczeniu, z równoczesnym wytrąceniem się chlorowodoru

pirydyny. Po 90 minutach dodano chlorek izobutyrylu (2,1 ml; 20 mmola). Po około trzech godzinach od momentu dodania chlorku izobutyrylu, pobrano 20 μ l mieszaniny i przeprowadzono próbę hydrolizy dodając taką samą ilość wody. Analiza TLC po 10 minutach wykazała utworzenie produktu, jak również, częściowe zdjęcie blokad sililowych z pozycji 3' i 5' blokowanej deoksyguanozyny. Do mieszaniny dodano 10 ml wody i po 10 minutach 10 ml stężonego roztworu amoniaku. Pozostawiono przez noc w lodówce. Na drugi dzień odparowano, a pozostałość rozpuszczono w 50 ml wody. Następnie do mieszaniny dodano eter dietylowy i octan etylu (1:1) razem 50 ml. Po wytrząśnięciu w fazie wodnej wytrącił się osad **44G**. Osad przesączono. Przesącz zateżono, po czym wytrąciła się dalsza porcja **44G**. Osady połączono. Otrzymano 2,8g **44G**; wyd. 83%. $R_f(E)_{44G}=0,35$

1H NMR (DMSO- d_6): δ (ppm) 12,06 (s, 1H, NH-1); 11,68 (s, 1H, C(2)-NH); 8,22 (s, 1H, H-8); 6,20 (t, 1H, J=5,9 Hz; H-1'); 5,34 (bs, 1H, OH-3'); 4,97 (bs, 1H, OH-5'); 4,37 (bs, 1H, H-3'); 3,85-3,81 (m, 1H, H-4'); 3,59-3,47 (m, 2H, H-5',5''); 2,83-2,70 (m, 1H, CH grupy izobutyrylowej); 2,59-2,48 (m, 1H, H-2''); 2,30-2,23 (m, 1H, H-2''); 1,23-1,10 (d, 6H, J=6,5 Hz, 2xCH₃ grupy izobutyrylowej);

7.10. Synteza pochodnych nukleozydów blokowanych na funkcji 5'-OH grupą α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylową

Synteza 6-N-fenoksyacetylo 5'- α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylo deoksyadenozyny (MeNPocdA^{Fac}) [45A]

Rozpuszczono MeNPocI (**42**) (1,14 g; 3,75 mmola) w 3,75 ml nitrometanu. Dodano siarczan dimetylu (0,71 ml; 7,5 mmola). Po 30 minutach dodano 0,25 ml pirydyny i pozostawiono na 15 minut w celu dezaktywacji nieprzereagowanego reagenta metylującego. Po tym czasie do mieszaniny dodano 6-N-fenoksyacetylodeoksyadenozynę (1 g; 2,5 mmola) rozpuszczoną w 4 ml pirydyny. Przed dodaniem dA^{Fac} odparowano trzykrotnie z bezwodną pirydyną. Po 30 minutach analiza TLC wykazała przereagowanie N-6- fenoksyacetylodeoksyadenozyny. Do mieszaniny reakcyjnej dodano 5 ml NaHCO₃ aq. Warstwę nieorganiczną wytrząsano trzykrotnie z chlorkiem metylenu (3x10ml). Połączone ekstrakty organiczne suszono bezwodnym siarczanem sodu i zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany związek **45A** oczyszczono chromatograficznie na żelu krzemionkowym stosując jako eluent chlorek metylenu / metanol. Uzyskano 0,76 g **45A** ; wyd. 48%. $R_f(B)_{45A}=0,54$

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 10,94 (s, 1H, C(6)-NH); 8,69 (s, 1H, H-2); 8,68 (s, 1H, H-8); 7,33-7,21 (m, 3H, 2xCH aromatyczne grupy fenoksyacetylowej, 1xCH aromatyczny grupy MeNPoc); 6,98-6,93 (m, 4H, 3xCH aromatyczne grupy fenoksyacetylowej, 1xCH aromatyczny grupy MeNPoc); 6,86-6,85 (m, 2H, OCH₂O grupy MeNPoc); 6,84-6,83 (m, 1H, CH alifatyczny grupy MeNPoc); 6,49 (t, 1H, J=5,0 Hz; H-1'); 5,03 (s, 2H, CH₂ alifatyczne grupy fenoksyacetylowej); 4,54-4,50 (m, 1H, H-3'); 4,33-4,31 (m, 1H, H-4'); 4,13-4,06 (m, 2H, H-5',5''); 3,17-3,16 (d, 1H, J=3,8 Hz; OH-3'); 2,92-2,83 (m, 1H, H-2'); 2,44-2,36 (m, 1H, H-2''); 1,56-1,53 (m, 3H, CH₃ alifatyczne grupy MeNPoc).

Procedura uzyskania pozostałych pochodnych nukleozydów blokowanych na funkcji 5'-OH grupą α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylową jest taka sama. W tabeli poniżej umieszczono ilości substratów wymagane do otrzymania **45 C, G, T**.

	[45A]	[45C]	[45G]	[45T]
MeNPocI (42)	1,14 g; 3,75 mmola	2,02 g; 6,6 mmola	2,75 g; 9 mmoli	3,66 g; 12 mmoli
nitrometan	3,75 ml	6,6 ml	9 ml	12 ml
siarczan dimetylu	0,71 ml; 7,5 mmola	1,25 ml; 13 mmola	1,71 ml; 18 mmola	2,27 ml; 24 mmola
pirydyna	0,25 ml	0,3 ml	1 ml	2 ml
A ^{FAc}	1 g; 2,5 mmola (4 ml pirydyny)	-	-	-
C ^{i-Bu}	-	1,3 g; 4,4 mmola (5 ml pirydyny)	-	-
G ^{i-Bu}	-	-	2 g; 6 mmoli (6 ml pirydyny)	-
T	-	-	-	2 g; 8,3 mmola (8 ml pirydyny)
czas reakcji	30 min.	1 godz.	1 godz.	1 godz.
NaHCO ₃ aq	5 ml	8 ml	10 ml	10 ml
masa produktu	0,76 g	0,96 g	1,90 g	3,06 g
wydajność	48 %	41 %	56 %	77 %
R _f (B)	0,54	0,44	0,41	0,52

Analiza NMR **45C**

$^1\text{H NMR}$ (CDCl₃): δ (ppm) 10,86 (s, 1H, C(4)-NH); 8,01-7,93 (m, 1H, H-6); 7,58-7,54 (m, 1H, CH aromatyczny grupy MeNPoc); 7,22-7,14 (m, 2H, H-5, CH aromatyczny grupy MeNPoc); 6,24-6,23 (m, 2H, OCH₂O grupy MeNPoc); 6,15-5,98 (m, 2H, H-1', CH alifatyczny grupy MeNPoc); 5,47-5,45 (d, 1H, J=3,4 Hz; OH-3'); 4,33-4,23 (m, 2H, H-5',5''); 4,22-4,14 (m, 1H, H-3'); 4,02-3,95 (m, 1H, H-4'); 2,76-2,67 (m, 1H, CH grupy

izobutyrylowej); 2,33-2,24 (m, 1H, H-2'); 2,12-2,01 (m, 1H, H-2''); 1,60-1,57 (m, 3H, CH₃ alifatyczne grupy MeNPoc); 1,09-1,05 (d, 6H, J=5,0 Hz; 2xCH₃ grupy izobutyrylowej);

Analiza NMR **45G**

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 8,52-8,47 (m, 1H, C(2)-NH); 8,06-8,01 (m, 1H, H-8); 7,43 (s, 1H, CH aromatyczny grupy MeNPoc); 7,23 (s, 1H, CH aromatyczny grupy MeNPoc); 6,12-6,08 (m, 2H, H-1', CH alifatyczny grupy MeNPoc); 6,05-6,03 (m, 2H, OCH₂O grupy MeNPoc); 5,09-5,03 (m, 1H, OH-3'); 4,54-4,23 (m, 2H, H-5',5''); 4,14-4,13 (m, 1H, H-3'); 4,04-3,96 (m, 1H, H-4'); 2,98-2,80 (m, 1H, CH grupy izobutyrylowej); 2,58-2,52 (m, 1H, H-2'); 2,16-2,03 (m, 1H, H-2''); 1,55-1,53 (d, 3H, J=6,2 Hz, CH₃ alifatyczne grupy MeNPoc); 1,23-1,21 (d, 6H, J=6,8 Hz, 2xCH₃ grupy izobutyrylowej).

Analiza NMR **45T**

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,49-7,48 (m, 1H, CH aromatyczny grupy MeNPoc); 7,34-7,31 (m, 1H, H-6); 7,00-6,99 (m, 1H, CH aromatyczny grupy MeNPoc); 6,32-6,27 (m, 2H, H-1', CH alifatyczny grupy MeNPoc); 6,13-6,12 (m, 2H, OCH₂O grupy MeNPoc); 4,49-4,40 (m, 1H, H-3'); 4,39-4,28 (m, 2H, H-5',5''); 4,13-4,08 (m, 1H, H-4'); 2,45-2,34 (m, 1H, H-2'); 2,26-2,11 (m, 1H, H-2''); 1,91-1,90 (m, 3H, C(5)-CH₃); 1,67-1,66 (m, 3H, CH₃ alifatyczne grupy MeNPoc);

7.11. Synteza amidofosforynów nukleozydów blokowanych na funkcji 5'-OH grupą α-metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylową

Synteza 6-N-fenoksyacetylo 5'-α-metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylo deoksyadenozyn-3'-ylo amidofosforynu (FAMeNPocdA^{Fac}) [46A]

W kolbie umieszczono MeNPocdA^{Fac} (**45A**) (0,76 g; 1,19 mmola) i rozpuszczono w 4 ml bezwodnego chlorku metylenu i 4 ml acetonitrylu. Następnie dodano N,N,N',N'-tetraizopropylodiaminofosforyn 2-cyjanoetylu (0,42 ml; 1,31 mmola) i tetrazol (83,3 mg; 1,19 mmola) w trzech porcjach w odstępach dwuminutowych. W celu dobrego wysuszenia substratów wyjściowych, tetrazol i **45A** suszono przez noc na linii próżniowej. Zawartość kolby mieszano na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą TLC w fazie aceton / heksan / trietyloamina (45:45:10, v/v). Po

godzinie reakcję zakończono dodając 6 ml NaHCO₃ aq. Warstwę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3x10ml). Ekstrakty organiczne suszono bezwodnym siarczanem sodu, a następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt **46A** oczyszczono na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent heksan / trietyloamina / octan etylu. Czysty związek liofilizowano z benzenu. Uzyskano 0,47g **46A**, wyd. 46,5%. R_f(H)_{46A}=0,47

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 9,42 (s, 1H, C(6)-NH); 8,71 (s, 1H, H-2); 8,19 (s, 1H, H-8); 7,30-7,24 (m, 2H, 2xCH aromatyczne grupy MeNPoc); 7,21-7,15 (m, 2H, 2xCH aromatyczne grupy fenoksyacetylowej); 7,00-6,96 (m, 3H, 3xCH aromatyczne grupy fenoksyacetylowej); 6,92-6,87 (m, 2H, OCH₂O grupy MeNPoc); 6,81-6,77 (m, 1H, CH alifatyczny grupy MeNPoc); 6,43-6,37 (m, 1H, H-1'); 4,79 (s, 2H, CH₂ alifatyczne grupy fenoksyacetylowej); 4,58-4,55 (m, 1H, H-3'); 4,46-4,38 (m, 2H, H-5',5''); 4,36-4,27 (m, 1H, H-4'); 3,86-3,65 (m, 2H, CH₂ grupy cyjanoetylowej); 3,63-3,51 (m, 2H, 2xCH grupy izopropylowej); 2,86-2,66 (m, 1H, H-2'); 2,63-2,55 (m, 3H, H-2'', CH₂ grupy cyjanoetylowej); 1,53-1,50 (m, 3H, CH₃ alifatyczne grupy MeNPoc); 1,14-1,12 (m, 12H, 4xCH₃ grupy izopropylowej).

³¹P NMR (CDCl₃): δ (ppm) +149,234; +149,143.

Procedura uzyskania pozostałych amidofosforynów jest taka sama. W tabeli poniżej umieszczono ilości substratów wymagane do otrzymania **46 C, G, T**.

	[46A]	[46C]	[46G]	[46T]
MeNPocdA ^{FAc} (45A)	0,76 g; 1,19 mmola	-	-	-
MeNPocdC ^{i-Bu} (45C)	-	0,96 g; 1,79 mmola	-	-
MeNPocdGi ^{i-Bu} (45G)	-	-	1,48 g; 2,57 mmola	-
MeNPocT (45T)	-	-	-	3 g; 6,30 mmola
chlorek metylenu	4 ml	10 ml	14 ml	30 ml
acetonitryl	4 ml	-	-	-
N,N,N',N'-tetraizo propylodiamino fosforyn-2-cyjanoetylu	0,42 ml; 1,31 mmola	0,63 ml; 1,97 mmola	0,90 ml; 2,28 mmola	2,2 ml; 6,90 mmola
tetrazol	83,3 mg; 1,19 mmola	130 mg; 1,79 mmola	180 mg; 2,57 mmola	440 mg; 6,30 mmola
czas reakcji	1 godz.	2 godz.	1 godz.	1 godz.
NaHCO ₃ aq	6 ml	8 ml	10 ml	15 ml
masa produktu	0,46 g	1,17 g	1,51 g	3,6 g
wydajność	46,5 %	89 %	76 %	86 %
R _f (H)	0,47	0,44	0,16	0,49

Analiza NMR 46C

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 8, 27 (s, 1H, C(4)-NH); 7,91-7,85 (m, 1H, H-6); 7,45-7,39 (m, 1H, CH aromatyczny grupy MeNPoc); 7,33-7,29 (m, 1H, H-5); 6,94-6,93 (m, 1H, CH aromatyczny grupy MeNPoc); 6,26-6,12 (m, 2H, H-1', CH alifatyczny grupy MeNPoc); 6,10-6,02 (m, 2H, OCH₂O grupy MeNPoc); 4,46-4,18 (m, 4H, H-5',5'', H-3', H-4'); 3,85-3,61 (m, 2H, CH₂ grupy cyjanoetylowej); 3,59-3,45 (m, 2H, 2xCH grupy izopropylowej); 2,75-2,45 (m, 4H, CH grupy izobutyrylowej, CH₂ grupy cyjanoetylowej, H-2'); 2,11-2,00 (m, 1H, H-2''); 1,60-1,57 (m, 3H, CH₃ alifatyczne grupy MeNPoc); 1,22-1,08 (m, 18H, 2xCH₃ grupy izobutyrylowej, 4xCH₃ grupy izopropylowej).

³¹P NMR (CDCl₃): δ (ppm) +149,483; +149,219.

Analiza NMR 46G

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 8,92 (bs, 1H, C(2)-NH); 7,68; 7,66; 7,62; 7,60 (4s, 1H, H-8); 7,39-7,37 (m, 1H, CH aromatyczny grupy MeNPoc); 6,96; 6,92; 6,85; 6,82 (4s, 1H, CH aromatyczny grupy MeNPoc); 6,25-6,18 (m, 1H, H-1'); 6,15-6,07 (m, 3H, OCH₂O grupy MeNPoc, CH alifatyczny grupy MeNPoc); 4,79-4,21 (m, 4H, H-3', H-4', H-5',5''); 3,91-3,63 (m, 2H, CH₂ grupy cyjanoetylowej); 3,61-3,47 (m, 2H, 2xCH grupy izopropylowej); 2,91-2,67 (m, 3H, CH grupy izobutyrylowej, CH₂ grupy cyjanoetylowej); 2,58-2,52 (m, 1H, H-2'); 2,50-2,35 (m, 1H, H-2''); 1,56-1,53 (m, 3H, CH₃ alifatyczne grupy MeNPoc); 1,22-1,06 (m, 18H, 2xCH₃ grupy izobutyrylowej, 4xCH₃ grupy izopropylowej).

³¹P NMR (CDCl₃): δ (ppm) +148,887; +148,729.

Analiza NMR 46T

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,42-7,40 (m, 1H, CH aromatyczny grupy MeNPoc); 7,29-7,22 (m, 1H, H-6); 6,94-6,93 (m, 1H, CH aromatyczny grupy MeNPoc); 6,28-6,19 (m, 2H, H-1', CH alifatyczny grupy MeNPoc); 6,06-6,05 (m, 2H, OCH₂O grupy MeNPoc); 4,50-4,35 (m, 1H, H-3'); 4,33-4,24 (m, 2H, H-5',5''); 4,21-4,03 (m, 1H, H-4'); 3,85-3,62 (m, 2H, CH₂ grupy cyjanoetylowej); 3,57-3,48 (m, 2H, 2xCH grupy izopropylowej); 2,61-2,53 (m, 2H, CH₂ grupy cyjanoetylowej); 2,52-2,33 (m, 1H, H-2'); 2,20-2,02 (m, 1H, H-2''); 1,83 (s, 3H, C(5)-CH₃); 1,59-1,57 (d, 3H, J=6,2; CH₃ alifatyczne grupy MeNPoc); 1,13-1,09 (m, 12H, 4xCH₃ grupy izopropylowej).

³¹P NMR (CDCl₃): δ (ppm) +149,013, +148,791.

7.12. Odblokowanie grupy α -metylo-6-nitropiperonyloksykarbonylowej (MeNPoc) z pochodnych nukleozydów 45A, 45C, 45G, 45T pod wpływem światła UV

Próbkę 0,8 mg **45A** [**45C**, **45G**, **45T**] umieszczono w probówce Ependorfa. Następnie dodano 0,5 ml metanolu (lub dioksanu) Rozpuszczony związek **45A** [**45C**, **45G**, **45T**] poddano naświetlaniu wysokociśnieniową rtęciową lampą łukową o mocy 200. Pomiedzy lampą, a naświetlaną próbką umieszczono szybę ze szkła pyreksowego, które pochłania promieniowanie o długości fali poniżej 320 nm. Po 20 minutach naświetlania analiza TLC wykazała całkowite odblokowanie **45C**, z wytworzeniem odpowiedniego nukleozydu **44C**. W przypadku odblokowania **45A**, **45G**, **45T** konieczne było wydłużenie czasu naświetlania do jednej godziny. Uzyskano odpowiednio nukleozydy **44A**, **44G**, **44T**. Identyczność nukleozydów potwierdzono za pomocą analizy TLC.

7.13. Synteza oligonukleotydów metodą H-fosfonianową

Do syntezy użyto kolumnę, którą wykorzystuje się do syntezy oligonukleotydu na podłożu stałym na syntetyzerze DNA. Umieszczono w niej 10 mg podłoża „Primer” z załadowaną 5'-O-dimetoksytrytylotymidyną. Następnie przeprowadzono operacje zestawione w tabeli poniżej.

Nr operacji	Funkcja	Objętość użytych reagentów [ml]	Czas [min]
1	Odtrytylowanie na syntetyzerze (101)* (3% kwas dichlorooctowy)		
2	Przemycie acetonitrylem	3 x 1	3
2	Fosfonylacja: 0,5 M (PhO) ₂ P(O)H w pirydynie	2 x 0,5	2 x 5
3	Przemycie acetonitrylem	3 x 1	3
4	Hydroliza: Py-H ₂ O 9:1	0,5	30
5	Przemycie acetonitrylem, odwirowanie kolumny, przemycie acetonitrylem	3 x 1 3 x 1	3 3
6	Kondensacja: 0,1 M DMTrT w pirydynie 0,3 M chlorek piwaloilu w acetonitrylu	0,3 0,3	6
7	Przemycie acetonitrylem	3 x 1	3
8	Odtrytylowanie na syntetyzerze (82)* (3% kwas dichlorooctowy)		

* Odczyt względnej ilości kationu dimetoksytrytylowego (DMT⁺)

7.14. Synteza p-chlorofenylo dichlorofosforanu ²³⁶ [63]

W kolbie umieszczono p-chlorofenol (32g; 0,25 mola), magnez (0,6g; 0,025mola) i dodano chlorek fosforylu (26ml, 0,28 mmola). Mieszaninę ogrzewano przez cztery godziny w temperaturze wrzenia pod chłodnicą zwrotną, której wylot był zabezpieczony pompką wodną, w celu odciążenia wydzielających się dużych ilości chlorowodoru. Po tym czasie przeprowadzono destylację pod próżnią. Zbierano frakcje przy 162-165°C, ciśnienie 3 mb. Otrzymano 29 ml **63**, wyd. 72%

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,21-7,15 (m, 2H, CH), 6,78-6,73 (m, 2H, CH).

³¹P NMR (CDCl₃): δ (ppm) 3,74

7.15. Synteza 2-(2,4-dinitrofenylo)etanolu [72]

W pierwszej kolejności otrzymano dymiący kwas azotowy o gęstości 1,52 g/cm³.²³⁷ Do kolby 1 L wiano 200 ml stężonego kwasu siarkowego i 200 ml stężonego kwasu azotowego (d=1,42 g/cm³). Następnie mieszaninę destylowano. Zbierano pierwszą frakcję w ilości ok. 100 ml użytego do destylacji stężonego kwasu azotowego.

53 ml świeżo otrzymanego stężonego kwasu azotowego (d=1,52 g/cm³) umieszczono w kolbie 1 L i ochłodzono do temperatury -10°C. Po ochłodzeniu dodano 44 ml stężonego kwasu siarkowego. W temperaturze -10°C mieszanina była pozostawiona jedną godzinę. Następnie dodano 10 g octanu feniloetylowego. Mieszanina reakcyjna była utrzymywana w temperaturze -10°C jeszcze przez jedną godzinę. Po tym czasie mieszaninę doprowadzono do 0°C w ciągu godziny i w tej temperaturze pozostawiono przez pięć godzin. Mieszaninę wylano na 200 g potłuczonego lodu i przemyto 400 ml eteru. Fazę eterową przemyto nasyconym wodorowęglanem sodu, następnie suszono bezwodnym siarczanem sodu. Fazę eterową zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. W następnej kolejności do powstałego oleju dodano 5% HCl w 10 ml metanolu. Po dodaniu kwasu mieszaninę ogrzewano cztery godziny. Następnie ostudzono i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Powstały produkt **72** wstępnie oczyszczono na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent chlorek metylenu / metanol, a następnie przekrystalizowano z 200 ml czterochlorku węgla z dodatkiem niewielkiej ilości etanolu. Otrzymano 7,2 g **72**; wyd. 55%. R_f(D)₇₂=0,35; temp.top.=67-68°C.

^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 8,78 (s, 1H, CH aromatyczny); 8,40-8,37 (d, 1H, $J=8,3$ Hz, CH aromatyczny); 7,70-7,68 (d, 1H, $J=8,3$ Hz, CH aromatyczny); 4,00 (t, 2H, $J=5,9$ Hz, CH_2 alifatyczne); 3,28 (t, 2H, $J=5,9$ Hz, CH_2 alifatyczne).

7.16. Synteza monofunkcyjnych czynników fosforylujących

Synteza p-chlorofenylo pirydynylo fosforanu [64]

W kolbie na 5 ml umieszczono 1,5 ml suchego chlorku metylenu i 485 μl bezwodnej pirydyny (6 mmoli). Następnie dodano p-chlorofenylo dichlorofosforan (164 μl ; 1 mmola) i wodę (16 μl ; 0,9 mmoli). Po dodaniu wody mieszanina rozgrzała się. W miarę ochładzania się mieszaniny wytrącał się chlorowodorek pirydyny. Widmo ^{31}P NMR po 10 minutach potwierdziło powstanie p-chlorofenylo pirydynylo fosforanu (**64**).

^{31}P NMR (CDCl_3): δ (ppm) $-10,86$.

Synteza p-chlorofenylo 2-cyanoetylo fosforanu [67]

Do świeżo przygotowanego p-chlorofenylo pirydynylo fosforanu (**64**) (10 mmoli) dodano 2-cyanoetanol (0,815 ml; 12 mmoli) rozpuszczony w 10 ml bezwodnej pirydyny. Przed reakcją 2-cyanoetanol został odparowany z bezwodną pirydyną (2x5ml). Po godzinie analiza TLC potwierdziła całkowite przereagowanie substratów. Otrzymany produkt **67** analizowano również za pomocą widma ^{31}P NMR. Sygnał pochodzący od atomu fosforu otrzymanego związku **67** wykazywał przesunięcie chemiczne $\delta = -5,28$ ppm. Następnie mieszaninę reakcyjną przerobiono dodając 10 ml NaHCO_3 aq. Fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3x15ml). Połączone ekstrakty organiczne zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Związek **67** oczyszczano na kolumnie chromatograficznej w fazie odwróconej stosując jako eluent aceton/woda. Otrzymano 1,6g **67**; wyd. 67%. $R_f(\text{B})_{67}=0,33$ (płytko impregnowana trietyloaminą).

^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 8,78-8,77 (m, 1H, CH grupy p-chlorofenyłowej); 7,92-7,87 (m, 1H, CH grupy p-chlorofenyłowej); 7,24-7,15 (m, 2H, 2xCH grupy p-chlorofenyłowej); 4,27-4,20 (t, 2H, $J=5,98$ Hz, CH_2 grupy cyanoetyłowej); 2,75-2,71 (t, 2H, $J=5,98$ Hz, CH_2 grupy cyanoetyłowej).

^{31}P NMR (CDCl_3): δ (ppm) $-5,28$.

Synteza p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo fosforanu [68]

Do świeżo przygotowanego p-chlorofenylo pirydynylo fosforanu (**64**) (10 mmoli) dodano 2-(2,4-dinitrofenylo)etanol (1,06 g; 5 mmoli) rozpuszczony w 5 ml bezwodnej pirydyny. Przed reakcją 2-(2,4-dinitrofenylo)etanol został odparowany z pirydyną (2x10ml). Po godzinie analiza TLC wykazała całkowite przereagowanie substratu. Analiza ^{31}P NMR mieszaniny reakcyjnej wykazała pojawienie się sygnału $\delta = -5,70$ ppm pochodzącego od produktu **68**. Mieszaninę reakcyjną przerobiono dodając 5 ml buforu fosforanowego o pH=7. Fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3x15 ml). Połączone ekstrakty suszono bezwodnym siarczanem sodu, a następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Oczyszczano na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent chlorek metylenu / metanol. Otrzymano 0,85 g **68**; wyd. 42 %. $R_f(\text{B})_{68}=0,36$ (płytką impregnowaną trietyloaminą).

^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 8,57 (s, 1H, CH aromatyczny grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej); 8,12 (bs, 1H, CH aromatyczny grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej); 7,63 (bs, 1H, CH aromatyczny grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej); 7,06-7,00 (m, 4H, 4xCH grupy p-chlorofenylowej); 4,20 (m, 2H, CH_2 alifatyczne grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej); 3,01 (m, 2H, CH_2 alifatyczne grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej).

^{31}P NMR (CDCl_3): δ (ppm) -5,70.

Synteza p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo fosforanu [69]

Do świeżo przygotowanego p-chlorofenylo pirydynylo fosforanu (**64**) (5 mmoli) dodano alkohol α -metylo-6-nitropiperonylowy (**41**) (422 mg; 2 mmole) rozpuszczony w 2 ml bezwodnej pirydyny. Przed reakcją alkohol α -metylo-6-nitropiperonylowy został odparowany z bezwodną pirydyną (2x2ml). Po godzinie analiza TLC wykazała całkowite przereagowanie substratu. Analiza ^{31}P NMR mieszaniny reakcyjnej wykazała pojawienie się sygnału $\delta = -5,90$ ppm pochodzącego od produktu **69**. Mieszaninę reakcyjną przerobiono dodając 5 ml NaHCO_3 aq. Fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3x10ml). Połączone ekstrakty suszono bezwodnym siarczanem sodu, a następnie zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Oczyszczano na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent chlorek metylenu / metanol. Otrzymano 526 mg **69**; wyd. 66 %. $R_f(\text{B})_{69}=0,41$ (płytką impregnowaną trietyloaminą).

^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 7,21 (bs, 1H, CH aromatyczny grupy α -metylo-6-nitropiperonylowej); 6,98-6,85 (m, 5H, CH aromatyczny grupy α -metylo-6-nitropiperonylowej,

4xCH grupy p-chlorofenylovej); 5,96 (bs, 2H, OCH₂O grupy α-metylo-6-nitropiperonylovej); 3,76-3,69 (q, 1H, CH alifatyczny grupy α-metylo-6-nitropiperonylovej); 1,54-1,52 (d, 3H, CH₃ alifatyczne grupy α-metylo-6-nitropiperonylovej).

³¹P NMR (CDCl₃): δ (ppm) –5,90.

7.17. Synteza fosfortriestrów z monofunkcyjnymi czynnikami fosforylującymi

Synteza p-chlorofenylo 2-cyanoetylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu [73]

p-chlorofenylo 2-cyanoetylo fosforan (**67**) (390 mg; 1,5 mmoli) odparowano dwukrotnie z bezwodną pirydyną, po czym dodano 10 ml pirydyny. Następnie dodano 5'-O-dimetoksytrytylotymidynę (544 mg; 1 mmol), N-tlenek 4-metoksypirydyny (500 mg; 4 mmole) i TPSCl (1,5 g, 5 mmoli), związki te zostały przed reakcją odparowane z bezwodną pirydyną. Stopień przereagowania **67**, jak również tworzenie p-chlorofenylo 2-cyanoetylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**73**) obserwowano wykorzystując fosforowy rezonans magnetyczny i chromatografię cieńkowsarstwową. Po 30 minutach można było zaobserwować powstanie na widmie ³¹P NMR sygnału pochodzącego od produktu **73**. Mieszaninę reakcyjną przerobiono dodając 10 ml NaHCO₃ aq. Fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3x5ml). Połączone ekstrakty zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem. Oczyszczano na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent chlorek metylenu/metanol. Otrzymano 543 mg **73**; wyd. 69 %. R_f(B)₇₃=0,73; R_f(D)₇₃=0,36.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 8,46-8,44 (d, 1H, J=5,6 Hz, NH-3); 7,66-7,65 (m, 1H, H-6); 7,38-7,15 (m, 13H, 9xCH grupy DMT, 4xCH grupy p-chlorofenylovej); 6,86-6,80 (m, 4H, 4xCH grupy DMT); 6,47-6,39 (m, 1H, H-1'); 5,24 (m, 1H, H-3'); 4,35-4,19 (m, 3H, H-4', H-5', 5''); 3,88-3,87 (m, 2H, CH₂ grupy cyanoetylovej); 3,79 (s, 6H, 2xOCH₃ grupy DMT); 2,79-2,76 (m, 1H, H-2'); 2,66-2,62 (m, 2H, CH₂ grupy cyanoetylovej); 2,59-2,46 (m, 1H, H-2''); 1,95 (s, 3H, C(5)-CH₃).

³¹P NMR (CDCl₃): δ (ppm) -7,42; -7,71

³¹P NMR (dioksan): δ (ppm) –6,99; -7,20.

Synteza p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu [74]

p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo fosforan (**68**) (301 mg; 0,75 mmola) odparowano dwukrotnie z bezwodną pirydyną, po czym dodano 1 ml pirydyny. Następnie dodano 5'-O-dimetoksytrytylotymidynę (272 mg, 0,5 mmola), N-tlenek 4-metoksyperydyny (250 mg; 2 mmole) i TPSCl (755 mg, 2,5 mmola), związki te zostały przed reakcją odparowane z bezwodną pirydyną. Stopień przereagowania **68**, jak również tworzenie p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**74**) obserwowano wykorzystując fosforowy rezonans magnetyczny i chromatografię cieńkowarstwową. Po 30 minutach można było zaobserwować powstanie na widmie ^{31}P NMR sygnału pochodzącego od tworzącego się produktu **74**. Mieszaninę reakcyjną przerobiono dodając 1 ml buforu fosforanowego o pH=7. Warstwę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3 x 10 ml). Połączone ekstrakty suszono bezwodnym siarczanem sodu, następnie zateżono i poddano oczyszczaniu. Oczyszczano na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent chlorek metylenu / metanol. Otrzymano 0,46 g **74**; wyd. 43 %. $R_f(\text{B})_{74}=0,76$; $R_f(\text{D})_{74}=0,44$.

^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 9,60; 9,55 (2s, 1H, NH-3); 8,81-8,78 (m, 1H, CH aromatyczny grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej); 8,38-8,29 (m, 1H, CH aromatyczny grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej); 7,62-7,59 (m, 1H, CH aromatyczny grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej); 7,54 (m, 1H, H-6); 7,37-7,19 (m, 11H, 9xCH grupy DMT, 2xCH grupy p-chlorofenylowej); 7,06-6,96 (m, 2H, 2xCH grupy p-chlorofenylowej); 6,85-6,81 (m, 4H, 4xCH grupy DMT); 6,44-6,38 (m, 1H, H-1'); 5,22-5,20 (m, 1H, H-3'); 4,54-4,41 (m, 2H, H-5', 5''); 4,25; 4,16 (m, 1H, H-4'); 3,78 (s, 6H, 2xOCH₃ grupy DMT); 3,54-3,35 (m, 4H, 2xCH₂ alifatyczne grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej); 2,64-2,37 (m, 2H, H-2',2''); 1,43-1,41 (d, 3H, C(5)-CH₃).

^{31}P NMR (CDCl_3): δ (ppm) -7,87; -8,03

^{31}P NMR (dioksan): δ (ppm) -6,90; -6,94.

Synteza p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu [75]

p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo fosforan (**69**) (100 mg; 0,25 mmola) odparowano dwukrotnie z bezwodną pirydyną, po czym dodano 2 ml pirydyny. Następnie dodano 5'-O-dimetoksytrytylotymidynę (109 mg, 0,2 mmola), N-metyloimidazol (0,08 ml; 1 mmola) i TPSCl (363 mg, 1,2 mmola), związki te zostały przed reakcją odparowane z bezwodną

pirydyna. Stopień przereagowania **69**, jak również tworzenie p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**75**) obserwowano wykorzystując fosforowy rezonans magnetyczny i chromatografię cieńkowarstwową. Po 30 minutach można było zaobserwować powstanie na widmie ^{31}P NMR sygnału pochodzącego od tworzącego się produktu **75**. Mieszaninę reakcyjną przerobiono dodając 3 ml NaHCO_3 aq i 5 ml chlorku metylenu. Warstwę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3 x 10 ml). Połączone ekstrakty suszono bezwodnym siarczanem sodu, następnie zatężono i poddano oczyszczaniu. Oczyszczano na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent chlorek metylenu / metanol. Otrzymano 169 mg **75**; wyd. 73 %. $R_f(\text{B})_{75}=0,76$; $R_f(\text{D})_{75}=0,44$.

^1H NMR (CDCl_3): δ (ppm) 9,02-9,00 (2s, 1H, NH-3); 8,08-8,02 (m, 1H, H-6); 7,28-7,10 (m, 13H, 9xCH grupy DMT, 4xCH grupy p-chlorofenylovej); 6,96-6,93 (m, 1H, CH aromatyczny grupy α -metylo-6-nitropiperonylovej); 6,88-6,85 (m, 1H, CH aromatyczny grupy α -metylo-6-nitropiperonylovej); 6,78-6,73 (m, 4H, 4xCH grupy DMT); 6,36-6,30 (m, 1H, H-1'); 5,11 (bs, 2H, OCH_2O grupy α -metylo-6-nitropiperonylovej); 4,38-4,22 (q, 1H, CH alifatyczny grupy α -metylo-6-nitropiperonylovej); 4,13-4,06 (m, 1H, H-3'); 3,71 (s, 6H, 2x OCH_3 grupy DMT); 3,46-2,92 (m, 3H, H-4', H-5', 5''); 2,49-2,38 (m, 1H, H-2'); 2,34-2,27 (m, 1H, H-2''); 1,63 (s, 3H, C(5)- CH_3); 1,34-1,32 (d, 3H, $J=3,88$ Hz; CH_3 alifatyczne grupy α -metylo-6-nitropiperonylovej)

^{31}P NMR (CDCl_3): δ (ppm) -7,51; -7,63.

7.18. Odblokowanie grup ochronnych z funkcji fosforanowej otrzymanych fosfortriestrów [73] i [74] do fosforodiestru [76].

Odblokowanie grupy 2-cyanoetylovej z p-chlorofenylo 2-cyanoetylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**73**):

za pomocą 2% TMG

Związek **73** (16 mg; 0,02 mmola) umieszczono w kolbie i odparowano dwukrotnie z bezwodnym dioksanem. Następnie dodano 0,7 ml 2% TMG w dioksanie. Przebieg reakcji kontrolowano fosforowym rezonansem magnetycznym. Po 2 godzinach można było zaobserwować całkowite odblokowanie **73** i pojawienie się sygnału pochodzącego od produktu **76**.

za pomocą 2% PMG

Związek **73** (16 mg; 0,02 mmola) umieszczono w kolbie i odparowano dwukrotnie z bezwodnym dioksanem. Następnie dodano 0,7 ml 2% PMG w dioksanie. Przebieg reakcji kontrolowano fosforowym rezonansem magnetycznym. Po 3 minutach można było zaobserwować całkowite odblokowanie **73** i pojawienie się sygnału pochodzącego od produktu **76**.

³¹P NMR (dioksan): δ (ppm) –6,65.

Odblokowanie grupy 2-(2,4-dinitrofenylo)etylowej z p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu (**74**):

za pomocą 3% TMG

Związek **74** (18 mg; 0,02 mmola) umieszczono w kolbie i odparowano dwukrotnie z bezwodnym dioksanem. Następnie dodano 0,7 ml 3% TMG w dioksanie. Przebieg reakcji kontrolowano fosforowym rezonansem magnetycznym. Po 4 minutach można było zaobserwować całkowite odblokowanie **74** i pojawienie się sygnału pochodzącego od produktu **76**.

za pomocą 2% PMG

Związek **74** (18 mg; 0,02 mmola) umieszczono w kolbie i odparowano dwukrotnie z bezwodnym dioksanem. Następnie dodano 0,7 ml 2% PMG w dioksanie. Przebieg reakcji kontrolowano fosforowym rezonansem magnetycznym. Reakcja odblokowania **74** była natychmiastowa. Na widmie ³¹P NMR powstał sygnał pochodzący od produktu **76**.

³¹P NMR (dioksan): δ (ppm) –6,65.

7.19. Odblokowanie p-chlorofenylo α -metylo-6-nitropiperonylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu [**75**] pod wpływem światła UV do p-chlorofenylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu [**76**]

Próbkę 0,8 mg [**75**] umieszczono w probówce Ependorfia. Następnie dodano 0,5 ml metanolu i 5 μ l trietyloaminy. Rozpuszczony związek naświetlano wysokociśnieniową rtęciową lampą łukową o mocy 200 W. Pomiędzy lampą, a naświetlaną próbką umieszczono szybę ze szkła pyreksowego, które pochłania promieniowanie o długości fali poniżej 320 nm. Po 2 godzinach naświetlania analiza TLC wykazała całkowite odblokowanie **75**. Dla potwierdzenia odblokowania grupy MeNP i otrzymania **76** wykonano widmo ³¹P NMR.

³¹P NMR (CDCl₃): δ (ppm) –7,42.

7.20. Synteza pentametyloguanidyny [80]

Synteza jodku N,N,N',N', S-pentametylotiomocznika [78]

N,N,N',N'-tetrametylotiomocznik (**77**) (5g, 37,5 mmola) rozpuszczono w 25 ml bezwodnego acetonu mieszając na mieszadle magnetycznym. Następnie dodano jodek metylu (5 ml, 75 mmoli). Po 5 minutach zaczął wytrącać się gęsty osad. Aby uniknąć zbrylenia powstałego produktu dodano jeszcze 10 ml suchego acetonu. Reakcję pozostawiono na noc. Na drugi dzień zawartość kolby przeniesiono na lejek Schotta i przesączono. Osad przemyto acetonem. Przesącz organiczny zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Po zatężeniu wytrąciła się kolejna porcja jodku N,N,N',N', S-pentametylotiomocznika (**78**), którą również przesączono. Osady połączono. Otrzymano 7,5 g **78**; wyd. 72 %.

Synteza pentametyloguanidyny²³¹ [80]

Jodek N,N,N',N', S-pentametylotiomocznika (**78**) (7g, 30 mmoli) dodano do 30,8 ml 27% roztworu metyloaminy w etanolu ochłodzonego do temperatury 0°C. W tej temperaturze mieszaninę reakcyjną mieszano 7 godzin. Następnie w ciągu dwóch godzin doprowadzono mieszaninę do 50°C i w tej temperaturze utrzymywano przez kolejne 10 godzin. Po tym czasie mieszaninę odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do pozostałości po zatężeniu dodano 40% wodnego roztworu wodorotlenku sodu. Fazę nieorganiczną ekstrahowano 50 ml benzenu (2 x 25 ml). Połączone ekstrakty organiczne zatężono. Otrzymano 1,3 g **80**; wyd. 37 %.

7.21. Synteza 3'-O-benzoilotymidyny [83]

Synteza 5'-O-dimetoksytrytylotymidyny [81]

Tymidynę (**44T**) (4,85g; 20 mmola) odparowano dwukrotnie z bezwodną pirydyną, następnie rozpuszczono w 40 ml pirydyny. Dodano chlorek dimetoksytrytylu (7,45g; 22 mmola) Zawartość kolby mieszano energicznie do całkowitego rozpuszczenia się chlorku dimetoksytrytylu na mieszadła magnetycznym. Po dwóch godzinach analiza TLC wykazała całkowite przereagowanie tymidyny. Po zakończeniu reakcji dodano 15 ml NaHCO₃ aq. Warstwę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3x20ml). Ekstrakty połączono i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt **81** krystalizowano z toluenu. Otrzymano 10,10 g **81**; wyd. 93%. R_f(B)₈₁=0,41, R_f(D)₈₁=0,19

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11,34 (s, 1H, NH-3); 7,515-7,511 (m, 1H, H-6); 7,40-7,23 (m, 9H, 9xCH grupy DMT); 6,91-6,88 (m, 4H, 4xCH grupy DMT); 6,20 (t, 1H, J=5,0 Hz; H-1'); 5,34-5,32 (d, 1H, J=3,4 Hz; OH-3'); 4,33-4,29 (m, 1H, H-3'); 3,90-3,88 (m, 1H, H-4'); 3,73 (s, 6H, 2xOCH₃ grupy DMT); 3,24-3,14 (m, 2H, H-5', 5''); 2,29-2,20 (m, 1H, H-2'); 2,18-2,10 (m, 1H, H-2''); 1,45-1,44 (m, 3H, C(5)-CH₃).

Synteza 3'-O-benzoilo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyny [82]

5'-O-dimetoksytrytylotymidynę (**81**) (4 g, 7,34 mmola) odparowano dwukrotnie z bezwodną pirydyną, następnie rozpuszczono w 30 ml pirydyny, kolbę zamknięto szklanym korkiem i umieszczono w łaźni lodowej (0°C +/-2). Po około 10 minutach dodano chlorek benzoilu (1,70 ml; 14,68 mmola). Kolbę wyjęto z łaźni i energicznie mieszano, aż do rozpuszczenia się chlorku benzoilu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono przez noc w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji dodano 15 ml NaHCO₃ aq. Warstwę organiczną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3x20ml), ekstrakty połączone i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt **82** oczyszczano na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent chlorek metylenu / metanol. Otrzymano 3,71 g **82**; wyd. 78%. R_f(D)₈₂=0,52

Synteza 3'-O-benzoiłotymidyny [83]

W kolbie umieszczono 3'-O-benzoilo 5'-O-dimetoksytrytylotymidynę (**82**) (3 g; 4,6 mmola) i dodano 40 ml 3% kwasu dichlorooctowego (9,2 mmola) rozpuszczonego w chlorku etylenu. Reakcję pozostawiono na noc. Analiza TLC wykazała odblokowanie grupy dimetoksytrytylowej z funkcji 5', 3'-O-benzoilo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyny (**82**). Do mieszaniny dodano 40 ml wodorowęglanu sodu. Fazę wodną wytrząsano z chlorkiem metylenu. W trakcie wytrząsania w fazie wodnej wytrąciła się 3'-O-benzoiłotymidyna (**83**), którą odsączono. Osad przemyto, a następnie suszono w eksyktorze na lini próżniowej. Otrzymano 1,52g **83**; wyd. 95 %. R_f(B)₈₃=0,55

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11,37 (s, 1H, NH-3); 8,03-8,00 (m, 2H, 2xCH grupy benzoilowej); 7,798-7,794 (m, 1H, H-6); 7,72-7,66 (m, 1H, CH grupy benzoilowej); 7,58-7,53 (m, 2H, 2xCH grupy benzoilowej); 6,29 (t, 1H, J=5,2 Hz; H-1'); 5,49-5,47 (m, 1H, H-3'); 5,27 (t, 1H, J=4,1 Hz; OH-5'); 4,17-4,16 (m, 1H, H-4'); 3,72-3,69 (m, 2H, H-5', 5''); 2,43-2,39 (m, 2H, H-2', 2''); 1,803-1,801 (d, 3H, C(5)-CH₃).

7.22. Synteza p-chlorofenylo 3'-O-benzoilotymidyn-5'-ylo fosforanu [84]

W pierwszej kolejności wytworzono czynnik fosforylujący Efimova **64** (8 ml bezwodnej pirydyny, 0,650 ml p-chlorofenylo dichlorofosforanu, 0,072 ml wody). Po 15 minutach dodano 3'-O-benzoilotymidynę (**83**) (346 mg, 1 mmol) rozpuszczoną w 1 ml pirydyny. Przed dodaniem **83** odparowano dwukrotnie z bezwodną pirydyną. Po 30 minutach można było zaobserwować całkowite przereagowanie 3'-O-benzoilotymidyny (kontrola TLC). Po tym czasie mieszaninę reakcyjną przerobiono dodając 4 ml wody i 1,125 ml trietyloaminy. Następnie fazę nieorganiczną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3x10ml). Ekstrakty organiczne suszono bezwodnym siarczanem sodu, a następnie zatężono. Do następnego etapu produkt **84** został użyty bez oczyszczania. Otrzymano 560 mg **84** w postaci oleju. $R_f(B)_{84}=0,25$

^{31}P NMR (CDCl₃): δ (ppm) -4,36.

7.23. Synteza p-chlorofenylo 2-cyanoetylo 3'-O-benzoilotymidyn-5'-ylo fosforanu [85]

Reakcję β -cyanoetylowania przeprowadzono z nieoczyszczonym związkiem **84**. Do p-chlorofenylo 3'-O-benzoilo-5'-ylo fosforanu (**84**) (536 mg, 1 mmol) dodano: 2-cyanoetanol (0,137 ml; 2 mmole), N-metyloimidazol (0,199 ml; 2,5 mmola) i rozpuszczono w 10 ml pirydyny. Przed reakcją 2-cyanoetanol i N-metyloimidazol odparowano dwukrotnie z bezwodną pirydyną. Następnie dodano TPSCl (0,605 g; 2 mmole). Po 15 minutach nadal pozostawał częściowo nieprzereagowany **84** (analiza TLC). Dodano ponownie 2-cyanoetanol (0,137 ml; 2 mmole), N-metyloimidazol (0,199 ml; 2,5 mmola) i TPSCl (0,605 g; 2 mmole). Po kolejnych 15 minutach można było zaobserwować całkowite przereagowanie substratów. Do mieszaniny reakcyjnej dodano 4 ml wody. Następnie fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3 x 10 ml), połączone ekstrakty organiczne suszono bezwodnym siarczanem sodu, po czym zatężono na pompie pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany **85** oczyszczono na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent chlorek metylenu / metanol. Otrzymano 478 mg **85**; wyd. 81%. $R_f(D)_{85}=0,44$

1H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 9,99-9,98 (d, 1H, $J=3,0$ Hz; NH-3); 8,06-8,03 (m, 2H, 2xCH grupy benzoilowej); 7,65-7,59 (m, 1H, H-6); 7,51-7,48 (m, 2H, 2xCH grupy p-chlorofenyłowej); 7,46-7,77 (m, 1H, CH grupy benzoilowej); 7,38-7,29 (m, 2H, 2xCH grupy benzoilowej); 7,22-7,17 (m, 2H, 2xCH grupy p-chlorofenyłowej); 6,49-6,43 (m, 1H, H-1');

5,56-5,52 (m, 1H, H-3'); 4,62-4,54 (m, 1H, H-4'); 4,45-4,32 (m, 4H, H-5',5'', CH₂ grupy cyjanoetylowej); 2,56-2,51 (m, 2H, CH₂ grupy cyjanoetylowej); 2,64-2,56 (m, H, H-2'); 2,34-2,24 (m, H, H-2''); 1,85-1,83 (m, 3H, C(5)-CH₃).

³¹P NMR (CDCl₃): δ (ppm) -6,88; -7,17.

7.24. Synteza pirofosforanu bis(p-chlorofenylo 3'-O-benzoilotymidyn-5'-ylowego) [88]

85 (1,18 g; 2 mmole) odparowano dwukrotnie z bezwodną pirydyną, następnie rozpuszczono w 2 ml pirydyny. Do mieszaniny dodano DBU (0,24 ml; 1,6 mmola). Po 15 minutach analiza TLC wykazała utworzenie soli **86**. Do wytworzonej *in situ* soli **86** dodano ½ równoważnika molowego TPSCI (0,3 g; 1 mmola). Mieszaninę reakcyjną pozostawiono mieszając na mieszadle magnetycznym przez 15 minut. Po tym czasie wykonano analizę TLC i ³¹P NMR, potwierdzające powstanie **88**. R_f(B)₈₈=0,75

³¹P NMR (CDCl₃): δ (ppm) -18,89; -19,01; -19,09.

7.25. Synteza 3'-O-benzoilotymidynylo p-chlorofenylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyn-3'-ylo fosforanu [89]

Uzyskany **88** odparowano dwukrotnie z bezwodną pirydyną i rozpuszczono w 2 ml pirydyny. Dodano 5'-O-dimetoksytrytylotymidynę (544 mg, 1 mmol), N-tlenek 4-metoksyperydyny (625 mg; 5 mmola). Mieszaninę reakcyjną mieszano na mieszadle magnetycznym 20 minut. Po tym czasie wykonano analizę TLC i ³¹P NMR, które potwierdziły utworzenie **89**. R_f(B)₈₉=0,55

³¹P NMR (CDCl₃): δ (ppm) -7,30; -7,60.

7.26. Synteza 5'-O-dimetoksytrytylotymidyny związanej ze stałym nośnikiem modyfikowanym sarkozyną [95]

Synteza 3'-O-bursztynylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyny [94]

5'-O-Dimetoksytrytylotymidynę (218 mg, 0,40 mmola) umieszczono w kolbie o poj. 10 ml i odparowano dwukrotnie z bezwodną pirydyną. Do kolby dodano bezwodnika bursztynowego (48 mg, 0,48 mmola). Następnie dodano 2 ml bezwodnego chlorku metylenu, oraz trietyloaminę (140 μl, 1 mmol) i DMAP (2,4 mg). Mieszaninę reakcyjną mieszano w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Postęp reakcji kontrolowano metodą TLC

(CH₂Cl₂/MeOH, 9/1). Po tym czasie dodano kolejną porcję bezwodnika bursztynowego (0,48 mmola). Po godzinie zakończono reakcję przez dodanie 2 ml NaHCO₃ aq. Warstwę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3x5ml). Połączone ekstrakty organiczne suszono bezwodnym siarczanem sodu i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem. Po zatężeniu uzyskano jasno żółtą pianę. Otrzymano 245 mg surowego produktu **94**; wyd. 95%.
R_f(B)₉₄=0,48

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,55-7,54 (m, 1H, H-6); 7,32-7,15 (m, 9H, 9xCH grupy DMT); 6,78-6,74 (m, 4H, 4xCH grupy DMT); 6,35 (t, 1H, J=4,1 Hz; H-1'); 5,41-5,39 (m, 1H, H-3'); 4,10-4,09 (m, 1H, H-4'); 3,71 (s, 6H, 2xOCH₃ grupy DMT); 3,39-3,37 (m, 2H, H-5', 5''); 3,04-2,96 (m, 2H, CH₂ grupy bursztynylowej); 2,44-2,38 (m, 1H, H-2'); 2,36-2,33 (m, 1H, H-2''); 1,279-1,276 (m, 3H, C(5)-CH₃); 1,22-1,17 (m, 2H, CH₂ grupy bursztynylowej).

Przygotowanie stałego nośnika modyfikowanego sarkozyną

a. Funkcjonalizacja CPG [91]

Szkło o kontrolowanej porowatości CPG **90** (D = 94 nm, d_p = 71-125 μm, V_p=1,06 cm³/g) (0,5 g) umieszczono w kolbie o poj. 10 ml. Dodano 4 ml chlorku metylenu oraz 0,4 ml 3-aminopropylotrietoksylanu. Reakcję wytrząsano przez noc. Po tym czasie zawartość kolby przeniesiono na lejek Schotta, odsączono, a następnie przemyto chlorkiem metylenu i metanolem. Po dokładnym przemyciu, podłoże wstawiono na jedną godzinę do suszarki o temp. 100°C. Po tym czasie podłoże przeniesiono do kolby, dodano 2 ml bezwodnego chlorku metylenu i TMSiCl (0,13 ml; 1 mmol). Reakcję wytrząsano jedną godzinę. Następnie uzyskane podłoże **91** dobrze przemyto chlorkiem metylenu i metanolem, po czym suszono przez dwie godziny na linii próżniowej.

b. Przyłączenie Fmoc-Sar-OH do podłoża **91** [92]

W kolbie umieszczono 0,5 g podłoża **91**, przemyto suchym chlorkiem metylenu (3x4 ml). Następnie dodano 1,5 ml CH₂Cl₂, Fmoc-Sar-OH (0,314 g; 1 mmol), DMAP (10 mg), DCC (1,031g, 5 mmoli) i 0,5 ml Et₃N. Mieszaninę wytrząsano przez noc. Po tym czasie na próbce odmytego podłoża (około 10 mg), sprawdzono efektywność przyłączenia Fmoc-Sar-OH do podłoża (próbka z 1% ninhydriną w metanolu). Uzyskane podłoże **92** przemyto chlorkiem metylenu, a następnie 6 ml mieszaniny CH₃CN / MeOH (1 / 1). Po dokładnym przemyciu podłoże **92** traktowano przez 2 godziny mieszaniną acetylującą: 0,7 ml bezwodnika kwasu

octowego, 2 ml Et₃N, 24 mg DMAP i 4 ml chlorku metylenu. Po acetylowaniu, podłoże **92** przemyto mieszaniną CH₃CN / MeOH (1 / 1) (10 ml), a następnie CH₂Cl₂ (20 ml).

c. Odblokowanie grupy Fmoc z podłoża **92** [93]

Do osuszonego podłoża **92** umieszczonego w kolbie dodano 5 ml 10% piperydyny w pirydynie. Reakcję wytrząsano 45 minut. Po tym czasie zawartość kolby przeniesiono na lejek Schotta, odsączono, a następnie przemyto mieszaniną CH₃CN / MeOH / Py (1 / 1 / 1), porcjami 3x6 ml. Otrzymane podłoże **93** suszono na lini próżniowej 2 godziny.

Przyłączanie 3'-O-bursztynylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidyny do stałego nośnika **93** [95]

W kolbie umieszczono 3'-O-bursztynylo 5'-O-dimetoksytrytylotymidynę (**94**) (75 mg) i odparowano dwukrotnie z pirydyną. Następnie dodano podłoże **93** (200 mg) (przemyte dwukrotnie suchym chlorkiem metylenu), 4 ml chlorku metylenu, DCC (170 mg), trietyloaminę (200 µl) i DMAP (6 mg). Mieszaninę łagodnie wytrząsano przez noc. Po tym czasie zawartość kolby przeniesiono na lejek Schotta, odsączono, dokładnie przemyto mieszaniną CH₃CN / MeOH / pirydyna (1 / 1 / 1) (3x18 ml), a następnie CH₃CN (20 ml). Odmyte podłoże **95** traktowano przez 2,5 godziny mieszaniną acetylującą: 0,7 ml bezwodnika kwasu octowego, 2 ml Et₃N, 24 mg DMAP i 4 ml chlorku metylenu. Po acetylowaniu, podłoże **95** przemyto mieszaniną CH₃CN / pirydyna (1 / 1) (10 ml), a następnie CH₂Cl₂ (20 ml). W celu określenia stopnia załadowania (ang. loading) otrzymanego podłoża modyfikowanego sarkozyną **95** odważkę podłoża (ok. 6 mg) umieszczono w kolbie miarowej o pojemności 10 ml i dopełniono 3% roztworem kwasu dichlorooctowego w CH₂Cl₂. Dla tak sporządzonego roztworu mierzono absorpcję uwolnionego kationu dimetoksytrytylowego przy λ_{max} 504 nm. Załadowanie podłoża (**L₉₅**) obliczyłam według wzoru:

$$L_{95} = A \times V \times 1000 / 70000 \times m$$

A – absorbcja próbki przy λ_{max}504 nm

m – masa naważki podłoża (mg)

V – pojemność kolby miarowej (ml)

Otrzymano podłoże o załadowaniu 31 µmol/g.

7.27. Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym z użyciem czynnika Efimova

Do syntezy użyto kolumnę, używaną do syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym na syntetyzerze Gene Assembles (Pharmacia LKB). Umieszczono w niej 14 mg podłoża „Primer” z załadowaną 5'-O-dimetoksytrytylotymidyną. Następnie przeprowadzono operacje zestawione w tabeli poniżej.

Nr operacji	Funkcja	Objętość użytych reagentów [ml]	Czas [min]
1	Przemycie chlorkiem etylenu	3 x 1	2
2	Odtrytylowanie: 3% kwas dichlorooctowy (A=1,4055) *		
3	Przemycie chlorkiem etylenu	3 x 1	2
4	Przemycie acetonitrylem	3 x 1	2
5	Fosforylacja: czynnik Efimova**	2 x 0,5	2 x 10
6	Przemycie acetonitrylem, odwirowanie kolumny, przemycie acetonitrylem	3 x 1 3 x 1	2 2
7	Kondensacja: 0,2 M DMTrT i 0,4 M N-tlenek 4-metoksypirydiny pirydynie TPSCl	2 x 0,3 2 x 100 mg	2 x 15
8	Przemycie acetonitrylem, odwirowanie kolumny, przemycie acetonitrylem	3 x 1 3 x 1	2 2
9	Przemycie chlorkiem etylenu	3 x 1	2
10	Odtrytylowanie: 3% kwas dichlorooctowy (A=1,3966) *		
11	Powtórzono operacje 1-9		
12	Odtrytylowanie: 3% kwas dichlorooctowy (A=1,3877) *		
13	Powtórzono operacje 1-9		
14	Odtrytylowanie: 3% kwas dichlorooctowy (A=1,3648) *		

* pomiar absorpcji roztworu kationu dimetoksytrytylowego przy λ_{\max} 504 nm

** czynnik Efimova: 1 ml pirydyny + 82 μ l dichlorofosforanu p-chlorofenyłu + 9 μ l wody, mieszanina pozostawiona na 10 minut.

7.28. Synteza oligonukleotydów na podłożu stałym w nowym wariantcie metody fosfortriestrowej

Do syntezy użyto kolumnę, używaną do syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym na syntetyzerze Gene Assembles (Pharmacia LKB). Umieszczono w niej 10 mg podłoża modyfikowanego sarkozyną z załadowaną 5'-O-dimetoksytrytylotymidyną. Następnie przeprowadzono operacje zestawione w tabeli poniżej.

Nr operacji	Funkcja	Objętość użytych reagentów [ml]	Czas [min]
1	Przemycie chlorkiem etylenu	2 x 2	2
2	Odtrytylowanie: 3% kwas dichlorooctowy (A=1,289) *	2 x 5	4
3	Przemycie chlorkiem etylenu	2 x 2	2
4	Przemycie acetonitrylem	2 x 2	2
5	Fosforylacja: 0,2 M p-chlorofenylo 2-(2,4-dinitrofenylo)etylo fosforan i 0,4 M N-tlenek 4-metoksypirydyny w pirydynie TPSCl	2 x 0,3 2 x 40 mg	2 x 15
6	Przemycie acetonitrylem	2 x 5	2
7	Przemycie dioksanem	2 x 5	2
8	6 % TMG w dioksanie	0,5	10
9	Przemycie dioksanem	2 x 5	2
10	Przemycie acetonitrylem	2 x 5	2
11	Kondensacja: 0,2 M DMTrT i 0,4 M N-tlenek 4-metoksypirydyny w pirydynie TPSCl	2 x 0,3 100 mg	2 x 15
12	Przemycie acetonitrylem	2 x 5	2
13	Przemycie chlorkiem etylenu	2 x 2	2
14	Odtrytylowanie: 3% kwas dichlorooctowy (A=0,877) *	2 x 5	4

* pomiar absorpcji roztworu kationu dimetoksytrytylowego przy λ_{\max} 504 nm

8. LITERATURA

- (1) Fodor, S. P. A.; Read, M. C.; Pirrung, M. C.; Stryer, A. T.; Solas, D. *Science* **1991**, *251*, 767.
 - (2) Markiewicz, W. T.; Adrych-Rożek, K.; Markiewicz, M.; Zebrowska, A.; Astriab, A. Innovations in Solid Phase Synthesis; In *Biological and Biomedical Applications*; Mayflower Worldwide: 1994; pp 339-346.
 - (3) Maskos, U.; Southern, E. M. *Nucl.Acids Res.* **1993**, *21*, 4663.
 - (4) Southern, E. M.; Maskos, U.; Elder, J. K. *Genomics* **1992**, *13*, 1008-1017.
 - (5) Case-Green, S. C.; Southern, E. M. *Nucl.Acids Res.* **1994**, *21*, 2267-2268.
 - (6) Fodor, S. P. A.; Mazzola, L. T. *US 5324633* **1994**.
 - (7) Uhlmann, E.; Peyman, A. *Chem.Rev.* **1990**.
 - (8) Cook, P. D. *CRC Press Inc* **1993**.
 - (9) Maskos, U.; Southern, E. M. *Chromosome Res.* **1995**, *3*, 271-280.
 - (10) Hasan, A.; Stengele, K. P.; Giegrich, H.; Cornwell, P.; Isham, K. R.; Sachleben, R. A.; Pfeleiderer, W.; Foote, R. S. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4247-4264.
 - (11) Hagen, V.; Bendig, J.; Frings, S.; Eckardt, T.; Helm, S.; Reuter, D.; Kaupp, U. B. *Angew.Chem.Int.Edit* **2001**, *40*, 1046-1048.
 - (12) Pirrung, M. C.; Fallon, L. *J.Org.Chem.* **1998**, *63*, 241-246.
 - (13) Himmelsbach, F.; Pfeleiderer, W. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 3583-3586.
 - (14) Ikehara, M.; Ohtsuka, E.; Markham, A. F. *Adv.Carbohydr.Chem.Biochem.* **1979**, *39*, 213.
 - (15) Ohtsuka, E.; Ohgi, T.; Fukui, T.; Ikehara, M. *Chem.Pharm.Bull.* **1985**, *33*, 1849-1855.
 - (16) Khorana, H. G. *Pure Appl.Chem.* **1968**, *17*, 349-381.
 - (17) Khorana, H. G. *Biochem.J.* **1968**, *109*, 349-381.
 - (18) Agarwal, K. L.; Yamazaki, A.; Cashion, P. J.; Khorana, H. G. *Angew.Chem.Int.Edit* **1972**, *11*, 451-459.
-

-
- (19) Michelson, A. M.; Todd, A. R. *J.Chem.Soc.* **1955**, 2632-2638.
- (20) Letsinger, R. L.; Ogilvie, K. K. *J.Am.Chem.Soc.* **1967**, 89, 4801-4803.
- (21) Letsinger, R. L.; Ogilvie, K. K. *J.Am.Chem.Soc.* **1969**, 3350-3355.
- (22) Zhdanov, R. I.; Zhenodarova, S. M. *Synthesis* **1975**, 32, 222-245.
- (23) Kössel, H.; Seliger, H. *Fortschr.Chem.Org.Naturst.* **1975**, 32, 297-508.
- (24) Amarnath, V.; Broom, A. D. *Chem.Rev.* **1977**, 77, 183-217.
- (25) Sonveaux, E. *Biorg.Chem.* **1986**, 14, 274-325.
- (26) Narang, S. A. *Tetrahedron* **1983**, 39, 3-22.
- (27) Efimov, V. A.; Chakhmakhcheva, O. G.; Reverdatto, S. V. *Elsevier* **1987**, 23-36.
- (28) Gilham, P. T.; Khorana, H. G. *J.Am.Chem.Soc.* **1958**, 80, 6212-6222.
- (29) Ralph, R. K.; Khorana, H. G. *J.Am.Chem.Soc.* **1961**, 83, 2926-2934.
- (30) Ralph, R. K.; Conners, W. J.; Schaller, H.; Khorana, H. G. *J.Am.Chem.Soc.* **1963**, 85, 1983-1988.
- (31) Weber, H.; Khorana, H. G. *J.Mol.Biol.* **1972**, 72, 219-249.
- (32) Zoltewicz, J. A.; Clark, D. F.; Sharpless, T. W.; Grahe, G. *J.Am.Chem.Soc.* **1970**, 92, 1741-1750.
- (33) Tanaka, T.; Letsinger, R. L. *Nucl.Acids Res.* **1982**, 10, 3260.
- (34) Hevesi, L.; Wolfson-Davidson, E.; Nagy, J. B.; Nagy, O. B.; Bruylants, A. *J.Am.Chem.Soc.* **1972**, 94, 4715-4720.
- (35) Zoltewicz, J. A.; Clark, D. F. *J.Org.Chem.* **1972**, 37, 1193-1197.
- (36) Oivanen, M.; Lönnberg, H.; Zhou, X.-X.; Chattopadhyaya, J. *Tetrahedron* **1987**, 43, 1133-1140.
- (37) Romero, R.; Stein, R.; Bull, H. G.; Cordes, E. H. *J.Am.Chem.Soc.* **1978**, 100, 7620-7624.
- (38) McBride, L. J.; Caruthers, M. H. *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 2953-2956.
- (39) Froehler, B. C.; Matteucci, M. D. *Nucl.Acids Res.* **1983**, 11, 8031-8036.
- (40) McBride, L. J.; Kierzek, R.; Beaucage, S. L.; Caruthers, M. H. *J.Am.Chem.Soc.* **1986**, 108, 2040-2048.
- (41) Smrt, J.; Sorm, F. *Collect.Czech.Chem.Comm.* **1967**, 32, 3169-3176.
-

- (42) Hagen, M. D.; Chládek, S. *J.Org.Chem.* **1989**, *54*, 3189-3195.
- (43) Zemlicka, J. *Collect.Czech.Chem.Communic.* **1963**, *28*, 1060-1062.
- (44) Zemlicka, J.; Holý, A. *Collect.Czech.Chem.Communic.* **1967**, *32*, 3159-3168.
- (45) Holý, A.; Zemlicka, J. *Collect.Czech.Chem.Communic.* **1969**, *1969*, 2449-2458.
- (46) Sproat, B. S.; Iribarren, A. M.; Guimil Garcia, R.; Beijer, B. *Nucl.Acids Res.* **1991**, *19*, 733-738.
- (47) Vu, H.; McCollum, C.; Lotys, C.; Andrus, A. *Nucl.Acids Res.Symp.Ser.* **1990**, *22*, 63-64.
- (48) Arnold, L.; Tocik, Z.; Bradková, E.; Hostomský, Z.; Paces, V.; Smrt, J. *Collect.Czech.Chem.Communic.* **1989**, *54*, 523-532.
- (49) Caruthers, M. H.; McBride, L. J.; Bracco, L. P.; Dubendorff, J. W. *Nucleosides Nucleotides* **1985**, *4*, 95-105.
- (50) Caruthers, M. H.; Barone, A. D.; Bracco, L. P.; Dodds, D. R.; Eisenbeis, S. J.; McBride, L. J.; Nasoff, M. S.; Noble, S. A.; Tang, J. Synthesis of Oligodeoxynucleotides Using the Phosphoramidite Method.; In *Natural Products Chemistry*; Zalewski, R. I., Skolik, J. J., eds. Elsevier: Amsterdam, 1984; pp 213-225.
- (51) Arnold, L.; Tocik, Z.; Bradková, E.; Hostomský, Z.; Smrt, J. *Nucl.Acids Res.Symp.Ser.* **1987**, *18*, 181-184.
- (52) Vu, H.; McCollum, C.; Jacobson, K.; Theisen, P.; Vinayak, R.; Spiess, E.; Andrus, A. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7269-7272.
- (53) Metelev, V. G.; Krynetskaya, N. F.; Purmal, A. A.; Shabarova, Z. A.; Tocik, Z.; Arnold, L.; Smrt, J. *J.Collect.Czech.Chem.Communic.* **1990**, *55*, 2781-2786.
- (54) Sproat, B. S.; Gait, M. J. Rapid Solid-phase Phosphotriester Synthesis of DNA Fragments on Controlled Pore Glass and Application to the Preparation of e Gene for Somatomedin C.; In *Chemical Synthesis in Molecular Biology: GBF Monographs*; Blöcker, H., Frank, R., Fritz, H. J., eds. Weinheim, 1987; pp 13-22.
- (55) Ma, Y.-X.; Sonveaux, E. *Biopolymers* **1989**, *28*, 965-973.
- (56) Kume, A.; Iwase, R.; Sekine, M.; Hata, T. *Nucl.Acids Res.* **1984**, *12*, 8525-8538.
- (57) Kume, A.; Sekine, M.; Hata, T. *Chem.Lett.* **1983**, 1597-1600.
- (58) Heikkilä, J.; Balgobin, N.; Chattopadhyaya, J. *Acta Chem.Scand.* **1983**, *B37*, 857-862.
- (59) Shimidzu, T.; Letsinger, R. L. *J.Org.Chem.* **1968**, *33*, 708-711.
-

-
- (60) Schaller, H.; Weimann, G.; Lerch, B.; Khorana, H. G. *J.Am.Chem.Soc.* **1963**, *85*, 3821-3827.
- (61) Kamimura, T.; Tsuchiya, M.; Urakami, K.; Koura, K.; Sekine, M.; Shinozaki, K.; Hata, T. *J.Am.Chem.Soc.* **1984**, *106*, 4552-4557.
- (62) Shimidzu, T.; Letsinger, R. L. *Bull.Chem.Soc.Jpn.* **1971**, *44*, 1673-1677.
- (63) Hata, T.; Gokita, N.; Sakairi, N.; Yamaguchi, K.; Sekine, M.; Ishido, Y. *Bull.Chem.Soc.Jpn.* **1982**, *55*, 2949-2955.
- (64) Honda, S.; Urakami, K.; Koura, K.; Terada, K.; Sato, Y.; Kohno, K.; Sekine, M.; Hata, T. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 153-163.
- (65) Honda, S.; Terada, K.; Sato, Y.; Hata, T. *Chem.Lett.* **1982**, 15-18.
- (66) Sekine, M.; Masuda, N.; Hata, T. *Bull.Chem.Soc.Jpn.* **1986**, *59*, 1781-1789.
- (67) Masuda, N.; Hata, T. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 5445-5453.
- (68) Nagaich, A. K.; Misra, K. *Nucl.Acids Res.* **1989**, *17*, 5134.
- (69) Dikshit, A.; Chaddha, M.; Singh, R. K.; Misra, K. *Can.J.Chem.* **1988**, *66*, 2989-2994.
- (70) Chaix, C.; Molko, D.; Téoule, R. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 71-74.
- (71) Chaix, C.; Duplaa, A. M.; Gasparutto, D.; Molko, D.; Téoule, R. *Nucl.Acids Res.Symp.Ser.* **1989**, *21*, 45-46.
- (72) Wu, T.; Ogilvie, K. K.; Pon, R. T. *Nucl.Acids Res.* **1989**, *17*, 3501-3517.
- (73) Wu, T.; Ogilvie, K. K.; Pon, R. T. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4249-4252.
- (74) Schulhof, J. C.; Molko, D.; Teoule, R. *Nucl.Acids Res.* **1987**, *15*, 397-416.
- (75) Happ, E.; Scalfi-Happ, C.; Chládek, S. *J.Org.Chem.* **1987**, *52*, 5387-5391.
- (76) Koole, L. H.; Moody, H. M.; Broeders, N. L. H. L.; Quaedfilieg, P. J. L. M.; Kuijpers, W. H. A.; van Genderen, M. H. P.; Coenen, A. J. J.; van der Wals, S.; Buck, H. M. *J.Org.Chem.* **1989**, *54*, 1657-1664.
- (77) Kuijpers, W. H. A.; Huskens, J.; Koole, L. H.; van Boeckel, C. A. A. *Nucl.Acids Res.* **1990**, *18*, 5197-5205.
- (78) Webb, T. R.; Matteucci, M. D. *Nucl.Acids Res.* **1986**, *14*, 7661-7674.
- (79) Kwiatkowski, M.; Heikkilä, J.; Welch, C. J.; Chattopadhyaya, J. Some Aspects of Oligoribonucleotide Chemistry.; In *Natural Products Chemistry*; Zalewski, R. I., Skolik, J. J., eds. Amsterdam, 1984; pp 259-274.
- (80) Heikkilä, J.; Chattopadhyaya, J. *Acta Chem.Scand.* **1983**, *B37*, 263-265.
-

-
- (81) Stengele, K. P.; Pfliederer, W. *Nucl.Acids Res.Symp.Ser.* **1989**, *21*, 101-102.
- (82) Pfister, M.; Pfliederer, W. *Nucl.Acids Res.Symp.Ser.* **1987**, *18*, 165-168.
- (83) Charubala, R.; Pfliederer, W. *Nucleosides Nucleotides* **1987**, *6*, 517-520.
- (84) Schirmeister, H.; Charubala, R.; Schulz, B. S.; Pfliederer, W. *Nucl.Acids Res.Symp.Ser.* **1987**, *18*, 205-206.
- (85) Pfister, M.; Pfliederer, W. *Nucleosides Nucleotides* **1989**, *8*, 1001-1006.
- (86) Kerdewijn, P.; Ruf, K.; Pfliederer, W. *Helv.Chim.Acta* **1991**, *74*, 7-23.
- (87) Pfliederer, W.; Schirmeister, H.; Reiner, T.; Pfister, M.; Charubala, R. New Protecting Groups in Nucleoside and Nucleotide Chemistry; In *Biophosphates and their Analogues - Synthesis, Structure, Metabolism and Activity*; Bruzik, K. S., Stec, W. J., eds. Amsterdam, 1987; pp 133-142.
- (88) Pfliederer, W.; Schwarz, M.; Schirmeister, H. *Chem.Scr.* **1986**, *26*, 147-154.
- (89) Himmelsbach, F.; Schulz, B. S.; Trichtinger, T.; Charubala, R.; Pfliederer, W. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 59-72.
- (90) Letsinger, R. L.; Miller, P. S. *J.Am.Chem.Soc.* **1969**, *91*, 3356-3359.
- (91) Watkins, B. E.; Kiely, J. S.; Rapoport, H. *J.Am.Chem.Soc.* **1982**, *104*, 5708.
- (92) Watkins, B. E.; Rapoport, H. *J.Org.Chem.* **1982**, *47*, 4471-4477.
- (93) Letsinger, R. L.; Miller, P. S. *J.Am.Chem.Soc.* **1969**, *91*, 3356-3359.
- (94) Köster, H.; Kulikowski, K.; Liese, T.; Heikens, T.; Kohli, W. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 363-369.
- (95) Köster, H.; Kulikowski, K.; Liese, T.; Heikens, T.; Kohli, W. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 363-369.
- (96) Schulhof, J. C.; Molko, D.; Teoule, R. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 51-54.
- (97) Schulhof, J. C.; Molko, D.; Teoule, R. A New Set of Easily Removable Protecting Groups for Oligonucleotide synthesis.; In *Biophosphates and their Analogues - Synthesis, Structure, Metabolism and Activity*; Bruzik, K. S., Stec, W. J., eds. Amsterdam, 1987; pp 143-148.
- (98) Schulhof, J. C.; Molko, D.; Teoule, R. *Nucl.Acids Res.* **1988**, *16*, 326.
- (99) Büchi, H.; Khorana, H. G. *J.Mol.Biol.* **1972**, *72*, 251-288.
- (100) Kamimura, T.; Tsuchiya, M.; Koura, K.; Sekine, M.; Hata, T. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 2775-2778.
-

-
- (101) Hata, T.; Sekine, M. Synthesis of Oligonucleotides by Using New Protecting Groups.; In *Natural Products Chemistry*; Zalewski, R. I., Skolik, J. J., eds. Amsterdam, 1984; pp 239-246.
- (102) Sekine, M.; Nakanishi, T. *Chem.Lett.* **1991**, 121-124.
- (103) Sekine, M.; Iinura, S.; Nakanishi, T. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 395-398.
- (104) Sekine, M.; Heikkilä, J.; Hata, T. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 5691-5694.
- (105) Sekine, M.; Nishiyama, S.; Kamimura, T.; Osaki, Y.; Hata, T. *Bull.Chem.Soc.Jpn.* **1985**, 58, 850-860.
- (106) Marugg, J. E.; Tromp, M.; Jhurani, P.; Hoyng, C. F.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Tetrahedron* **1984**, 40, 73-78.
- (107) Nielsen, J.; Taagaard, M.; Marugg, J. E.; van Boom, J. H.; Dahl, O. *Nucl.Acids Res.* **1986**, 14, 7391-7403.
- (108) Tanimura, H.; Fukazawa, T.; Sekine, M.; Hata, T.; Efcavitch, J.; Zon, G. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 577-578.
- (109) Tanimura, H.; Maeda, M.; Fukazawa, T.; Sekine, M.; Hata, T. *Nucl.Acids Res.* **1989**, 17, 8135-8147.
- (110) Chaix, C.; Duplaa, A. M.; Molko, D.; Teoule, R. *Nucl.Acids Res.* **1989**, 17, 7381-7393.
- (111) Beijer, B.; Sulston, I.; Sproat, B. S.; Rider, P.; Lamond, A. I.; Neuner, P. *Nucl.Acids Res.* **1990**, 18, 5143-5151.
- (112) Happ, E.; Scalfi-Happ, C.; Clore, G. M.; Gronenborn, A. M. *Nucl.Acids Res.Symp.Ser.* **1987**, 18, 265-268.
- (113) Marugg, J. E.; Nielsen, J.; Dahl, O.; Burik, A.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Rec.Trav.Chim.Pays-Bas* **1987**, 106, 72-76.
- (114) Marugg, J. E.; Burik, A.; Tromp, M.; van der Marel, G. A.; van Boom, J. H. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 2271-2274.
- (115) Uznanski, B.; Grajkowski, A.; Wilk, A. *Nucl.Acids Res.* **1989**, 17, 4863-4871.
- (116) Singh, R. K.; Misra, K. *Ind.J.Chem.* **1988**, 27B, 409-417.
- (117) Mishra, R. K.; Misra, K. *Ind.J.Chem.* **1988**, 27B, 817-820.
- (118) Mishra, R. K.; Misra, K. *Nucl.Acids Res.* **1986**, 14, 6197-6213.
- (119) Kuijpers, W. H. A.; Huskens, J.; van Boeckel, C. A. A. *Tetrahedron Lett.* **1990**, 31, 6729-6732.
-

-
- (120) Smith, M.; Rammler, D. H.; Goldberg, I. H.; Khorana, H. G. *J.Am.Chem.Soc.* **1962**, *84*, 430-440.
- (121) Brown, E.; Belagaje, R.; Ryan, M. J.; Khorana, H. G. *Methods in Enzymology, Wu, R.Ed., Academic Press: New York* **1979**, *68*, 109-151.
- (122) Narang, S. A.; Hsiung, H. M.; Brousseau, R. *Methods in Enzymology, Wu, R.Ed., Academic Press: New York* **1979**, *68*, 90-98.
- (123) Caruthers, M. H.; Barone, A. D.; Beaucage, S. L.; Dodds, D. R.; Fisher, E. F.; McBride, L. J.; Matteucci, M.; Stabinsky, Z.; Tang, J. *Methods in Enzymology, Wu, R.: Grossman.L.Eds., Academic Press: San Diego* **1987**, *154*, 287-313.
- (124) Sekine, M.; Hata, T. *J.Org.Chem.* **1983**, *48*, 3011-3014.
- (125) Sekine, M.; Hata, T. *J.Org.Chem.* **1986**, *106*, 5763-5764.
- (126) Sekine, M.; Hata, T. *J.Am.Chem.Soc.* **1986**, *108*, 4581-4586.
- (127) Scalfi-Happ, C.; Happ, E.; Chládek, S. *Nucleosides Nucleotides* **1987**, *6*, 345-348.
- (128) Chattopadhyaya, J. B.; Reese, C. B. *J.C.S.Chem.Comm* **1978**, 639-649.
- (129) Balgobin, N.; Josephson, S.; Chattopadhyaya, J. B. *Acta Chem.Scand.* **1981**, *B35*, 212.
- (130) Josephson, S.; Chattopadhyaya, J. *Chem.Scr.* **1981**, *18*, 184-188.
- (131) Chattopadhyaya, J.; Kwiatkowski, M. *Acta Chem.Scand.* **1984**, *B38*, 657-671.
- (132) Tanimura, H.; Imada, T. *Chem.Lett.* **1990**, 1715-1718.
- (133) Tanimura, H.; Imada, T. *Chem.Lett.* **1990**, 2081-2084.
- (134) Kwiatkowski, M.; Heikkilä, J.; Björkman, S.; Chattopadhyaya, J.; Seliger, H. *Chem.Scr.* **1983**, *22*, 30-48.
- (135) Seliger, H.; Kotschi, U. *Nucleosides Nucleotides* **1985**, *4*, 153-155.
- (136) Seliger, H.; Gupta, K. C.; Kotschi, U.; Spaney, T.; Zeh, D. *Chem.Scr.* **1986**, *26*, 561-567.
- (137) Balgobin, N.; Chattopadhyaya, J. *Nucleosides Nucleotides* **1987**, *6*, 461-463.
- (138) Brown, T.; Pritchard, C. E.; Turner, G.; Salisbury, S. A. *J.C.S.Chem.Comm* **1989**, 891-893.
- (139) Gioeli, C.; Chattopadhyaya, J. *J.C.S.Chem.Comm* **1982**, 672-674.
- (140) Ma, Y.-X.; Sonveaux, E. *Nucleosides Nucleotides* **1987**, *6*, 491-493.
-

- (141) Brown, J. M.; Christodoulou, C.; Reese, C. B.; Sindona, G. *J.Chem.Soc.Perkin.Trans.* **1984**, *1*, 1785-1790.
- (142) Reese, C. B. *Nucleosides Nucleotides* **1985**, *4*, 117-127.
- (143) Brown, J. M.; Christodoulou, C.; Jones, S. S.; Modak, A. S.; Reese, C. B.; Sibanda, S.; Ubasawa, A. *J.Chem.Soc.Perkin.Trans.* **1989**, 1735-1750.
- (144) Brown, J. M.; Christodoulou, C.; Modak, A. S.; Reese, C. B.; Serafinowski, H. T. *J.Chem.Soc.Perkin.Trans.* **1989**, 1751-1767.
- (145) Werstiuk, E. S.; Neilson, T. *Can.J.Chem.* **1972**, *50*, 1283-1291.
- (146) Green, D. P. L.; Ravindranathan, T.; Reese, C. B.; Saffhill, R. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 1031-1041.
- (147) Ohtsuka, E.; Shin, M.; Tozuka, Z.; Ohto, A.; Kitano, K.; Taniyama, Y.; Ikehara, M. *Nucleic Acids Res.Symp.Ser.* **1982**, *11*, 193-196.
- (148) Ohtsuka, E.; Taniyama, Y.; Marumato, R.; Sato, H.; Hirosaki, H.; Ikehara, M. *Nucleic Acid Res.* **1982**, *10*, 2597-2608.
- (149) Miyoshi, K.; Miyake, T.; Hozumi, T.; Itakura, K. *Nucleic Acid Res.* **1980**, *8*, 5474-5489.
- (150) Daub, G. W.; van Tamelen, T. T. *J.Am.Chem.Soc.* **1977**, *99*, 3526.
- (151) Eckstein, F.; Rizk, I. *Angew.Chem.Int.Edit* **1967**, *6*, 949.
- (152) Reese, C. B.; Saffhill, R. *Chem Commun* **1968**, 767.
- (153) Reese, C. B. *Phosphorus and Sulfur* **1976**, *1*, 245.
- (154) Stewart, J. C. M. *Ph.D.Thesis.Cambridge University* **1969**, 39.
- (155) Uhlmann, E.; Pfeleiderer, W. *Tetrahedron Lett.* **1980**, 1181-1184.
- (156) Bakke, J. *Acta Chem.Scand.* **1970**, *24*, 2650-2551.
- (157) Uhlmann, E.; Pfeleiderer, W. *Helv.Chim.Acta* **1981**, *64*, 1688-1703.
- (158) Christodoulou, C.; Reese, C. B. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 951-954.
- (159) Pfeleiderer, W.; Uhlmann, E.; Charubala, R.; Flockerzi, D.; Siber, G.; Verma, R. S. *Nucl.Acids Res.Symp.Ser.* **1980**, *7*, 61-71.
- (160) Reese, C. B. *Tetrahedron* **1978**, *34*, 3143.
- (161) Reese, C. B.; Yan Kui, Y. T. *J.C.S.Chem.Comm* **1977**, 802.
- (162) Reese, C. B.; Titmas, R. C.; Yan, L. *Tetrahedron Letters* **1978**, 2727-2730.
-

-
- (163) van Boom, J. H.; Burgers, P. M. J.; van Deursen, P. H. *Tetrahedron Letters* **1976**, 869.
- (164) Efimov, V. A.; Reverdatto, S. V.; Chakhmakhcheva, O. G. *Nucleic Acid Research* **1982**, *10*, 6675-6694.
- (165) Khorana, H. G. *The Nucleic Acids*; Chargraff, E., Davidson, J. N., eds. New York, 1960; pp 105-146.
- (166) Elmore, D. T.; Todd, A. R. *J.Chem.Soc.* **1952**, 3681-3683.
- (167) Ikehara, M.; Tezuka, T. *Nucl.Acids Res.* **1975**, *2*, 1345-1364.
- (168) Hayakawa, Y.; Uchiyama, M.; Noyori, R. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4003-4006.
- (169) Berlin, Yu. A.; Chakhmakhcheva, O. G.; Efimov, V. A.; Kolosov, M. N.; Korobko, G. *Tetrahedron Lett.* **1973**, 1353-1356.
- (170) Stawiński, J.; Hozumi, T.; Narang, S. A.; Bahi, C. B.; Wu, R. *Nucl.Acids Res.* **1997**, *4*, 353-371.
- (171) Jones, S. S.; Rayner, B.; Reese, C. B.; Ubasawa, A.; Ubasawa, B. *Tetrahedron* **1980**, *36*, 3075-3085.
- (172) Ohtsuka, E.; Tozuka, Z.; Iwai, S.; Ikehara, M. *Nucl.Acids Res.* **1982**, *10*, 6235-6241.
- (173) Ohtsuka, E.; Tozuka, Z.; Ikehara, M. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 4483-4486.
- (174) Efimov, V. A.; Chakhmakhcheva, O. G.; Ovchinnikov, Y. A. *Nucl.Acids Res.* **1985**, *13*, 3651-3666.
- (175) van Boom, J. H.; Burgers, P. M. J.; van Deursen, P. H.; Arenzen, R.; Reese, C. B. *Tetrahedron Letters* **1947**, 3785-3788.
- (176) Adamiak, R. W.; Arenzen, R.; Reese, C. B. *Tetrahedron Letters* **1977**, 1431-1434.
- (177) Itakura, K.; Katagiri, N.; Bahl, C. P.; Wightman, R. H.; Narang, S. A. *J.Am.Chem.Soc.* **1975**, *97*, 7327-7331.
- (178) Itakura, K.; Hirose, T.; Crea, R.; Rigs, A.; Hynecker, H. L.; Boliver, E.; Bover, H. W. *Science* **1978**, *198*, 1056-1063.
- (179) Rigs, A.; Itakura, K. *Science* **1977**, *196*, 177-180.
- (180) Crea, R.; Hirose, T.; Kraszewski, A.; Itakura, K. *Proc.Natl.Acid Sei.U.S.A.* **1978**, *75*, 5765-5769.
- (181) Broka, C.; Hazumi, T.; Arenzen, R.; Itakura, K. *Nucleic Acid Research* **1980**, *8*, 5461-5471.
-

-
- (182) Ohtsuka, E.; Hazumi, T.; Taniyama, Y.; Iwai, S.; Yoshido, T.; Ikehara, M. *Chem.Pharm.Bull.* **1984**, *32*, 85-93.
- (183) Ohtsuka, E.; Ikehara, M.; Söll, D. *Nucleic Acid Res.* **1982**, *10*, 6553-6570.
- (184) Gait, M. J.; Sheppard, R. C. *Nucleic Acid Res.* **1977**, *4*, 1135-1138.
- (185) Gait, M. J.; Sheppard, R. C. *Nucleic Acid Res.* **1977**, *4*, 4410.
- (186) Miyoski, K.; Itakura, K. *Tetrahedron Lett.* **1979**, 3635-3638.
- (187) Dembek, P.; Miyoshi, K.; Itakura, K. *J.Am.Chem.Soc.* **1981**, *103*, 706-708.
- (188) Markham, A. F.; Edger, M. D.; Atkinson, T. C.; Greene, A. R.; Heathcliffe, G. R.; Newton, C. R.; Scanlon, O. *Nucleic Acid Res.* **1980**, *8*, 5193-5205.
- (189) Mock, G. A.; Eaton, M. A. W. *Nucleic Acid Res.* **1982**, *10*, 5605-5620.
- (190) Fritz, H. J.; Belagaje, R.; Brown, E.; Fritz, R. H.; Jones, R. A.; Lees, R. G.; Khorana, H. G. *Biochemistry* **1978**, *17*, 1257-1267.
- (191) Miyoshi, K.; Arenzen, R.; Huang, T.; Itakura, K. *Nucleic Acid Res.* **1980**, *8*, 5507-5517.
- (192) Letsinger, R. L.; Mahadevan, V. J. *J.Am.Chem.Soc.* **1965**, *87*, 3526-3527.
- (193) Letsinger, R. L.; Mahadevan, V. J. *J.Am.Chem.Soc.* **1966**, *88*, 5319-5324.
- (194) Narang, S. A.; Brunfeld, K.; Norris, K. E. *Tetrahedron Lett.* **1977**, 1819-1822.
- (195) Ito, H.; Ike, Y.; Ikuta, S.; Itakura, K. *Nucleic Acid Res.* **1982**, *10*, 1769.
- (196) Ikehara, M.; Ohtsuka, E.; Tokunaga, T.; Laniyama, L.; Iwai, S.; Kitano, K.; Miyamoto, S. *Proc.Natl.Acid Sei.U.S.A.* **1984**, *81*, 5956-5960.
- (197) Köster, H.; Biernar, J.; Mc Mans, J.; Wolter, A.; Stumpe, A.; Narang, Ch. K.; Sinha, N. D. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 103-112.
- (198) Giegrich, H.; Bühler, S. E.; Hermann, C.; Kvasyuk, E.; Charubala, R.; Pfeleiderer, W. *Nucleosides Nucleotides* **1998**, *17*, 1987-1996.
- (199) Pirrung, M. C.; Shuey, S. W. *J.Org.Chem.* **1994**, *59*, 3890-3897.
- (200) Pillai, V. N. R. *Synthesis* **1980**, 1-26.
- (201) Pillai, V. N. R. *Organic Photochemistry* **1987**, *9*, 225-323.
- (202) Reichmanis, E.; Smith, B. C.; Gooden, R. J. *Polymer Sci.* **1985**, *23*, 1-8.
- (203) Döp, D. *Chem Commun* **1968**, 1284.
- (204) Furuta, T.; Torigai, H.; Osawa, T.; Iwamura, M. *Chem.Lett.* **1993**, 1179-1182.
-

- (205) Sheehan, J. C.; Wilson, R. M.; Oxford, A. W. *J.Am.Chem.Soc.* **1971**, *93*, 7222-7228.
- (206) Corrie, J. E. T.; Trentham, D. R. *J.Chem.Soc.Perkin.Trans.* **1992**, *1*, 2409-2417.
- (207) Rock, R. S.; Chan, S. I. *J.Org.Chem.* **1996**, *61*, 1526-1529.
- (208) Matuszewski, B.; Xue, J.-Y. *J.Am.Chem.Soc.* **1992**, *114*, 8708-8710.
- (209) Givens, R. S.; Athey, P. S.; Matuszewski, B.; Kveper, L. W.; Xue, J.-Y. *J.Am.Chem.Soc.* **1993**, *105*, 6001-6012.
- (210) Givens, R. S.; Matuszewski, B. *J.Am.Chem.Soc.* **1984**, *106*, 6860-6861.
- (211) Furuta, T.; Torigai, H.; Sugimoto, M.; Iwamura, M. *J.Org.Chem.* **1995**, *60*, 3953-3956.
- (212) Sierzchała, A.; Okruszek, A.; Stec, W. J. *J.Org.Chem.* **1996**, *61*, 6713-6716.
- (213) Pirrung, M. C.; Bradley, J. C. *J.Org.Chem.* **1995**, *60*, 6270-6276.
- (214) Berroy, P.; Viriot, M. L.; Carré, M. C. *Sensor and Actuators* **2001**, *B74*, 186-189.
- (215) Pease, A. C.; Solas, D.; Sullivan, E. J.; Cronin, M. T.; Holmes, Ch. P.; Fodor, S. P. A. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1994**, *91*, 5022-5026.
- (216) Eckert, H.; Forster, B. *Angew.Chem.Int.Edit* **1987**, *26*, 894-895.
- (217) Pirrung, M. C.; Bradley, J. C. *J.Org.Chem.* **1995**, *60*, 1116-1117.
- (218) Saha, A. K.; Schultz, P.; Rapoport, H. *J.Am.Chem.Soc.* **1988**, *111*, 4856-4859.
- (219) Ohta, S.; Yamashita, M.; Nagai, N.; Kawasaki, I.; Maeda, K.; Miyano, Y. *Heterocycles* **1995**, *41*, 1683-1689.
- (220) Pirrung, M. C. *Angew.Chem.Int.Edit* **2002**, *41*, 1276-1289.
- (221) Holmes, Ch. P.; Fodor, S. P. A. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **1994**, *91*, 5022-5026.
- (222) Garegg, P. J.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Strömberg, R. *Chem.Scr.* **1985**, *25*, 280-282.
- (223) Froehler, B. C.; Matteucci, M. D. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 469-472.
- (224) Froehler, B. C.; Ng, P. G.; Matteucci, M. D. *Nucl.Acids Res.* **1986**, *14*, 5399-5407.
- (225) Andrus, A.; Ffcavitich, J. W.; Mc Bride, L. J.; Giusti, B. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 861-864.
- (226) Jankowska, J.; Sobkowski, M.; Stawiński, J.; Kraszewski, A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 3355-3358.
-

- (227) Garegg, P. J.; Regberg, T.; Stawinski, J.; Strömberg, R. *Chemica Scripta* **1985**, 25, 280-282.
- (228) Froehler, B. C.; Ng, P. G.; Matteucci, M. D. *Nucl.Acids Res.* **1986**, 14, 5399-5407.
- (229) Tener, G. M. *Bull.Chem.Can* **1961**, 83, 159-168.
- (230) Pirrung, M. C. Shuey, S. W. and Bradley, J. C. 08/406,327(5,908,926), 1-16. 1995. Durham, N.C.

Ref Type: Patent

- (231) Sinyakov, A. N.; Lomakin, A. I.; Popov, S. G. *Bioorg.Chem.Ros.* **1984**, 1, 68-74.
- (232) Schirmeister, H.; Himmelsbach, F.; Pfeleiderer, W. *Helv.Chim.Acta* **1993**, 76, 385-401.
- (233) Schirmeister, H.; Pfeleiderer, W. *Nucleosides Nucleotides* **1987**, 6, 501-503.
- (234) Reiner, T.; Kvasyuk, E.; Pfeleiderer, W. *Helv.Chim.Acta* **2000**, 83, 3053-3063.
- (235) Sinha, N. D.; Davis, P.; Schultze, L. M.; Upadhyya, K. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 63, 9277-9280.
- (236) Sadana, K. L.; Hruska, F. E.; Loewen, P. C. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 3367-3370.
- (237) Vogel, A. I. *Odczynniki nieorganiczne-ciecze*; 1964; pp 190-191.
-