

Michał Sobkowski

**CHEMICZNA SYNTEZA
NIERADIOIZOTOPOWYCH SOND
MOLEKULARNYCH**

Praca doktorska

*wykonana pod kierunkiem doc. dr hab. Adama Kraszewskiego
w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu*

*Mojemu promotorowi,
Panu doc. dr hab. Adamowi Kraszewskiemu
za wskazanie interesującego tematu
i wszechstronną pomoc
w trakcie wykonywania pracy
składam serdeczne podziękowania*

*Panu prof. dr hab. Jackowi Stawińskiemu
za cenne rady i dyskusje naukowe
w trakcie wykonywania pracy
składam serdeczne podziękowania*

SPIS TREŚCI

I. WPROWADZENIE.....	1
II. SPIS DONIESIENŃ NAUKOWYCH OPUBLIKOWANYCH W TRAKCIE WYKONYWANIA NINIEJSZEJ PRACY	2
1. PUBLIKACJE BEZPOŚREDNIO ZWIĄZANE Z TEMATEM PRACY	2
2. INNE PUBLIKACJE	3
III. SKRÓTY STOSOWANE W PRACY	4
IV. MODYFIKACJE OLIGONUKLEOTYDÓW – PRZEGLĄD LITERATUROWY	6
1. WSTĘP	6
2. MODYFIKACJE 3'-KOŃCA OLIGONUKLEOTYDU	11
A. Modyfikacje wprowadzające jedną grupę funkcyjną	11
a) Wprowadzanie grupy tiolowej	11
b) Wprowadzanie grupy aminowej	14
c) Wprowadzanie grupy aldehydowej	17
B. Łączniki wprowadzające różne grupy funkcyjne	18
C. Łączniki wprowadzające grupę reporterową	19
D. Łączniki dające trwałe przyłączenie oligomeru do podłoża	20
E. Podsumowanie	20
3. MODYFIKACJE 5'-KOŃCA OLIGONUKLEOTYDU	21
A. Etapowa modyfikacja oligonukleotydu	21
B. Modyfikowane syntony nukleotydowe	24
C. Syntony nienukleotydowe	25
D. Fosforylacja 5'-końca oligonukleotydu	34
4. MODYFIKACJE W POZYCJACH 1', 2' I 4' SZKIELETU CUKROWEGO	37
A. Modyfikacje pozycji 1'	37
B. Modyfikacje pozycji 4'	38
C. Modyfikacje pozycji 2'-OH	39
D. Podsumowanie	40
5. MODYFIKACJE ZASAD HETEROCYKLICZNYCH	40
6. MODYFIKACJE INTERNUKLEOTYDOWYCH GRUP FOSFORANOWYCH	46
A. Modyfikacje prowadzące do amidofosforanów	46
B. Modyfikacje prowadzące do tiofosforanów	48
C. Kombinacja modyfikacji poprzez amidofosforany i tiofosforany	49
D. Inne metody modyfikacji	50
E. Podsumowanie	50
7. ZAMIANA GRUP FUNKCYJNYCH	50
8. PODSUMOWANIE	52
V. WYNIKI I DYSKUSJA	53
1. WSTĘP	53
2. BADANIA NAD FUNKCJONALIZACJĄ OLIGONUKLEOTYDÓW WEDŁUG WARIANTU I	55
A. Badania na związkach modelowych	55
a) Fosfonylacja	55
(1) Kwas pirofosfonowy	55
(2) Fosforyn difenyłowy	56
b) Reakcje H-fosfonianów nukleozydów z reagentami bifunkcyjnymi	58
(1) Reakcje H-fosfonianów nukleozydów z aminoalkoholami	58
(a) Kondensacja wobec chlorku piwaloilu	59
(b) Kondensacja z preaktywacją H-fosfonianu	59
(c) Kondensacja z preacylacją aminoalkoholi	62
(d) Kondensacja wobec 2-chloro-5,5-dimetylo-2-okso-2λ ³ -1,3,2-dioksafofinanu (NEP-Cl)	63
(2) Reakcje H-fosfonianów nukleozydów z diolami	65

(a) Kondensacja standardowa wobec chlorku piwaloilu	66
(b) Kondensacja z preaktywacją H-fosfonianu	66
(c) Kondensacja wobec 2-chloro-5,5-dimetylo-2-okso-2λ ⁵ -1,3,2-dioksafosfinanu (NEP-Cl)	68
(d) Wnioski	71
(3) Porównanie dioli i aminoalkoholi	71
B. Funkcjonalizacja oligonukleotydów na podłożu stałym	72
a) Fosforylacja	72
(1) Kwas pirofosfonowy	72
(2) Fosforyn difenyłowy	73
b) Przyłączenie aminoalkoholu do 5'-H-fosfonylowanych oligonukleotydów	74
(1) Kondensacja 5'-H-fosfonianu oligonukleotydu z aminoalkoholami	74
(2) Transestryfikacja 5'-fenylo-H-fosfonianu oligonukleotydu aminoalkoholami	76
(3) Modyfikacje aminoalkilo-oligonukleotydów podczas odblokowania	77
3. BADANIA NAD FUNKcjONALIZACJĄ OLIGONUKLEOTYDÓW WEDŁUG WARIANTU II	79
A. Badania związków modelowych	79
a) Kondensacja oksydacyjna nukleozydowych diestrów H-fosfonianowych z aminoalkoholami	79
b) Reakcje transestryfikacji H-fosfonianów nukleozydów	82
(1) Reakcje H-fosfonianu nukleozydowo – etylowego	83
(a) Reakcje z etanolem	83
(b) Reakcje z n-butyloaminą	84
(c) Reakcje z mieszaniną etanolu i n-butyloaminy	85
(d) Reakcje z aminoalkoholami	85
(2) Reakcje H-fosfonianu nukleozydowo – cyjanoetylowego	89
(a) Reakcje z etanolem i n-butyloaminą	89
(b) Reakcje z aminoalkoholami	91
(3) Reakcje H-fosfonianu dinukleozydowego z aminoalkoholami	92
(4) Reakcje transestryfikacji i aminolizy H-fosfonianu nukleozydowo – p-chlorofenyłowego	93
(5) Transestryfikacja fosfonianu difenyłowego alkoholami – synteza H-fosfonianowych monoestrów alkilowych	95
(6) Reakcje transestryfikacji fosforynu difenyłowego aminoalkoholami. Otrzymywanie syntonów nienukleozydowych	96
B. Funkcjonalizacja oligonukleotydów na podłożu stałym	98
a) Synteza 5'-(2-cyjanoetylo)-H-fosfonianów oligonukleotydów	99
(1) Kondensacja z H-fosfonianem 2-cyjanoetylowym	99
(2) Reakcja z fosforynem difenyłowym	100
b) Kondensacja oksydacyjna	100
4. BADANIA NAD FUNKcjONALIZACJĄ OLIGONUKLEOTYDÓW WEDŁUG WARIANTU III	101
5. WŁĄCZANIE GRUP REPORTEROWYCH DO SFUNKcjONALIZOWANYCH OLIGOMERÓW	103
VI. PODSUMOWANIE	106
VII. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	110
VIII. LITERATURA	130

I. WPROWADZENIE

W ostatnim trzydziestoleciu dynamicznemu rozwojowi biologii molekularnej towarzyszył równoległy, równie dynamiczny rozwój metod analitycznych, które, by spełnić coraz wyższe wymagania badaczy, musiały dostarczyć wyniku jednoznacznego i jednocześnie możliwie najbardziej precyzyjnego. Pośród biomolekuł szczególnie intensywnie badanych, kwasy nukleinowe zajmowały i wciąż zajmują pozycję wyróżniającą. Związane jest to z faktem, że kwasy nukleinowe w żywych organizmach odgrywają podstawową rolę, począwszy od zapisu informacji genetycznej (DNA) warunkującej funkcjonowanie organizmów, przez udział w procesie biosyntezy białek (mRNA i tRNA), do podstawowych elementów budulcowych dużych, biologicznie funkcjonalnych struktur takich jak np. rybosomy (rRNA). Dlatego też szczególnie dużo wysiłku poświęcono badaniom nad udoskonaleniem metod analitycznych kwasów nukleinowych. Jedną z nich jest metoda wykorzystująca wyjątkowo specyficzne, wzajemne oddziaływania kwasów nukleinowych, tzn. naturalną właściwość tworzenia struktur dwu- lub trójniciowych (dupleksów i tripleksów). W metodzie tej, stosując tzw. oligonukleotydydowe sondy molekularne, możliwe jest wyszukanie w badanym DNA lub RNA sekwencji komplementarnych jedynie do sondy, wśród wielu innych, nawet bardzo podobnych. Zrodziło to ogromne zapotrzebowanie ze strony laboratoriów badawczych i diagnostycznych na sondy oligonukleotydydowe, szczególnie takie, których wykrywanie oparte jest na tzw. detekcji nieradioizotopowej. Jak dotąd ukazało się kilkaset prac opisujących metody syntezy takich sond, jednakże trudno jest przyjąć którąś z nich jako metodę uniwersalną. Ponadto, metody te z reguły ukierunkowane są na syntezę jednego typu sondy i często wymagają stosowania złożonych substratów, co jest możliwe tylko w odpowiednio przygotowanych i wyspecjalizowanych laboratoriach. Stopień trudności przygotowania oligonukleotydydowych sond molekularnych o nieradioizotopowej detekcji warunkuje ich dostępność i powszechność stosowania w badaniach biologii molekularnej i, co może ważniejsze, w diagnostyce klinicznej. Dlatego też podjąłem badania nad opracowaniem nowych, bardziej uniwersalnych metod syntezy oligonukleotydydowych sond molekularnych o nieradioizotopowej detekcji, gdyż, w moim przekonaniu, może to przyczynić się do dalszego upowszechnienia stosowania tego typu "narzędzi molekularnych" w analityce laboratoryjnej i klinicznej. Wyniki tych badań stanowią treść niniejszej rozprawy.

II. SPIS DONIESIEŃ NAUKOWYCH OPUBLIKOWANYCH W TRAKCIE WYKONYWANIA NINIEJSZEJ PRACY

1. PUBLIKACJE BEZPOŚREDNIO ZWIĄZANE Z TEMATEM PRACY

1. Adam Kraszewski, Michał Sobkowski i Jacek Stawiński, „Studies on Reactions of Nucleoside H-Phosphonates with Bifunctional Reagents. Part 1. Reactions with Amino Alcohols”, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1993**, 1699–1704.
2. Michał Sobkowski, Jacek Stawiński, Anna Sobkowska i Adam Kraszewski „Studies on Reactions of Nucleoside H-Phosphonates with Bifunctional Reagents. Part 2. Stability of Nucleoside H-Phosphonate Diesters in the Presence of Amino Alcohols”, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1994**, 1803–1808.
3. Michał Sobkowski i Adam Kraszewski, „Chemical Synthesis of Molecular Probes Carrying Nonradioisotopic Reporter Groups”, *Materiały zjazdowe konferencji „First French – Polish Graduate Students Workshop”, Poznań 1994.*
4. Michał Sobkowski, Jacek Stawiński, Anna Sobkowska i Adam Kraszewski „Studies on Reactions of Nucleoside H-Phosphonates with Bifunctional Reagents. Part 3. Further Studies on Transesterification of Nucleoside H-Phosphonate Diesters with Amino Alcohols” *Nucleosides & Nucleotides*, **1995**, *14*(3-5), 839–842.
5. Annika Kers, Inger Kers, Jacek Stawiński, Michał Sobkowski i Adam Kraszewski „Studies on Aryl H-Phosphonates; Part 2. A General Method for the Preparation of Alkyl H-Phosphonate Monoesters”, *Synthesis*, **1995**, *4*, 427–430.
6. Michał Sobkowski, Jacek Stawiński i Adam Kraszewski, „Studies on Reactions of Nucleoside H-Phosphonates with Bifunctional Reagents. Part 4. Oxidative Amidation or Esterification of Nucleoside H-Phosphonate Diesters Controlled by Protonation of Amine Function of Amino Alcohols”, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, *36*(13), 2295–2298.
7. Anna Sobkowska, Michał Sobkowski, Jacek Stawiński i Adam Kraszewski „Studies on Aryl H-Phosphonates. Synthesis of Nucleoside N-Alkylphosphonamides”, *Nucleosides & Nucleotides*, **1995**, *14*(3-5), 703–706.
8. Michał Sobkowski, Jacek Stawiński i Adam Kraszewski „Aryl H-Phosphonates. Part 5. A Simple Method for the Synthesis of Aminoalkyl H-Phosphonate Monoesters via Transesterification of Diphenyl H-Phosphonate with Amino Alcohols”, *Collect. Czech. Chem. Commun. (Special Issue)*, **1996**, *61*, S238–S241.
9. Jacek Stawiński, Adam Kraszewski i Michał Sobkowski „Exploring Reactions of Nucleoside H-Phosphonates with Bifunctional Reagents”, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon*, **1996**, *109-110*, 261–264.

- 10.** Annika Kers, Inger Kers, Adam Kraszewski, Michał Sobkowski, Thomas Szabó, Maths Thelin i Jacek Stawiński „Nucleoside Phosphonates. Development of Synthetic Methods and Reagents”, *Nucleosides & Nucleotides*, **1996**, *15*(1-3), 361–378.
- 11.** Jacek Cieślak, Jadwiga Jankowska, Annika Kers, Inger Kers, Anna Sobkowska, Michał Sobkowski, Jacek Stawiński i Adam Kraszewski „Some Applications of Aryl H-Phosphonates in Nucleotide Chemistry”, *Collect. Czech. Chem. Commun. (Special Issue)*, **1996**, *61*, S242–S245.
- 12.** Michał Sobkowski, Adam Kraszewski i Jacek Stawiński, „Studies on Reactions of Nucleoside H-Phosphonates with Bifunctional Reagents. Part 5. Functionalization of support-bound oligonucleotides and synthesis of non-radioactive hybridization probes”, *Nucleosides & Nucleotides*, przyjęte do druku.

2. INNE PUBLIKACJE

- 13.** Jadwiga Jankowska, Michał Sobkowski, Jacek Stawiński i Adam Kraszewski, „Studies on Aryl H-Phosphonates. I. An Efficient Method for the Preparation of Deoxyribo- and Ribonucleoside 3'-H-Phosphonate Monoesters by Transesterification of Diphenyl H-Phosphonate”, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*(20), 3355–3358.
- 14.** Günther Ott, Lubos Arnold, Jiri Smrt, Michał Sobkowski, Stefan Limmer, Hans-Peter Hofmann i Mathias Sprinzl, „The Chemical Synthesis of Biochemically Active Oligoribonucleotides Using Dimethylaminomethylene Protected Purine H-Phosphonates”, *Nucleosides & Nucleotides*, **1994**, *13*(5), 1069–1085.
- 15.** Annika Kers, Inger Kers, Jacek Stawiński, Michał Sobkowski i Adam Kraszewski „Studies on Aryl H-Phosphonates. Part 3. Mechanistic Investigations Related to the Disproportionation of Diphenyl H-Phosphonate Under Anhydrous Basic Conditions”, *Tetrahedron*, **1996**, *52*(29), 9931–9944.
- 16.** Jacek Cieślak, Michał Sobkowski, Jacek Stawiński i Adam Kraszewski „Aryl H-Phosphonates. Part 4. Nucleoside Aryl H-Phosphonate Diesters – a New Type of Efficient Intermediate Substrate in Internucleotide Bond Formation”, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*(26), 4561–4564.
- 17.** Anna Sobkowska, Michał Sobkowski, Jacek Cieślak, Inger Kers, Jacek Stawiński i Adam Kraszewski „Aryl-H-phosphonates. Part 6. Synthetic studies on the preparation of nucleoside N-alkyl-phosphonamidates”, *J. Org. Chem.*, **1997**, przyjęte do druku.

III. SKRÓTY STOSOWANE W PRACY

- A – adenzyna
- Ade – adenina
- A. E. – analiza elementarna
- AP – *Alkaline Phosphatase* (alkaliczna fosfataza)
- B – zasada purynowa lub pirymidynowa
- BP – *Bromophenol Blue* (błękit bromofenolowy)
- Boc – *tert*-butyloksykarbonyl
- BOP – heksafluoroboran benzotriazolo-1-yl-oksy-tris-(dimetyloamino)fosfonowy
- C – cytydyna
- CE – 2-cyjanoetyl
- CPG – *Controlled Pore Glass*
- Cyt – cytozyna
- DMAP – 4-dimetyloaminopirydyna
- DMTr – 4,4'-dimetoksytrytyl [bis(4-metoksyfenylo)fenylometyl]
- DNP – 2,4-dinitrofenyl
- DTT – 1,4-ditio-D,L-treitol
- EDA – etylenodiamina (1,2-diaminoetan)
- ekw. – ekwiwalent molowy
- Fmoc – fluoren-9-ylometoksykarbonyl
- Frac – *Fractosil*
- G – guanozyna
- Gua – guanina
- HOBt – 1-hydroksybenzotriazol
- HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (wysokorozdzielcza chromatografia cieczowa)
- HRMS – *High Resolution Mass Spectrometry* (wysokorozdzielcza spektrometria masowa)
- LCAA-CPG – *Long Chain Aminoalkyl Controlled Pore Glass*
- Lv – lewulinył [4-oksopentanoil, CH₃C(O)CH₂CH₂C(O)-]
- MS – *Mass Spectrometry* (spektrometria masowa)
- NEP-Cl – chlorofosforan neopentylenu (2-chloro-5,5-dimetylo-2-okso-2λ⁵-1,3,2-dioksafosfinan)
- Npe – 2-(*p*-nitrofenylo)etyl
- ODN – oligodeoksynukleotydy
- OPC – *Oligonucleotide Purification Cartridge* (wkład do oczyszczania oligonukleotydów)

-
- P – podłoże stałe
 - PAGE – *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (elektroforeza na żelu poliakrylamidowym)
 - PCR – *Polimerase Chain Reaction* (łańcuchowa reakcja polimerazy)
 - PEG-DME – *Polyethylenglycol Dimethylether* (eter dimetylowy glikolu polietylenowego)
 - Pix – piksyl (9-fenyloksanten-9-yl)
 - PS – polistyren
 - PivCl – chlorek piwaloilu (chlorek trimetyloacetylu)
 - RP – *Reverse Phase* (faza odwrócona)
 - T – tymidyna
 - Thy – tymina
 - tosyl – *p*-toluenosulfonyl
 - Tr – trytyl (trifenylometyl)
 - Ura – uracyl
 - XC – *Xylene cyanole FF* (Ksylencyjanol FF)

IV. MODYFIKACJE OLIGONUKLEOTYDÓW – PRZEGLĄD LITERATUROWY

1. WSTĘP

Naturalną formą wzajemnych oddziaływań kwasów nukleinowych jest tzw. hybrydyzacja, czyli tworzenie struktur dwu lub więcej niciowych, będących wynikiem parowania zasad purynowych i pirymidynowych (T lub U z A, C z G). Proces ten zachodzi z bardzo wysoką specyficznością. To ostatnie wykorzystano do wykrywania w mieszaninach DNA lub RNA określonych sekwencji przy pomocy tzw. oligonukleotydowych sond molekularnych. Oligonukleotydowe sondy molekularne są to oligomery o zdefiniowanych (najczęściej programowanych) sekwencjach, które są komplementarne do sekwencji adresowanej (poszukiwanej). W odpowiednio dobranych warunkach sonda hybryduje jedynie z sekwencją komplementarną, pomimo obecności w badanym materiale wielu (często kilku lub kilkadziesiąt milionów) fragmentów o wysokiej homologii do sekwencji poszukiwanej. W eksperymentach kompetycyjnych, w których stosowano dwie krótkie sondy syntetyczne, z czego jedna była dokładnie komplementarna do sekwencji adresowanej, a druga miała zmienioną tylko jedną jednostkę nukleotydową, ta pierwsza tworzyła dupleks ze stukrotnie większą wydajnością niż druga¹.

Niezwykle wysoką specyficzność procesu hybrydyzacji wykorzystano w diagnostyce genetycznej do wykrywania nawet pojedynczych mutacji w badanym materiale (najczęściej genomowy DNA lub pula komórkowego RNA). Najprostszy protokół hybrydyzacyjny realizowany jest w czterech etapach:

- 1) immobilizacja badanego materiału,
- 2) hybrydyzacja z sondą molekularną,
- 3) odmycie nadmiaru reagentów,
- 4) detekcja sondy.

Analiza prowadzona wg tego protokołu nie zawsze daje dostatecznie jednoznaczne wyniki ze względu na tzw. sygnały tła. Wprowadzono więc szereg wariantowych podejść analitycznych, których celem było podwyższenie specyficzności oddziaływań sondy lub systemu sond z badanym DNA lub RNA²⁻⁴. Typowe przykłady takich metod to tzw. hybrydyzacja „warstwowa” („kanapkowa” – *sandwich hybridisation*) lub jej odmiana – hybrydyzacja „prętowa” (*dipstick hybridisation*) oraz hybrydyzacja „z wymianą nici” (*strand displacement hybridisation*). W dwóch pierwszych przypadkach stosuje się układ dwóch sond oligonukleotydowych, z których jedna, immobilizowana, wychwytuje fragmenty DNA lub RNA zawierające poszukiwaną sekwencję, a drugi oligomer, sonda detekcyjna, służy do wizualizacji utworzonego hybrydu. W metodzie „z wymianą nici” immobilizowany układ sondy

wychwytyjącej i tylko częściowo do niej komplementarnej sondy detekcyjnej (chodzi o celowe utworzenie możliwie nietrwałego dupleksu) traktuje się mieszaniną kwasów nukleinowych. Jeżeli w analizowanym materiale obecne są sekwencje dokładnie komplementarne do sondy wychwytyjącej, to te fragmenty DNA (lub RNA) wypierają sondę detekcyjną z pierwotnego kompleksu. Porównanie ilości sondy detekcyjnej wciąż związanej z podłożem z tą, jaka jest w roztworze, pozwala na stwierdzenie obecności i ilościowe oszacowanie zawartości poszukiwanej sekwencji w badanym materiale.

W analityce molekularnej wykorzystuje się sondy oligonukleotydowe pochodzenia naturalnego (kilkaset nukleotydów) lub sondy syntetyczne (zwykle o długości 10 – 50 nukleotydów). Zalety sond syntetycznych to^{2,5}:

- stosunkowo łatwa dostępność,
- możliwość dowolnego programowania sekwencji sondy,
- nie ma potrzeby denaturacji, gdyż sonda jest jednoniciowa,
- krótki czas hybrydyzacji (minuty),
- wysoka selektywność.

Oligonukleotydy pochodzenia naturalnego lub otrzymane na drodze chemicznej syntezy wtedy i tylko wtedy mogą być sondami molekularnymi, kiedy można je wykrywać. Sprawa ta jest niezwykle istotna ze względu na fakt, iż ilości analizowanego materiału są zazwyczaj niewielkie. Popularnie stosowane bezpośrednie metody wykrywania kwasów nukleinowych, takie jak absorpcja UV lub wybarwienie, są dalece niewystarczające do wykrycia nawet nanomolowych ilości dupleksu sonda–analizowany DNA lub RNA. Po to, by zwiększyć czułość detekcji, zaopatruje się sondy molekularne w różnego typu znaczniki (atomy, grupy reporterowe), które można wizualizować nawet przy bardzo małych stężeniach (np. attomolowych). Dotychczas najpowszechniej stosowanymi znacznikami sond molekularnych są radioizotopy wprowadzane do szkieletu oligonukleotydu w miejsce ich niepromieniotwórczych, naturalnych odpowiedników. Znaczniki radioizotopowe mają tę zaletę, że pozwalają wykrywać stosunkowo niewielkie ilości (rzędu 10^{-18} mola) sondy i nie zmieniają jej struktury chemicznej. Jednakże przygotowanie i stosowanie sond znaczonych radioizotopami wiąże się z poważnymi niedogodnościami i niebezpieczeństwami takimi jak:

- konieczność zorganizowania laboratorium radioizotopowego,
- konieczność odpowiedniego wyszkolenia personelu,
- niebezpieczeństwo radioaktywnego skażenia otoczenia,
- problem odpadów promieniotwórczych,
- ograniczony czas życia izotopów radioaktywnych (np. $t_{1/2}$ dla ^{32}P wynosi 14,3 dnia),
- drogie odczynniki znakowane izotopami promieniotwórczymi,
- możliwość radiolizy badanego materiału,
- konieczność wielokrotnego znakowania sondy przy długich seriach badań,
- utrudnione pomiary ilościowe.

Powyższe niedogodności sprawiły, że od kilkunastu lat trwają prace nad alternatywnymi metodami syntezy i detekcji sond molekularnych. Działania te są dodatkowo stymulowane potrzebami laboratoriów klinicznych, oczekujących systemów prostych, możliwie tanich i bezpiecznych. Prace te koncentrują się nad opracowaniem nowych metod przygotowania sond niosących znaczniki nieradioizotopowe, które można wykrywać przez rejestrację fluorescencji, luminescencji lub barwnej reakcji enzymatycznej^{2,6-9}. Pomimo znacznej intensyfikacji badań w ostatnich latach, nie opracowano uniwersalnego podejścia, które zyskałoby powszechną akceptację. Wciąż poszukuje się prostszych, skuteczniejszych i tańszych systemów wprowadzania grup reporterowych do oligonukleotydów.

Projektując nową metodę nieradioizotopowego znakowania oligonukleotydu należy wziąć pod uwagę następujące kryteria:

- tanie i łatwo dostępne reagenty,
- łatwość i szybkość modyfikacji oligonukleotydu,
- możliwość automatyzacji procesu modyfikacji,
- trwałość sondy w warunkach hybrydyzacji,
- wykrywalność sondy po hybrydyzacji,
- trwałość sondy podczas przechowywania,
- łatwość modyfikacji metody,
- koszty.

Jednym z podstawowych kryteriów decydujących o przydatności sondy znakowanej nieradioizotopowo jest poziom jej detekcji, który powinien być przynajmniej porównywalny z poziomem detekcji sondy radioizotopowej (Tabela 1^{6,10}). Taką wykrywalność uzyskano już

TABELA 1. Przykłady grup reporterowych wykorzystywanych do znakowania sond molekularnych

Typ grupy reporterowej	Znacznik	Wykrywalność sondy (x 10 ⁻¹⁸ mola)	Metoda detekcji
Radioizotop	³² P, ³⁵ S, ¹²⁵ I	0,05 – 6*	Autoradiografia, zliczanie scyntylacyjne
Enzym	Peroksydaza, alkaliczna fosfataza	0,1 – 10	Kolorymetria, fluorymetria, luminometria
Fluorofor	Fluoresceina, rodamina, akrydyna	1 – 100	Fluorymetria
Chelatowany jon metalu ziem rzadkich	Europ, terb	1 – 100	Fluorymetria szybka

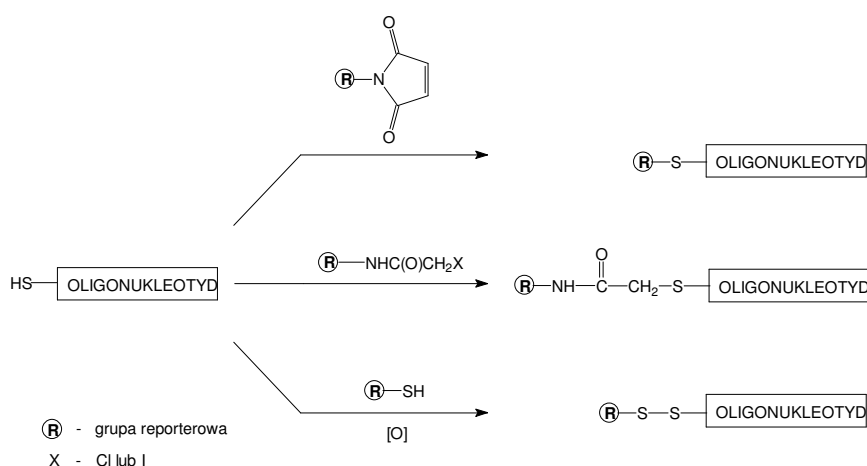
dla technik opartych na reakcjach enzymatycznych¹¹⁻¹⁹. Pomimo że w prostych i tanich metodach opartych na bezpośrednim pomiarze fluorescencji, uzyskiwany sygnał jest słabszy niż dla metod radioizotopowych czy enzymatycznych, możliwe jest jednak uzyskanie równie

* Standardowa autoradiografia oligomeru znakowanego ³²P (24h) pozwala wykrywać ok. 6x10⁻¹⁸ mola sondy.

wysokiego poziomu wykrywania sond fluorescencyjnych poprzez zastosowanie odpowiednich czytników lub poprzez zwiększenie ilości badanego kwasu nukleinowego za pomocą technik amplifikacyjnych *in vitro*, z których najpowszechniejszą jest łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)^{20,21}.

Grupy reporterowe przyłączane są do oligomerów najczęściej za pomocą odpowiedniego łącznika (linkera). Jest nim zwykle łańcuch polimetylenowy zakończony grupą aktywną chemicznie (np. $-NH_2$, $-SH$), wykorzystywaną do wiązania grupy reporterowej. Wiązanie to musi być trwałe w warunkach izolacji i dalszego stosowania sondy. W niektórych metodach przyłączanie grup reporterowych można przeprowadzać w środowisku wodnym, co stosuje się podczas modyfikacji fragmentów kwasów nukleinowych po usunięciu grup ochronnych.

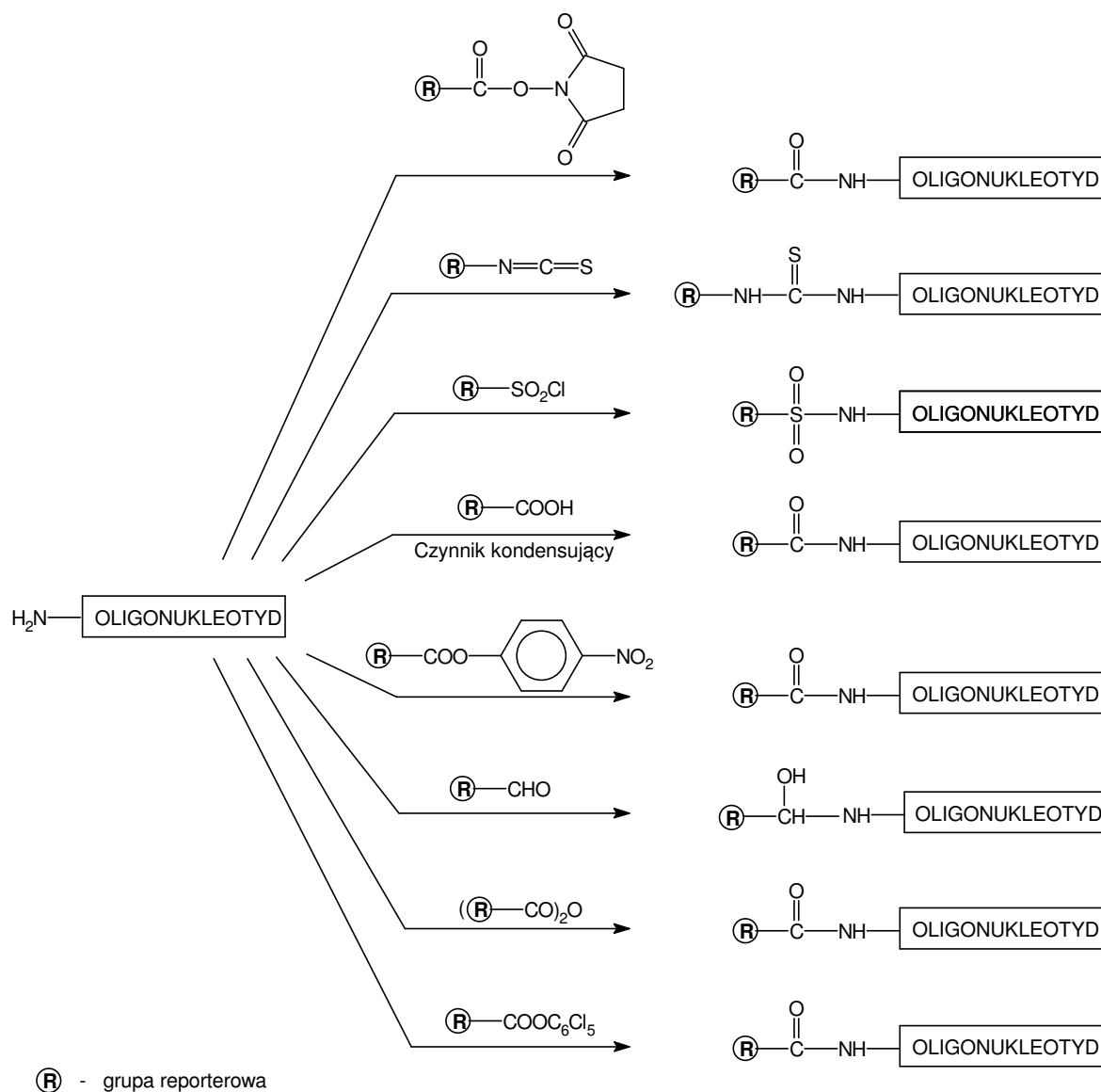
Grupy reporterowe typu alkilującego – imidy kwasu maleinowego i halogenoacetamidy – przyłącza się do reszty tiolowej łącznika, wykorzystując podatność atomu siarki na alkilację. Inną cechą reszty tiolowej, wykorzystywaną do przyłączania grup reporterowych (np. białek), jest łatwe wytwarzanie wiązań disiarczkowych w reakcji z drugą grupą tiolową (Rys. 1).



RYS. 1. Reakcje pochodnych grup reporterowych z oligonukleotydem funkcjonalizowanym grupą tiolową

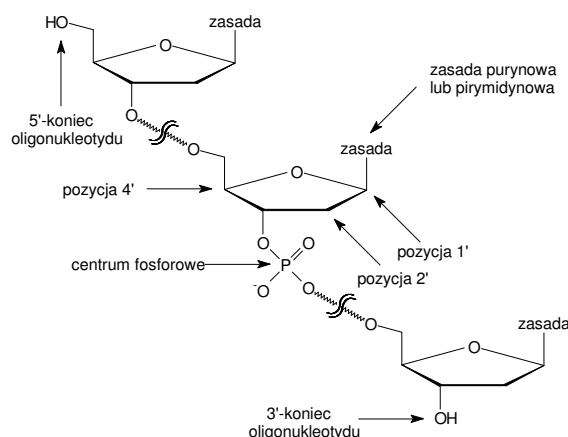
Do znakowania oligonukleotydów zmodyfikowanych ugrupowaniami z wolnymi funkcjami aminowymi (Rys. 2²²) stosuje się grupy reporterowe z ugrupowaniami acylującymi (np. izotiocyjaniiny czy estry *p*-nitrofenylowe).

W wyniku reakcji pochodnych grup reporterowych z centrum nukleofilowym łącznika powstaje wiązanie tioeterowe (dla reszty $-SH$) lub karbamidowe czy tiomocznikowe (dla reszty $-NH_2$). Tego typu połączenia są trwałe w warunkach izolowania, oczyszczania i aplikacji sond molekularnych.



RYS. 2. Reakcje pochodnych grup reporterowych z oligonukleotydem funkcjonalizowanym grupą aminową

Jako miejsca modyfikacji proponuje się praktycznie wszystkie elementy struktury łańcucha oligonukleotydowego: zasady azotowe (puryny i pirymidyny), szkielet cukrowy oraz resztę fosforanową (Rys. 3). W dalszych częściach rozdziału omówione zostaną poszczególne podejścia i ich konsekwencje.



RYS. 3. Miejsca funkcjonalizacji oligonukleotydów

2. MODYFIKACJE 3'-KOŃCA OLIGONUKLEOTYDU

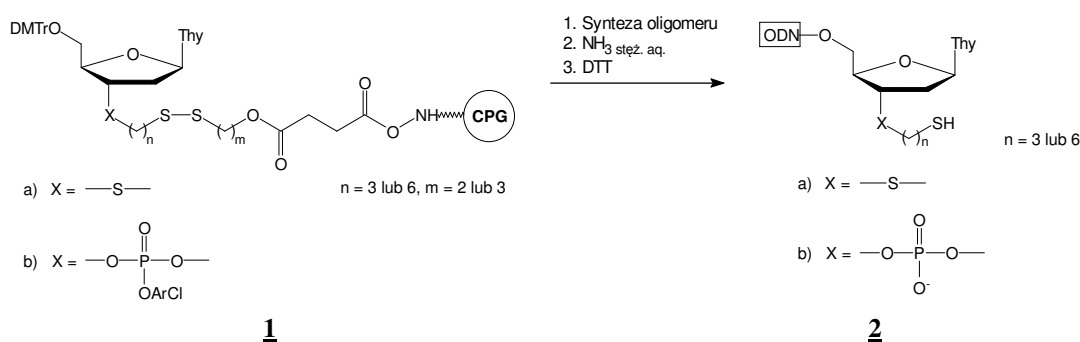
W obecnie stosowanych standardowych podejściach chemiczna synteza oligonukleotydów prowadzona jest w kierunku 3'→5'. Tak więc modyfikacja 3'-końcowej grupy hydroksylowej przeprowadzana jest zazwyczaj poprzez odpowiednie przygotowanie podłoża stałego przed syntezą oligonukleotydu. Do podłoża przyłącza się cząsteczkę niosącą dwie grupy funkcyjne. Jedna z nich służy do związania z podłożem łańcucha oligonukleotydowego w trakcie jego syntezy, natomiast druga, odpowiednio chroniona, jest nieaktywna. Po zakończeniu syntezy, podczas usuwania grup ochronnych, następuje odcięcie oligonukleotydu od podłoża z jednoczesnym odsłonięciem grupy funkcyjnej na końcu 3'. Po izolacji zmodyfikowanego oligonukleotydu, grupę reporterową przyłącza się w roztworze. Stosuje się również podłoża, do których, oprócz grupy funkcyjnej niezbędnej do syntezy oligonukleotydu, przyłączona jest jednocześnie odpowiednio zabezpieczona grupa reporterowa. W tym przypadku po finalnym odblokowaniu uzyskuje się oligomer z już przyłączoną na 3'-końcu grupą reporterową. W opisanych podejściach mamy pewność 100% modyfikacji oligomeru. Inną zaletą oligonukleotydów z modyfikowanym 3'-końcem jest ich zwiększona odporność na działanie nukleaz, co może być istotne np. podczas hybrydyzacji *in situ*. Jednakże niektóre modyfikacje końca 3' oligomeru uniemożliwiają zastosowanie takich sond jako starterów w reakcji amplifikacji (PCR).

A. Modyfikacje wprowadzające jedną grupę funkcyjną

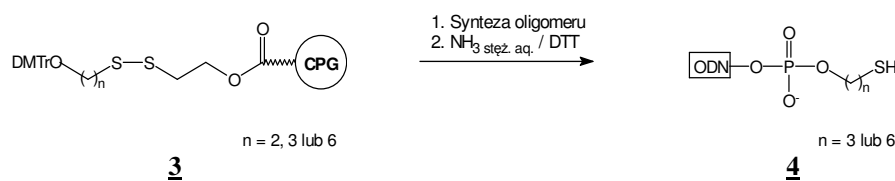
a) Wprowadzanie grupy tiolowej

W celu uzyskania oligonukleotydów posiadających na końcu 3' resztę tiolową zaproponowano²³ użycie podłoża typu **1**. Opisano syntezę podłoża zawierających tymidynę, z zaznaczeniem, że możliwe jest rozszerzenie procedury na pozostałe standardowe nukleozydy. Wydaje się jednak, że zaadoptowanie tej metody do otrzymania podłoża zawierających inne

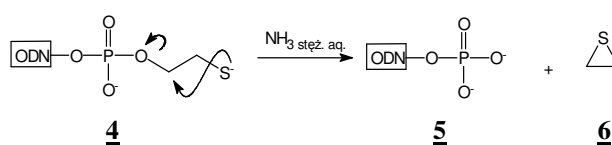
nukleozydy jest utrudnione, gdyż jednym ze związków pośrednich w powyższym podejściu jest 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2,3'-anhydrotymidyna. Synteza 3'-propanoditioalkanolo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyny, kluczowego związku przy otrzymywaniu podłoża typu **1a**, jest długotrwała i wieloetapowa, a końcowa wydajność była rzędu 35%. Synteza 3-{3-[5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-P-(2-chlorofenylo)-tymidynylo]-propyloditio}propanolu, koniecznego do otrzymania podłoża typu **1b**, jest prostsza i szybsza – reakcja przebiega w dwóch jednogodzinnych etapach z wydajnością 64% (n, m = 3). Tak przygotowane podłoża wykorzystano następnie do syntezy oligonukleotydów. Po standardowym odblokowaniu oligomeru (stęż. NH_3 aq.) i redukcji wiązania disiarczkowego za pomocą ditiotretolu (DTT, 40 mM roztwór wodny, 37°, 18 h) otrzymywano oligomery typu **2**, niosące funkcyjną resztę -SH.



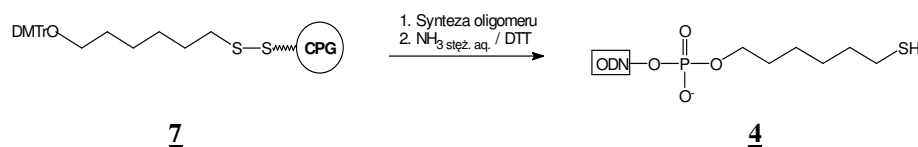
W przedstawionym powyżej podejściu pierwsza jednostka nukleozydowa jest już związana z podłożem. Implikuje to konieczność posiadania zestawu czterech tego typu podłoża (A, C, G, T), aby możliwa była synteza oligomerów niezależnie od rodzaju nukleotydu na ich 3'-końcu. Dla uniknięcia tej niedogodności zaproponowano bardziej uniwersalne podłoże typu **3**²⁴. Nie zawiera ono reszty nukleozydowej, może więc być użyte do syntezy modyfikowanych oligonukleotydów o dowolnej sekwencji. Po syntezie, do odblokowania oligomerów i jednoczesnej redukcji wiązań disiarczkowych stosowano roztwór DTT w wodnym amoniaku.



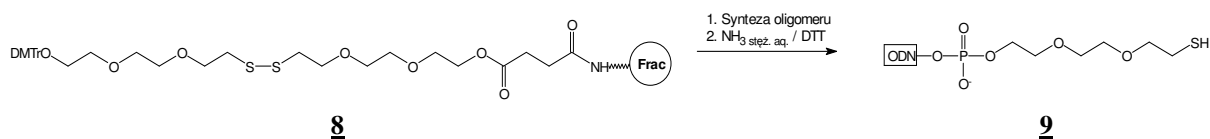
W przypadku gdy n = 2, w rezultacie wewnątrzcząsteczkowej eliminacji siarczku etyle-
nu, nie otrzymywano 3'-tiolo-oligonukleotydu, lecz oligonukleotyd 3'-fosforylowany typu **5**:



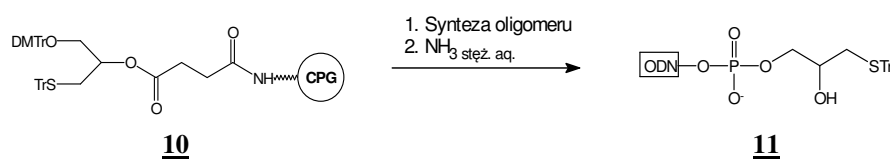
W innym podejściu²⁵ prowadzącym do oligomeru typu **4** ($n=6$), wychodzi się ze specjalnie przygotowanego podłoża stałego²⁶, zawierającego wolne grupy tiolowe zamiast aminowych. Podłoże to aktywowano 2,2'-ditio-bis(5-nitropyrydyną) i poddawano reakcji z 4,4'-dimetoksytrytyloksy-6-merkaptohexanem²⁴ uzyskując podłoże **7**. Oligomery typu **4** otrzymywano na tym podłożu wg typowej procedury syntezy i odblokowania:



W kolejnym podejściu zaproponowano^{27,28} wykorzystanie podłoża **8**, z łącznikiem otrzymanym w oparciu o [2-(2-chloroetoksy)etoksy]etanol. Łańcuch łącznika zawierający mostki tlenowe jest podatny na hydratację, w środowisku wodnym nie powinien więc mieć tendencji do tworzenia skłębionej struktury, spodziewanej w takich warunkach dla łańcucha węglowodorowego. Można więc oczekiwać, że przy zastosowaniu takiego łącznika grupa reporterowa nie powinna być uwikłana w oddziaływania trzeciorzędowe z oligonukleotydem, będąc jednocześnie dobrze eksponowana dla np. przeciwciał. Modyfikowane oligonukleotydy typu **9** otrzymywano w sposób analogiczny do opisanego powyżej dla podłoża typu **3**.



Zastosowanie podłoża typu **10** w syntezie oligonukleotydów pozwala na otrzymywanie, po odblokowaniu stężonym $\text{NH}_3 \text{ aq.}$, oligomerów typu **11**, z resztą tiolową chronioną grupą trytylową²⁹:



Obecność lipofilowej grupy trytylowej w cząsteczce ułatwia oczyszczenie otrzymanego oligonukleotydu za pomocą RP-HPLC*. Usunięcie grupy trytylowej następuje w wyniku działania AgNO_3/DTT . Na końcu 3' oligomeru typu **11** oprócz reszty tiolowej obecna jest reszta hydroksylowa. W obecnie stosowanych podejściach nie znajduje ona zastosowania,

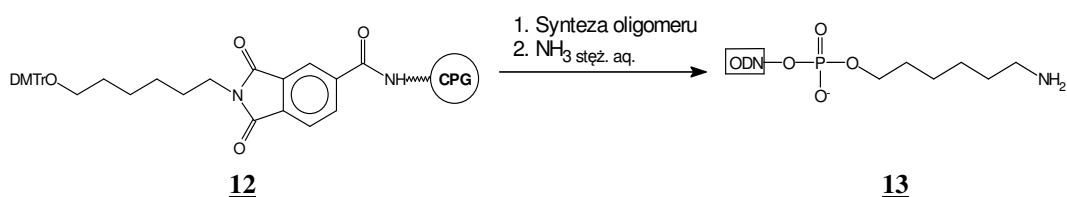
* Oligonukleotyd zawierający grupę lipofilową silnie wiąże się na kolumnie z silanizowanym żelom krzemionkowym. Umożliwia to łatwe odmycie słabiej związanych polarnych zanieczyszczeń. Właściwy oligomer odzyskuje się z kolumny stosując eluent o niskiej polarności.

może być jednak wykorzystana jako potencjalne miejsce przyłączenia dodatkowego ugrupowania czynnego spektralnie, enzymatycznie lub immunologicznie.

Należy zauważyć, że praca z oligonukleotydami niosącymi wolną resztę tiolową wymaga szczególnej uwagi. Bardzo łatwo następuje bowiem utlenienie tej grupy tlenem z powietrza z wytworzeniem mostka disiarczkowego, co uniemożliwia przyłączenie grupy reporterowej. Konieczna jest zatem praca w warunkach beztlenowych lub prowadzenie reakcji wobec nadmiaru substancji redukującej (np. DTT), co wiąże się z kolei z koniecznością dodatkowego oczyszczania gotowej sondy oligonukleotydowej. Natomiast stosowanie jonów srebra lub rtęci do usuwania ochronnej grupy trytylowej wiąże się z niebezpieczeństwem zanieczyszczenia nimi sondy, co może być przyczyną degradacji badanych kwasów nukleinowych.

b) Wprowadzanie grupy aminowej

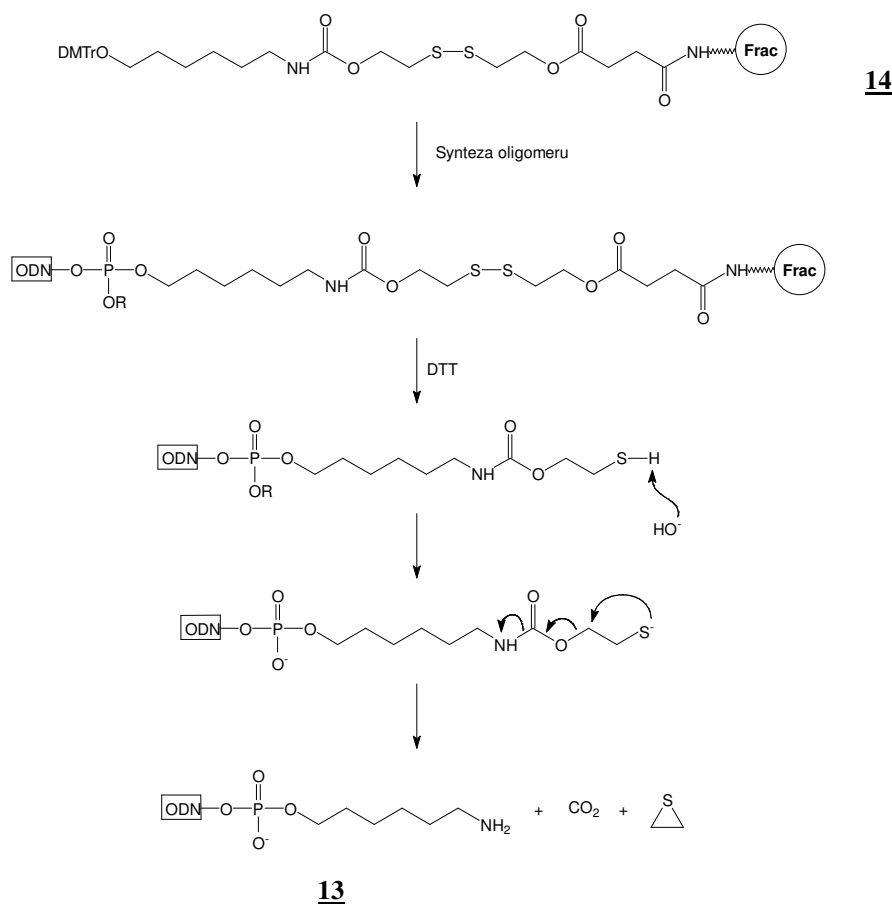
Do wprowadzania grupy aminowej na 3'-koniec oligonukleotydu zaproponowano³⁰ podłoże typu **12**. Podczas odblokowania amoniakiem oligomeru zsyntetyzowanego na tym podłożu, ugrupowanie ftalimidowe ulega amonolizie z uwolnieniem oligonukleotydu typu **13**.



Innym podłożem pozwalającym uzyskiwać modyfikowane oligomery typu **13** jest podłoże **14**²⁷ (Schemat 1). Jego główne elementy strukturalne to dimetoksytrytylowana grupa hydroksylowa, ugrupowanie karbamidoestrowe i mostek disiarczkowy. Po syntezie oligonukleotydu na tym podłożu, końcowe odblokowanie przeprowadza się wodnym roztworem NH_3 stęż./DTT. Uwolnienie reszty aminowej w trakcie odblokowania autorzy tłumaczą reakcjami przedstawionymi na Schemacie 1. Pod wpływem DTT następuje redukcja mostka disiarczkowego, a powstałe ugrupowanie tiolowe w środowisku zasadowym ulega reakcji wewnątrzcząsteczkowej eliminacji, a następnie dekarboksylacji, co prowadzi do oligomeru typu **13** z grupą aminoalkilową na końcu 3'.

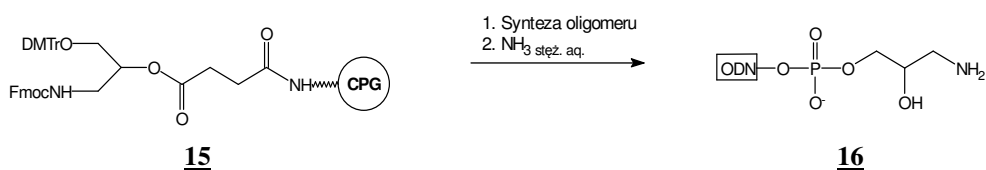
Przyłączenie N-Fmoc-O¹-DMTr-3-amino-1,2-propanodiolu* do standardowego podłoża szklanego LCAA-CPG pozwala na otrzymanie modyfikowanego podłoża typu **15**, w którym reszta hydroksylowa blokowana jest grupą dimetoksytrytylową (DMTr), a aminowa – grupą fluoren-9-ylometoksykarbonylową (Fmoc)³¹. Grupą funkcyjną podczas syntezy oligonukleotydu jest grupa hydroksylowa. Ostatni etap syntezy oligonukleotydu tj. odblokowanie stężonym roztworem amoniaku, powoduje odblokowanie także reszty aminowej, prowadząc

* Związek ten można wykorzystać do wielokrotnej funkcjonalizacji końca 5'. Patrz str. 28.



SCHEMAT 1

do oligomeru typu **16**. Podobnie jak oligonukleotyd typu **11**, posiada on na 3'-końcu dwie grupy funkcyjne: aminową i hydroksylową, potencjalnie użyteczne do przyłączania różnego typu grup reporterowych.

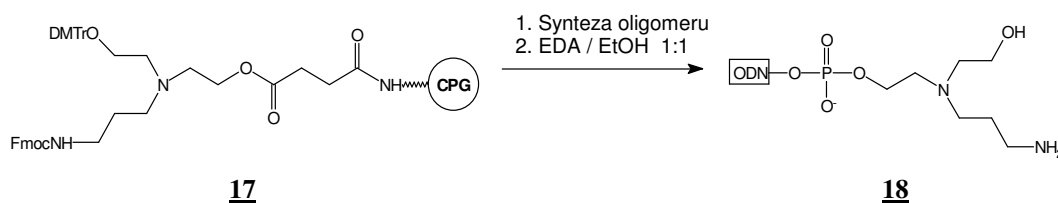


Innym przykładem podłoża prowadzącego do oligomeru z dwiema grupami funkcyjnymi (hydroksylową i aminową), jest podłoże **17**³². Podobnie jak w przypadku podłoża typu **15**, grupą funkcyjną podczas syntezy oligomeru jest grupa hydroksylowa. Końcowe odblokowanie po syntezie oligonukleotydu na podłożu **17** można przeprowadzać w łagodniejszym od roztworu amoniaku środowisku reakcji:

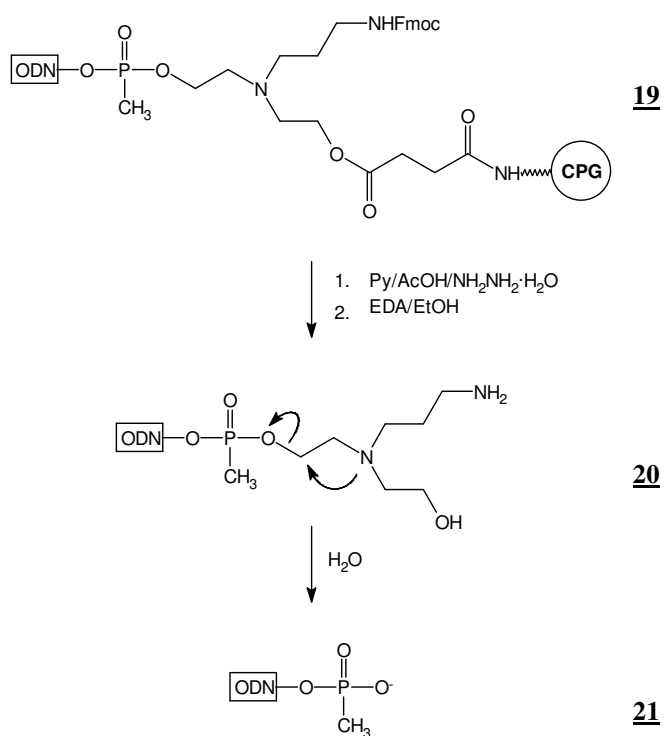
- 1° Py/AcOH/NH₂NH₂·H₂O – 24h, temp. pok.*
- 2° 50% etylenodiamina (EDA) w EtOH – 6h, temp. pok.

* Roztwór ten odblokowuje funkcje egzoaminowe A i C; zapobiega to transaminacji C na następnym etapie odblokowania.

Takie warunki odblokowania pozwalają na syntezę 3'-sfunkcjonalizowanych metylofosfonianów oligonukleotydów (odpornych na działanie nukleaz analogów oligonukleotydów), gdyż diestry metylofosfonianowe są nietrwałe w wodnym stężonym roztworze amoniaku. Warunkiem koniecznym powodzenia takiej syntezy jest zastosowanie reszty fosfordiestrowej na 3'-końcu oligomeru.



W przypadku wprowadzenia metylofosfonianu jako pierwszej jednostki nukleotydujowej na koniec 3' (oligomer typu **19**, Schemat 2) grupa N-(2-hydroksyetylo)-N-(3-aminopropyl)-2-aminoetylowa ulega eliminacji. Tłumaczone jest to atakiem trzeciorzędowego atomu azotu łącznika na atom węgla związany z grupą metylofosfonianową (oligomer typu **20**), z wytworzeniem pochodnej azyrydynowej i eliminacją metylofosfonianu (**21**). Natomiast wprowadzenie w tej tylko, 3'-końcowej pozycji, standardowej reszty fosforanowej, pozwalało na otrzymanie oligonukleotydu typu **18**, trwałego w warunkach odblokowania.

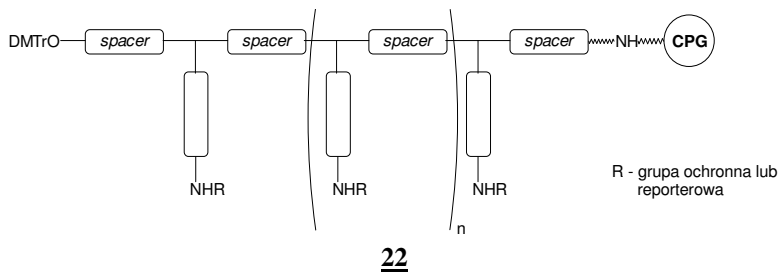


SCHEMAT 2

W kolejnym podejściu proponowano wprowadzenie na koniec 3' oligonukleotydu wielu grup reporterowych³³⁻³⁵, zakładając, że tego typu modyfikacja pozwoli na uzyskanie znacznego wzrostu czułości sondy. W tym celu zsyntetyzowano podłoża typu **22**, wykorzystując strategię stosowaną przy otrzymywaniu oligopeptydów. W łańcuchu peptydowym podłoża występowały reszty lizyny (ich łańcuchy boczne z pierwszorzędowymi resztami aminowymi to potencjalne miejsca przyłączenia grup reporterowych) poprzedzielane cząsteczkami alaniny i/lub kwasu 6-aminoheksanowego (jako cząsteczkami oddalającymi od siebie aktywne reszty lizynowe – „spacer”). Na tak zmodyfikowanym podłożu przeprowadzono następnie standardową syntezę oligonukleotydu połączonego z oligopeptydem od 3'-końca. Grupy reporterowe można przyłączać do podłoża w różnych

fazach otrzymywania sondy:

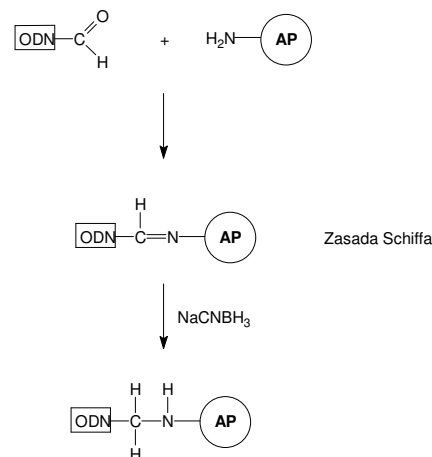
(i) w trakcie syntezy oligopeptydu w postaci zmodyfikowanych syntonów lizynowych³³, (ii) po zakończeniu syntezy oligopeptydu, a przed rozpoczęciem syntezy oligonukleotydu³⁴, bądź (iii) po zakończeniu syntezy, przed odcięciem oligomeru od podłoża^{34,35}.



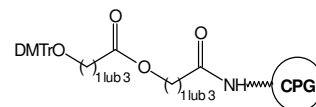
Stwierdzono, że wprowadzenie wielu cząsteczek fluoresceiny spowodowało efekt odwrotny od oczekiwanego: nastąpiło silne wygaszenie fluorescencji, będące prawdopodobnie wynikiem niepromienistego przeniesienia energii pomiędzy sąsiednimi cząsteczkami fluoroforu³⁴. Natomiast wielokrotne znakowanie biotyną powoduje znaczące zwiększenie czułości sondy (pięciokrotne przy dziesięciu cząsteczkach biotyny)^{34,35}.

c) Wprowadzanie grupy aldehydowej

Modyfikowane oligonukleotydy niosące reszty aldehydowe wykorzystywane są do przyłączania oligopeptydów lub białek, np. enzymów takich jak alkaliczna fosfataza lub peroksydaza z chrzanu. Grupa aldehydowa zmodyfikowanego oligomeru reaguje z resztami aminowymi białka (N-koniec łańcucha peptydowego, reszty aminowe lizyny i argininy) tworząc iminę (typu zasady Schiffa). Redukcja (cyjanoborowodorek sodu) ugrupowania iminowego prowadzi do oligonukleotydu związanego z białkiem trwałym wiązaniem alkiloaminowym (Schemat 3).



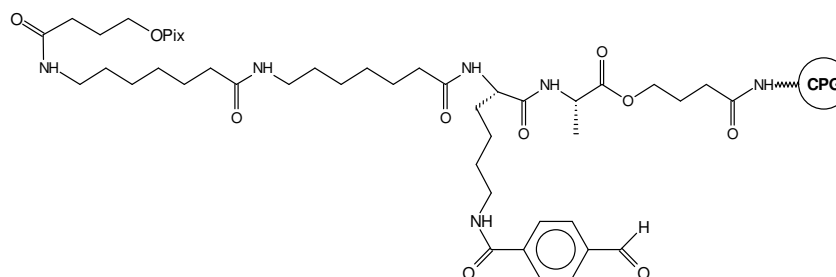
Przykładem podłoża wprowadzającego resztę aldehydową do oligomeru jest podłoże **23**³⁶. Szkielet łącznika zbudowany jest z reszt aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi (kwas 6-aminoheksanowy, lizyna i alanina). Chroniona kwasowolabilną grupą piksyłową reszta hydroksylowa (służąca do syntezy oligomeru) przyłączona jest do ostatniej reszty aminowej łącznika w cząsteczce kwasu 4-hydroksybutanowego. Boczny łańcuch lizyny służy do przyłączenia reszty kwasu *p*-aldehydobenzoesowego niosącego wolną grupę aldehydową, nieaktywną podczas syntezy łańcucha oligonukleotydowego.



Po syntezie oligonukleotydu i odblokowaniu (0,1 M NaOH)³⁷ uzyskano oligomer z wolną grupą aldehydową, wykorzystaną do przyłączenia alkalicznej fosfatazy.

B. Łączniki wprowadzające różne grupy funkcyjne

Na szczególną uwagę zasługują podejścia, w których wychodząc z jednego



24

uniwersalnego podłoża możliwe jest uzyskanie oligomerów niosących różne grupy funkcyjne. Przykładem realizacji takiej koncepcji jest podłoże typu **24**³⁸⁻⁴⁰.

Po syntezie oligonukleotydu na takim podłożu, stosując różne sposoby odblokowania

TABELA 2

Warunki odblokowania	Produkt
1. NH_3 stęż./ H_2O	<p>25</p>
1. $\text{N}_2\text{H}_4/\text{AcOH}/\text{Py}^*$ 2. $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_{2-4}\text{NH}_2$	<p>26</p>
1. $\text{N}_2\text{H}_4/\text{AcOH}/\text{Py}^*$ 2. $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{SS}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ 3. $\text{DTT}/\text{H}_2\text{O}$	<p>27</p>
1. OH^- 2. NH_3 stęż./ H_2O	<p>28</p>

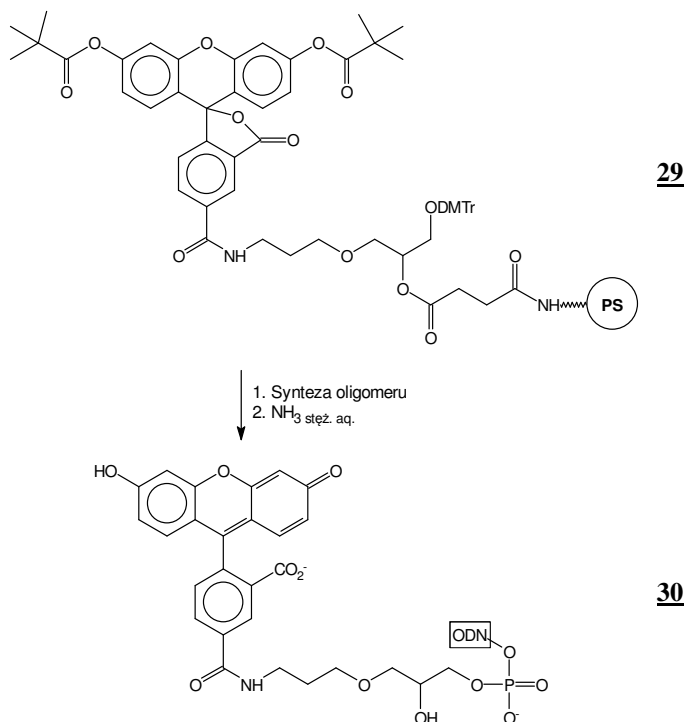
* Przypis na str. 15

uzyskano oligomery niosące różne grupy funkcyjne na końcu 3' (Tabela 2). Zastosowanie typowej procedury odblokowującej (roztwór amoniaku) powoduje amonolizę wiązania estrowego, prowadząc do powstania reszty amidowej (związek typu **25**). Jeżeli w miejsce amoniaku stosuje się alkilodiaminę, wówczas wg tego samego mechanizmu otrzymuje się oligomer typu **26**, z grupą aminoalkilową na końcu 3'. Wg powyższego schematu, zastosowanie alkilodiamin z wewnętrznymi mostkami disiarczkowymi w pierwszym etapie odblokowania prowadzi do produktów aminolizy. Dodanie do mieszaniny reakcyjnej ditiotretolu (DTT) redukuje wiązania disiarczkowe, dając w efekcie oligomery typu **27** niosące na końcu 3' wolne grupy tiolowe. Prowadzenie pierwszego etapu odblokowania w warunkach hydrolytycznych powoduje uwolnienie do roztworu oligomerów typu **28** z resztą karboksylową na 3'-końcu.

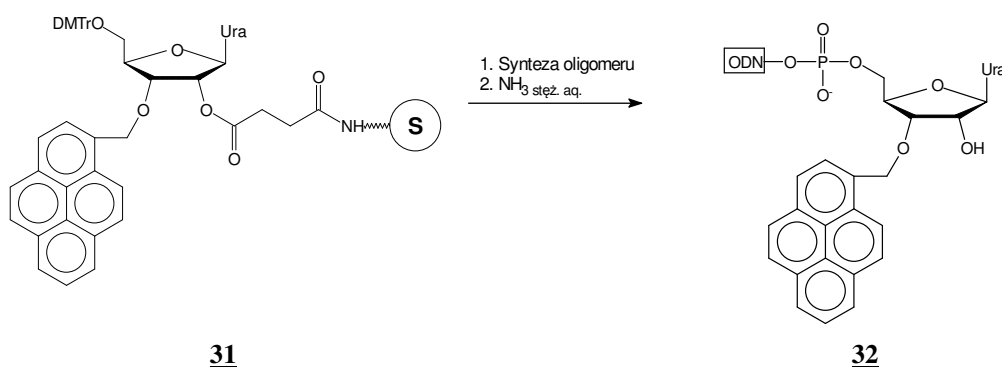
C. Łączniki wprowadzające grupę reporterową

Chcąc uniknąć nie zawsze dostatecznie wydajnego etapu przyłączania grupy reporterowej w roztworze zaproponowano podłoża z już przyłączonym znacznikiem i jednocześnie umożliwiające syntezę oligonukleotydu.

Przykładem takiego podejścia jest podłoże typu **29**⁴¹, do którego przez bifunkcyjny łącznik dowiązано fluoresceinę chronioną grupami piwaloilowymi, zsynchronizowanymi w trakcie syntezy i odblokowania z innymi grupami ochronnymi oligonukleotydu. Po syntezie łańcucha oligomeru wg standardowych procedur, a następnie odblokowaniu (NH_3 aq. stęż.) uzyskano produkt końcowy **30** – oligonukleotyd z przyłączoną na 3'-końcu fluoresceiną.



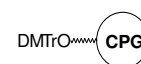
W podłożu typu **31** jako łącznik wykorzystano trójfunkcyjną resztę cukrową urydyny⁴². Funkcja 2'-hydroksylowa posłużyła do połączenia reszty rybozy z podłożem, znacznik fluorescencyjny – piren przyłączono w pozycji 3', a funkcję 5'-hydroksylową (zablokowaną grupą dimetoksytrytylową) wykorzystano do syntezy łańcucha oligonukleotydowego. Po odblokowaniu (NH_3 aq. stęż.) uzyskuje się oligomery typu **32**, w których ostatnim nukleozydem z końca 3' jest 3'-O-(1-pirenylometylo)urydyna.



D. Łączniki dające trwałe przyłączenie oligomeru do podłoża

W większości stosowanych procedur wykrywania poszukiwanych sekwencji, mieszanina DNA (lub RNA) jest immobilizowana na membranach (nitroceluloza, modyfikowane nylony) i następnie poddawana analizie sondą molekularną, aplikowaną w roztworze. Stosuje się także inne podejścia, w których sonda oligonukleotydowa jest trwale przyłączona do podłoża stałego i następnie traktowana mieszaniną kwasów nukleinowych. Utworzony hybryd, DNA (RNA) – sonda molekularna, jest także (poprzez sondę) związany z podłożem i w tej formie jest wykrywany. To podejście jest szczególnie wygodne wtedy, gdy analizowany DNA (RNA) jest znakowany radioizotopem. W przypadku obecności poszukiwanej sekwencji w analizowanym materiale, powstały dupleks jest także radioaktywny, co można stwierdzić za pomocą prostych detektorów promieniowania.

Innym wariantem tego typu podejścia może być zastosowanie tak zmodyfikowanego podłoża stałego, aby po syntezie DNA i jego odblokowaniu (NH_3 aq. stęż.), oligomer pozostał trwale związany z podłożem. Pozwala to na ominięcie dwóch etapów procedury: odcięcia oligonukleotydu od podłoża i jego ponownego immobilizowania. Zaproponowano więc podłoża stałe typu **33**, w których zastosowano łączniki posiadające na końcu łańcucha resztę hydroksylową^{43,44}. Podczas syntezy oligonukleotydy połączone były z podłożem wiązaniem triestrowym z grupą 2-cyanoetylową, analogicznym do wiązania internukleotydowego. W praktyce, w warunkach odblokowania (30–35% NH_3 aq. / 55° / 10h) znaczna część oligomeru (40 – 90%) ulega jednak odcięciu od podłoża, co znacznie ogranicza stosowalność metody.



33

E. Podsumowanie

Z przedstawionych metod funkcjonalizacji końca 3' oligomerów za najciekawsze uważam podejście umożliwiające uzyskiwanie różnych grup funkcyjnych w zależności od warunków odblokowania (Tabela 2). Jest to metoda w miarę uniwersalna, pozwalająca na uzyskiwanie różnych grup funkcyjnych, co stwarza potencjalne możliwości dalszych różnego typu modyfikacji. Na uwagę zasługują również podejścia, w których synteza sond oligonukleotydowych odbywa się na podłożach z wcześniej dowiązanymi grupami reporterowymi (Podrozdział C). Po syntezie, podczas odblokowania, oligomer jest uwalniany z podłoża wraz z przyłączoną na jego końcu 3' grupą reporterową. W tym podejściu grupa reporterowa musi być trwała w trakcie syntezy i odblokowania oligomeru, co znacznie ogranicza liczbę możliwości do wykorzystania znaczników.

Niewątpliwym mankamentem wszystkich opisywanych metod jest fakt, że reakcje modyfikacji podłoża zachodzą w układzie heterogennym, co w większości przypadków uniemożliwia bezpośrednią analitykę produktów poszczególnych etapów modyfikacji. Mając na uwadze powyższe oraz bardzo dużą pracochłonność procedur, szersze zastosowanie opisanych metod na tym etapie ich rozwoju wydaje się być wątpliwe.

3. MODYFIKACJE 5'-KOŃCA OLIGONUKLEOTYDU

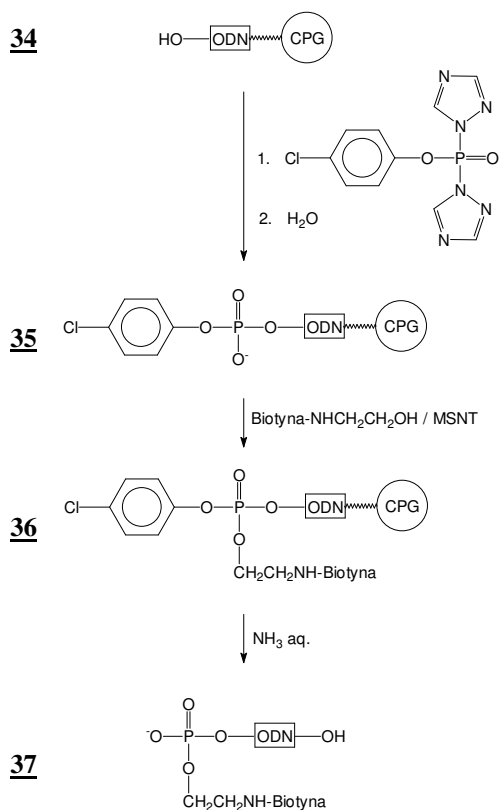
Modyfikacje 5'-końca przeprowadza się po zakończeniu syntezy łańcucha oligonukleotydowego. Podejście to ma szereg zalet i otwiera wiele dodatkowych możliwości syntetycznych, do których należą:

- stosowanie standardowych podłoży stałych, bez konieczności ich dodatkowego przygotowywania;
- możliwość wprowadzania grup reporterowych bez konieczności ich chronienia na wszystkich etapach syntezy oligomeru;
- możliwość różnorodnych modyfikacji na tych samych próbkach oligomeru, co jest szczególnie istotne przy weryfikacji efektywności metod otrzymywania sond;
- funkcjonalizację i przyłączenie grupy reporterowej dokonuje się na oligomerach związanych z podłożem, co zdecydowanie ułatwia izolację finalnego produktu.

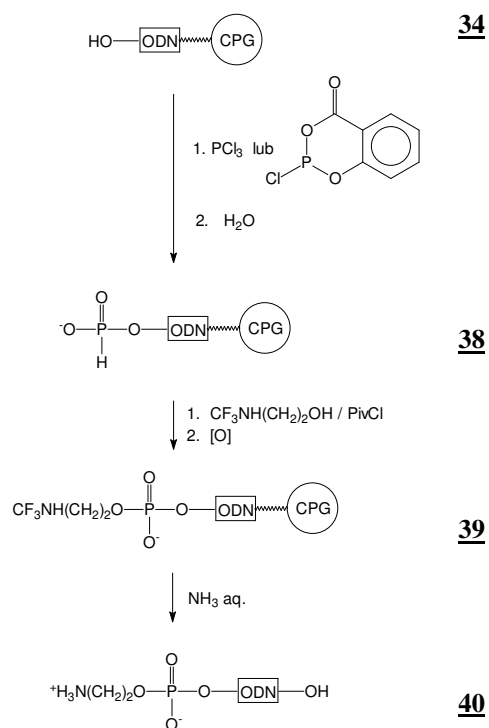
Syntezę oligonukleotydowych sond molekularnych niosących nieradioizotopowe grupy reporterowe na końcu 5' można realizować etapami (funkcjonalizacja i przyłączenie grupy reporterowej) lub też przez przyłączenie na ostatnim etapie syntezy oligomeru modyfikowanego syntonu nukleotydowego lub nienukleotydowego.

A. Etapowa modyfikacja oligonukleotydu

Podejście to polega na modyfikowaniu oligonukleotydu na podłożu stałym poprzez przyłączanie kolejnych fragmentów sondy, prowadząc ostatecznie do uzyskania oligomeru z grupą funkcyjną lub reporterową na końcu 5'.



SCHEMAT 4

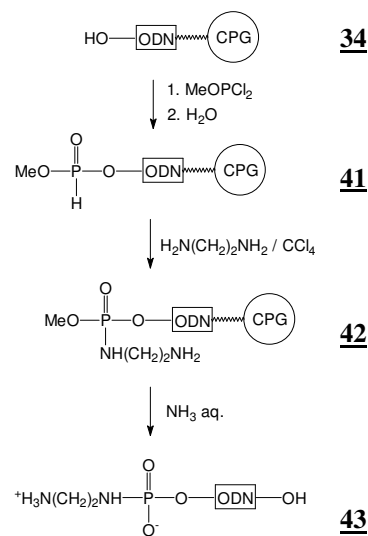


SCHEMAT 5

W jednej z pierwszych opisanych metod do funkcjonalizacji oligonukleotydu wybrano grupę fosforanową⁴⁵. Przyłączony do podłoża oligomer **34** traktowano *p*-chlorofenylofosforditriazolem, otrzymując po hydrolizie produkt **35** z grupą *p*-chlorofenylofosforanową. Następnie w typowej reakcji kondensacji z 2-(biotynyloamido)etanołem wobec 1-(2-metyleno-sulfonylo)-3-nitro-1,2,4-triazolu otrzymano sondę **36** z przyłączoną biotyną, którą odblokowano i izolowano wg wcześniej opisanych metod (Schemat 4).

Wybór reszty fosforanowej jako łącznika wydaje się być szczególnie trafny, gdyż stanowi ona naturalne „wydłużenie” oligomeru i reszta ta nie powinna powodować zaburzeń procesu hybrydyzacji.

Wg podobnej koncepcji do fosforylacji oligomeru wykorzystano aktywne pochodne fosforu trójwartościowego: PCl_3 lub salicylochlorofosfinę (Schemat 5)⁴⁶. W obu przypadkach po pierwszym etapie, tj. po przyłączeniu fosforynu do oligomeru, aktywne centrum fosforowe poddawano hydrolizie do H-fosfonianu, który w kolejnej reakcji z *N*-1-trifluoroacetyloetanolaminą wobec chlorku piwaloilu ulegał estryfikacji. Po utlenieniu i odblokowaniu otrzymywano oligonukleotyd z grupą aminoalki-



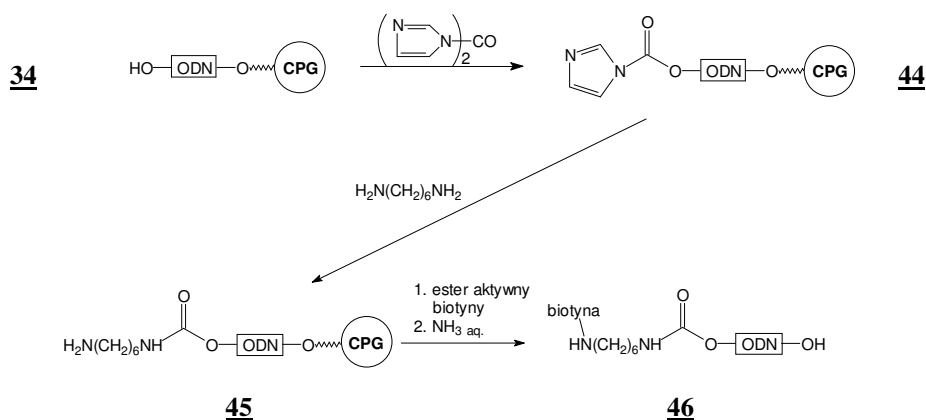
SCHEMAT 6

lową przyłączoną poprzez resztę fosforanową na końcu 5'.

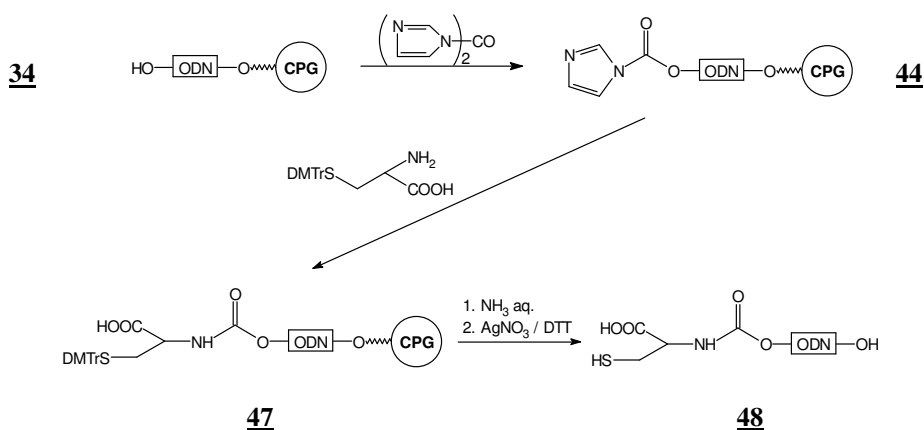
Analogiczny produkt otrzymano w podobnym cyklu reakcji (Schemat 6), jednakże łącznik aminoalkilowy wprowadzano na etapie oksydatywnej kondensacji 5'-(metoksy-H-fosfonianu) oligomeru z diaminoetanem⁴⁶.

W ostatnich trzech przypadkach zastrzeżenia mogą budzić wielofunkcyjne, bardzo reaktywne czynniki fosfitylujące, które mogą modyfikować zasady azotowe, a także prowadzić do powstawania produktów dimeryzacji.

Odmiernym typem reagentów generujących aktywny układ na końcu 5' są karbodiazydy⁴⁷⁻⁴⁹. Aktywacja oligonukleotydu **34** karbonylodimidazolem prowadzi do pochodnej typu **44**, nieaktywnej wobec alkoholi, natomiast łatwo reagującej z aminami⁵⁰. W wyniku reakcji z 1,6-diaminoheksanem uzyskano karbaminian typu **45**. Po przyłączeniu biotyny i odblokowaniu roztworem amoniaku (reszta karbaminianowa jest trwała w tych warunkach⁴⁹) otrzymano gotową sondę oligonukleotydową (Schemat 7).



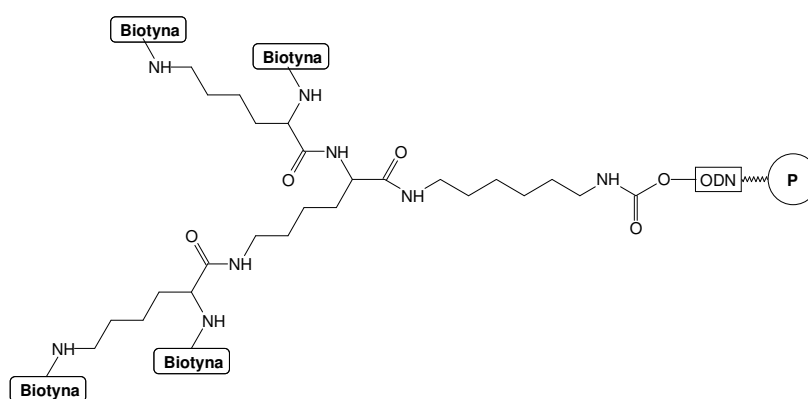
Podobnie przebiegły reakcje prowadzące do 5'-SH oligomeru⁴⁷ (Schemat 8). W tym przypadku pochodną karbonyloimidazolową typu **44** potraktowano S-dimetoksytrytylocyste-



iną. Produktem tej reakcji był oligomer **47** z dowiązaną na końcu 5' cysteiną (poprzez ugrupowanie karbaminianowe). Resztę tiolową cysteiny wykorzystano po odblokowaniu do dowiązania grupy pirenolowej. Oprócz grupy -SH oligomer **48** niesie na końcu 5' również

grupę karboksylową, potencjalne miejsce selektywnego przyłączenia innego typu grupy reporterowej.

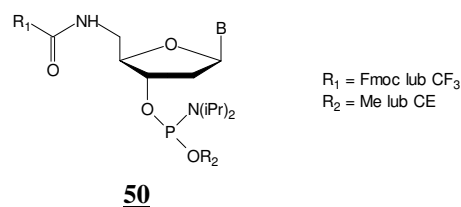
Również podobny system funkcjonalizacji zastosowano do otrzymania sondy oligonukleotydowej znakowanej wieloma grupami reporterowymi⁴⁸. Na pierwszym etapie sprzęgano 1,6-diaminoheksan z oligomerem wobec karbonyldiimidazolu. Stosując następnie dwukrotną kondensację z N^α-N^ε-di-Fmoc-lizyną wobec BOP przyłączono do grupy -NH₂ cztery reszty lizyny. Ochronne grupy Fmoc usuwane były selektywnie działaniem DBU, a do uwolnionych w ostatnim etapie grup aminowych przyłączane były cząsteczki biotyny, prowadząc do związku typu **49**. Po odcięciu od podłoża i odblokowaniu w standardowych warunkach izolowano tetrabiotynyłowaną sondę oligonukleotydową techniką HPLC lub PAGE.

**49**

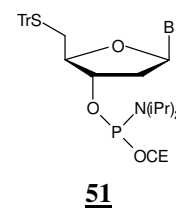
B. Modyfikowane syntony nukleotydowe

W podejściu tym otrzymane na podłożu stałym oligomery poddaje się dodatkowej kondensacji z syntonami, w których w miejsce standardowych nukleozydów wprowadzono nukleozydy ze zmodyfikowaną pozycją 5'. Ponieważ związki te przyłączają się w ostatnim etapie syntezy, uzyskiwane oligonukleotydy niosą modyfikację na końcu 5'. Struktura omawianych syntonów, bardzo zbliżonych do typowych syntonów nukleozydowych, pozwala na wykorzystanie do ich przyłączania standardowych procedur wydłużania łańcucha oligonukleotydowego.

Dla realizacji takiego podejścia zaproponowano użycie związków typu **50** jako końcowej modyfikowanej jednostki nukleotydowej^{51,52}. Labilne w warunkach zasadowych grupy chroniące resztę aminową usuwane były w trakcie końcowego odblokowania roztworem amoniaku. Po syntezie oligomeru, kondensacji z amidofosforem typu **50** i odblokowaniu, reszta aminowa w pozycji 5' uwolnionego oligomeru wykorzystana była do wprowadzania fluorescencyjnych grup reporterowych.

**50**

W celu uzyskania oligonukleotydów z grupą -SH na końcu 5' zaproponowano analogiczne do opisanych powyżej syntony typu **51**⁵³. Lipofilowa grupa trytylowa na końcu 5' oligonukleotydów otrzymanych z wykorzystaniem z tego typu syntonów umożliwiała łatwe oczyszczanie produktu za pomocą RP-HPLC*. Grupę trytylową usuwano jonami srebra lub rtęci.



Przedstawione powyżej metody wydają się mało atrakcyjne z dwóch powodów: (i) konieczność syntezy modyfikowanych nukleozydów i ich amidofosforinów; (ii) bezpośrednie przyłączenie grupy funkcyjnej do węgla 5' reszty cukrowej może powodować powstawanie znacznej zawady przestrzennej po przyłączeniu grupy reporterowej, co może mieć negatywny wpływ na proces hybrydizacji i detekcji.

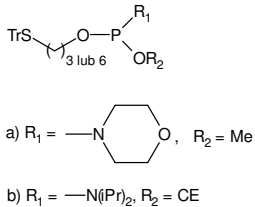

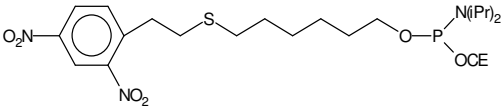
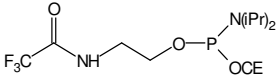
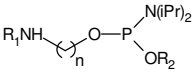
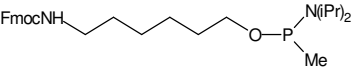
C. Syntony nienukleotydowe

Syntony nienukleotydowe są to analogi syntonów nukleotydowych, w których w miejsce szkieletu nukleozydowego zastosowany jest najczęściej szkielet węglowy z jedną lub wieloma odpowiednio chronionymi grupami funkcyjnymi. System protekcji tych grup jest tak dobrany, by był on kompatybilny z powszechnie stosowanymi, rutynowymi metodami syntezy oligonukleotydów. Tak przygotowany synton nienukleotydowy może być przyłączany do oligomeru w standardowym cyklu syntetycznym, co nie wymaga zmiany reagentów lub też zmiany oprogramowania syntetyzera. Syntony nienukleotydowe można podzielić zasadniczo na dwa typy. Typ pierwszy to syntony funkcjonalizujące oligomer (Tabela 3), do którego w dodatkowym cyklu syntetycznym przyłączana jest grupa reporterowa. Drugi typ syntonu zawiera już związaną grupę reporterową (Tabela 4) i jego kondensacja z oligomerem prowadzi w jednym etapie do gotowego produktu – sondy oligonukleotydowej z przyłączoną grupą reporterową.

Ze względu na znaczą liczbę opisanych metod syntezy i zastosowań syntonów nienukleotydowych zestawiono je w tabelach i opatrzono komentarzem podkreślającym istotne właściwości chemiczne i ich konsekwencje.

* Przypis na str. 13.

TABELA 3. Amidofosforyny wprowadzające grupy funkcyjne

Nr	Związek	Komentarz	Lit.
<u>52</u>	 <p>a) $R_1 =$ , $R_2 = \text{Me}$</p> <p>b) $R_1 = \text{---N(iPr)}_2$, $R_2 = \text{CE}$</p>	<ol style="list-style-type: none"> Synton wprowadza resztę tiolową chronioną grupą trytylową. Otrzymano analogiczne H-fosfoniany⁵⁴. Grupa trytylowa pozwala na łatwe oczyszczenie oligomeru za pomocą RP-HPLC*. Odblokowanie reszty tiolowej roztworem azotanu srebra w dodatkowej reakcji. 	54, 55
<u>53</u>		<ol style="list-style-type: none"> Synton wprowadza resztę tiolową chronioną grupą 2,4-dinitrofenyloetylową, labilną w warunkach zasadowych. Odblokowanie reszty tiolowej: NH_3 aq. stęż./0,1 M DTT 	56
<u>54</u>		<ol style="list-style-type: none"> Synton wprowadza resztę aminową chronioną grupą trifluoroacetylową, labilną w warunkach zasadowych. Odblokowanie reszty aminowej następuje w trakcie końcowego działania roztworem amoniaku. 	57
<u>55</u>	 <p>$n = 3 - 6$ $R_1 = \text{MMTr, DMTr, Pix}$ $R_2 = \text{Me, CE}$</p>	<ol style="list-style-type: none"> Syntony wprowadzają resztę aminową chronioną pochodnymi grupy trytylowej, labilnymi w warunkach kwaśnych. Analogicznie otrzymano H-fosfoniany⁵⁴. Lipofilowe pochodne grupy trytylowej pozwalały na łatwe oczyszczenie oligomeru na RP-HPLC* i były usuwane następnie 80% kwasem octowym⁵⁸ lub służyły do kolorymetrycznego śledzenia wydajności funkcjonalizacji oligomeru⁵⁹. Odblokowanie reszty aminowej przed odcięciem od podłoża pozwala na przyłączenie grupy reporterowej do oligomeru na podłożu stałym. 	54, 58, 59
<u>56</u>		<ol style="list-style-type: none"> Synton wprowadza resztę aminową chronioną grupą Fmoc, labilną w warunkach zasadowych. Wykorzystanie: do funkcjonalizacji metylofosfonianów oligonukleotydów. Odblokowanie w temp. pok.: a) NH_3 aq. stęż./2 h, b) EDA – EtOH/6h. 	60

* Przypis na str. 13.

TABELA 3. cd.

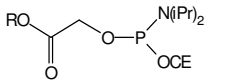
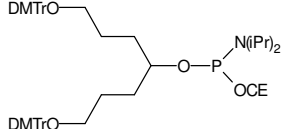
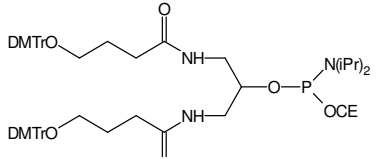
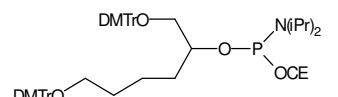
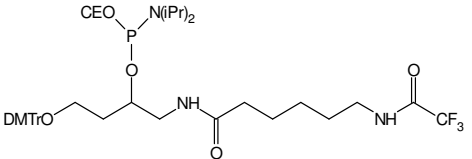
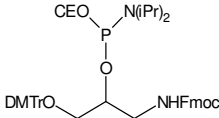
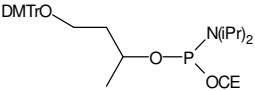
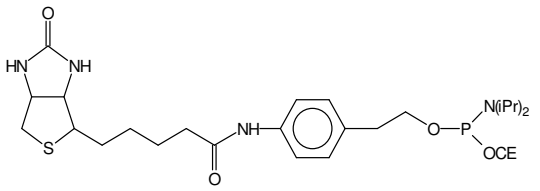
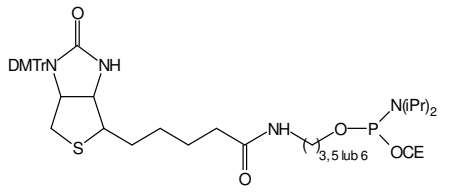
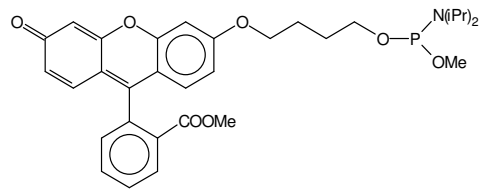
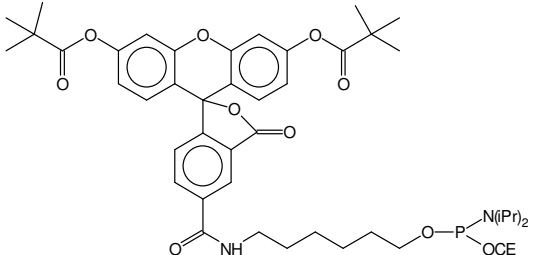
Nr	Związek	Komentarz	Lit.
57	 <p>a) R = CH₂CH₂Cl b) R = CH₂CF₃</p>	1. Synton wprowadza grupę estrową, pozwalającą na uzyskiwanie różnych grup funkcyjnych w zależności od warunków odblokowania. Ostateczna funkcjonalizacja oligomeru z przyłączonym związkiem 57 następuje przed odblokowaniem NH ₃ aq. stęż., podobnie, jak to opisano dla modyfikacji końca 3' (Tabela 2).	61
58		1. Związki typu 58 – 60 służą do uzyskiwania rozgałęzionych oligonukleotydów (typu „drzewo”) umożliwiających wprowadzanie wielu grup reporterowych.	62
59			63
60			19
61		1. Synton wprowadza resztę aminową, chronioną labilną w warunkach zasadowych grupą trifluoroacetylową oraz resztę hydroksylową, chronioną grupą dimetoksytrytylową. Pozwala to na wielokrotne przyłączenie amidofosforynów 61 i uzyskiwanie rozgałęzionych oligonukleotydów (typu „grzebień”), umożliwiających wprowadzanie wielu grup reporterowych. 2. Odblokowanie reszt aminowych następuje w trakcie działania roztworem amoniaku.	19

TABELA 3. cd.

Nr	Związek	Komentarz	Lit.
62		<ol style="list-style-type: none"> 1. Synton wprowadza resztę aminową, chronioną labilną w warunkach zasadowych grupą trifluoroacetylową oraz resztę hydroksylową, chronioną grupą dimetoksytrytylową. Pozwala to na wielokrotne przyłączenie amidofosforynów 62 i uzyskiwanie rozgałęzionych oligonukleotydów (typu „grzebień”), umożliwiających wprowadzanie wielu grup reporterowych. 2. Odblokowanie reszt aminowych następuje w trakcie działania roztworem amoniaku. 3. W reakcji biotynylacji oligomeru zawierającego 5 jednostek typu 62 otrzymano sondę, która była wykrywalna w ilości 0,5 ng. 	64
63		<ol style="list-style-type: none"> 1. Synton wprowadza resztę hydroksylową chronioną grupą dimetoksytrytylową, co pozwala na wielokrotne przyłączenie amidofosforynów 63. Związek ten („<i>spacer</i>”) służy do zwiększania odległości między grupami aktywnymi w oligomerach typu „grzebień”. Ma to na celu oddalenie od siebie grup reporterowych aby ograniczyć ich wzajemne oddziaływanie. 	19

Spośród syntonów funkcjonalizujących chciałbym wyróżnić amidofosforyn typu **55**. Zawiera on względnie prosty szkielet węglowy (co ułatwia jego przygotowanie) i po przyłączeniu do oligomeru umożliwia kolorymetryczny pomiar wydajności funkcjonalizacji. Dodatkowo chemoselektywne usunięcie protekcji grupy funkcyjnej pozwala na przyłączenie grupy reporterowej do oligomeru związanego z podłożem, co znacznie upraszcza procedurę izolacji finalnego produktu syntezy. Alternatywnie, odblokowanie oligomeru z zachowaniem lipofilowej blokady dimetoksytrytylowej stwarza możliwość szczególnie skutecznego oczyszczenia sfunkcjonalizowanego oligonukleotydu za pomocą RP-HPLC.

TABELA 4. Amidofosforyny wprowadzające grupy reporterowe

Nr	Związek	Komentarz	Lit.
64		<ol style="list-style-type: none"> Synton wprowadza resztę biotynyłową. Nierozpuszczalny w CH₃CN. Do modyfikacji oligomerów konieczne jest stosowanie roztworu DMF/CH₂Cl₂. 	65, 66
65		<ol style="list-style-type: none"> Synton wprowadza resztę biotynyłową niosącą w pozycji 1-N grupę dimetoksytrytyłową, zwiększającą rozpuszczalność amidofosforynu 65 w CH₃CN. Ponadto pozwala ona na kolorymetryczne ocenienie wydajności modyfikacji lub na wydajne oczyszczenie produktu za pomocą RP-HPLC lub OPC*. 	67, 68
66		<ol style="list-style-type: none"> Synton wprowadza cząsteczkę fluoresceiny w postaci estru metylowego. W warunkach końcowego odblokowania amoniakiem następuje odtworzenie grupy karboksylowej. Otrzymano również analogiczny H-fosfonian. 	69
67		<ol style="list-style-type: none"> Synton wprowadza cząsteczkę fluoresceiny chronioną grupami piwaloilowymi. Odblokowanie grup funkcyjnych fluoresceiny następuje w trakcie końcowego działania amoniakiem. 	70

* OPC zawiera oparty na polistyrenie polimer wiążący selektywnie reszty dimetoksytrytyłowe. Po odmyciu zanieczyszczeń przeprowadza się odtrytylowanie (2% TFA) i wymywa oczyszczony oligomer.

TABELA 4. cd.

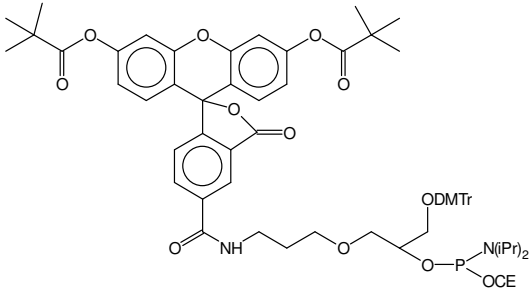
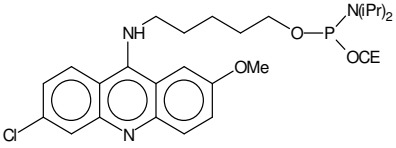
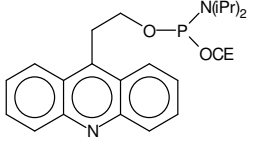
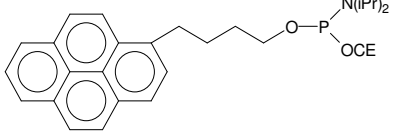
Nr	Związek	Komentarz	Lit.
<u>68</u>		<ol style="list-style-type: none"> 1. Synton wprowadza cząsteczkę fluoresceiny chronioną grupami piwaloilowymi. 2. Grupa dimetoksytrytylowa umożliwia kolorymetryczne monitorowanie wydajności przyłączenia syntonu do oligomeru. 3. Grupa dimetoksytrytylowa w pobliżu centrum fosforowego stanowi zawadę przestrzenną i pomimo wydłużenia czasu kondensacji do 120 sek. wydajność przyłączenia syntonu była umiarkowana (70%). 4. Odblokowanie grup funkcyjnych fluoresceiny następuje w trakcie końcowego działania amoniakiem. 	41
<u>69</u>		<ol style="list-style-type: none"> 1. Synton wprowadza cząsteczkę 2-metoksy-6-chloro-9-aminoakrydyny. 2. Końcowe odblokowanie należy przeprowadzać 0,5M roztworem NaOH w H₂O/EtOH aby uniknąć pęknięcia akrydynowego wiązania C9 – NH. 	28, 71
<u>70</u>		<ol style="list-style-type: none"> 1. Synton wprowadza cząsteczkę akrydyny. 2. Opracowano również procedurę otrzymywania analogicznego H-fosfonianu. 3. Odblokowanie oligomeru znakowanego za pomocą syntonu <u>70</u> można przeprowadzać w standardowych warunkach 	72
<u>71</u>		<ol style="list-style-type: none"> 1. Synton wprowadza cząsteczkę pirenu (fluorofor). 	63, 73

TABELA 4. cd.

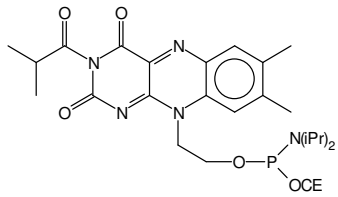
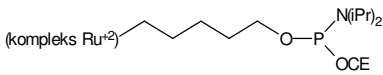
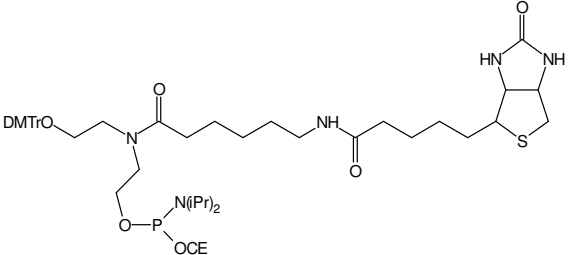
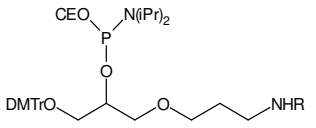
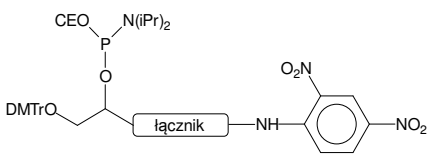
Nr	Związek	Komentarz	Lit.
72		1. Synton wprowadza cząsteczkę ryboflawiny (fluorofor).	74
73		<ol style="list-style-type: none"> 1. Synton wprowadza kompleks rutenu z trzema cząsteczkami batofenantroliny. 2. Kompleks ten jest trwały chemicznie i wykazuje silną fluorescencję o długim czasie trwania. Pozwala to uniknąć krótkotrwałej fluorescencji tła, dzięki czemu uzyskuje się czułość porównywalną z metodami radioizotopowymi (<i>time resolved fluorescence</i>). 3. Amidofosforyn 73 otrzymywano <i>in situ</i> ze względu na trudności w izolacji czystego związku. 	75
74		<ol style="list-style-type: none"> 1. Synton wprowadza biotynę oraz chronioną grupą dimetoksytrytylową resztę hydroksylową, która pozwala na przyłączenie kolejnych amidofosforynów typu 74. Umożliwia to uzyskiwanie oligonukleotydów z przyłączonymi wieloma grupami reporterowymi. 2. Nie opisano praktycznego wykorzystania związku 74 do modyfikacji oligomeru. 	76

TABELA 4. cd.

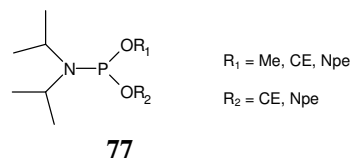
Nr	Związek	Komentarz	Lit.
75	 <p>a) R = biotylna b) R = fosfotyrozyna</p>	<ol style="list-style-type: none"> Synton wprowadza biotylnę lub fosfotyrozynę (hapten) oraz chronioną grupą dimetoksytrytylową resztę hydroksylową, która pozwala na przyłączenie kolejnych amidofosforynów typu 75. Umożliwia to uzyskiwanie oligonukleotydów z przyłączonymi wieloma grupami reporterowymi. Nie należy usuwać ostatniej grupy dimetoksytrytylowej przed odblokowaniem amoniakiem, gdyż wolna grupa hydroksylowa reszty gliceryny atakuje w tych warunkach sąsiednie ugrupowanie fosforanowe powodując utratę grup reporterowych. Oligomer zawierający 8 cząsteczek biotylny był wykrywalny w ilości 0,1 ng, a zawierający 8 cząsteczek fosfotyrozyny w ilości 1 ng. 	77
76	 <p>łącznik: a) = -CH₂- b) = -CH₂CH₂CH₂CH₂- c) = -CH₂OCH₂CH₂CH₂- d) = -CH₂OCH₂CH₂CH₂NHC(O)CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-</p>	<ol style="list-style-type: none"> Synton wprowadza hapten (2,4-dinitrofenyl) oraz chronioną grupą dimetoksytrytylową resztę hydroksylową, która pozwala na przyłączenie kolejnych amidofosforynów typu 76. Umożliwia to uzyskiwanie oligonukleotydów z przyłączonymi wieloma grupami reporterowymi. Nie należy usuwać ostatniej grupy dimetoksytrytylowej przed odblokowaniem amoniakiem, gdyż wolna grupa hydroksylowa reszty gliceryny atakuje w tych warunkach sąsiednie ugrupowanie fosforanowe powodując utratę grup reporterowych. Natomiast modyfikowane oligomery z zachowaną ostatnią grupą dimetoksytrytylową były trwałe w warunkach odblokowania (co jest sprzeczne z wcześniejszymi doniesieniami o nietrwałości grupy DNP w roztworze amoniaku⁷⁸). Najwyższą czułość, 14 pg uzyskano dla oligomeru z trzema cząsteczkami dinitrofenolu. Rodzaj łącznika miał mały wpływ na poziom detekcji oligomeru. 	79

Wykorzystanie syntonów **64** – **76** wydaje się być najprostszą metodą wprowadzania grup reporterowych w pozycji 5' oligonukleotydów. Należy jednak zwrócić uwagę, że często synteza tego typu związków jest procesem wieloetapowym, a produkt końcowy uzyskiwany jest z niską wydajnością. Ograniczone jest też spektrum możliwych do wykorzystania grup reporterowych, gdyż muszą one być odporne na warunki kondensacji, utleniania i odblokowania oligomeru. Ponadto wprowadzenie innego znacznika do oligonukleotydu wiąże się z koniecznością syntezy nowego syntonu. W związku z tymi niedogodnościami uważam, że korzystniejszym podejściem jest funkcjonalizacja oligomeru, a następnie przyłączenie grupy reporterowej.

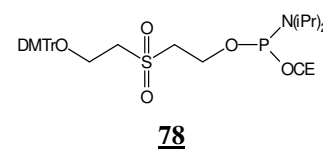
D. Fosforylacja 5'-końca oligonukleotydu

Fosforylacja 5' - końca oligonukleotydu nie jest reakcją modyfikacji, gdyż wprowadzenie reszty fosforanowej w tę pozycję jest wydłużeniem naturalnego szkieletu oligomeru. Jednakże, 5' - końcowa grupa fosforynowa czy fosforanowa może być dogodnym substratem do dalszych modyfikacji. Dlatego też ująłem w tej części mojej pracy reakcje fosforylacji jako istotny fragment potencjalnej metody funkcjonalizacji końca 5' - oligonukleotydów.

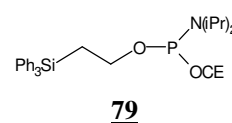
Jednymi z pierwszych reagentów zastosowanych z powodzeniem do fosforylacji oligonukleotydu związanego z podłożem stałym były N,N-diizopropylamidofosforyny dialkylowe typu **77**⁸⁰. Produktem reakcji fosforylacji był 5'-dialkilofosforyn oligonukleotydu, utleniany następnie do fosforanu. Grupy alkilowe usuwano działaniem: tiofenolanu (R=Me), amoniaku (R=CE) lub DBU (R=Npe), uzyskując 5'-fosforylowany oligomer.



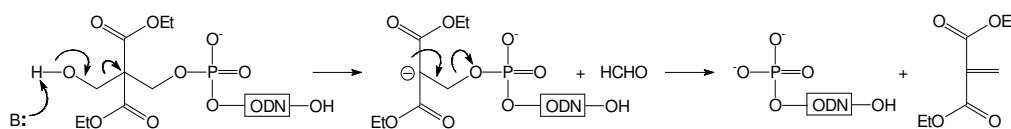
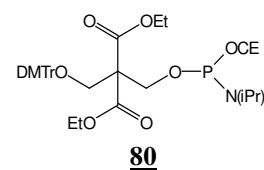
Przykładem innego czynnika fosforylującego, który prowadził do analogicznego 5'-fosforylowanego oligonukleotydu jest N,N-diizopropylamidofosforyn 2-cyanoetylowo – 2-[2'-(4,4'-dimetoksytrytyloksy)etylosulfonylo]etylowy (**78**)⁸¹. Obok „aktywnego” ugrupowania amidofosforynowego i ochronnej grupy 2-cyanoetylowej zastosowano ugrupowanie 2-(2'-hydroksyetylosulfonylo)etylowe. To ostatnie zawierało grupę dimetoksytrytylową, co umożliwiało monitorowanie (test barwny) reakcji fosforylacji. Obydwie grupy fosforanoalkilowe [2-cyanoetylową i 2-(2'-hydroksyetylosulfonylo)etylową] usuwano w reakcji β-eliminacji w środowisku zasadowym.



W innym podejściu, do fosforylacji oligomeru zastosowano N,N-diizopropylamidofosforyn 2-cyanoetylowo – 2-(trifenylsilylo)etylowy (**79**)⁸². Po utlenieniu i odblokowaniu roztworem amoniaku, grupa 2-(trifenylsilylo)etylowa wciąż pozostawała związana z resztą 5'-fosforanową. Dzięki temu możliwe było łatwe oczyszczenie (za pomocą RP-HPLC) pożądanego produktu od zanieczyszczeń nie niosących tego silnie lipofilowego ugrupowania. Grupę 2-(trifenylsilylo)etylową usuwano następnie jonami fluorkowymi, uzyskując 5'-fosforan oligonukleotydu.



Kolejnym amidofosforem stosowanym do fosforylacji oligonukleotydów jest związek **80**⁸³. Otrzymano go z 2,2-bis(hydroksymetylo)malonianu dietylowego poprzez dimetoksytrytylowanie i fosfitylację. Zastosowanie tego amidofosforu umożliwia dwutorowe wykorzystanie właściwości grupy dimetoksytrytylowej: kontrolowanie wydajności reakcji fosforylacji dzięki uwalnianiu barwnego kationu dimetoksytrytylowego (metoda „*trityl off*”) lub wydajne oczyszczanie oligomeru dzięki lipofilowym właściwościom tej grupy (metoda „*trityl on*”). To drugie podejście jest możliwe dzięki nieoczekiwanej trwałości estru 2,2-bis(etoksykarbonylo)-3-(4,4'-dimetoksytrytyloksy)propylowego w stężonym roztworze amoniaku. Natomiast po usunięciu grupy dimetoksytrytylowej, ugrupowanie to staje się nietrwałe w warunkach zasadowych i traktowanie oligomeru wodnym roztworem amoniaku lub aminy pozwala na uzyskanie 5'-fosforanu oligonukleotydu (Schemat 9).

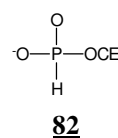
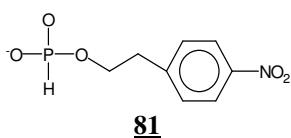


SCHEMAT 9

Opisane powyżej podejścia z wykorzystaniem amidofosforów prowadziły do 5'-fosforanów oligonukleotydów. Lepsze możliwości przyłączania innych reagentów modyfikujących czy grup reporterowych na końcu 5' wydaje się stwarzać ugrupowanie wodorofosforinowe. Może być też ono traktowane jako modyfikacja oligomerów służąca np. do badań aktywności substratowej w reakcjach enzymatycznych.

Najprostsze reagenty służące do otrzymania 5'-wodorofosforinów oligonukleotydów to opisane wcześniej (str. 22) PCl_3 i salicylochlofosfina⁴⁶. Ze względu na dużą reaktywność stwarzają one jednak zagrożenie modyfikacji zasad azotowych łańcucha oligonukleotydowego.

Bardziej odpowiednia dla selektywnego modyfikowania 5'-końcowej reszty hydroksylowej oligonukleotydów jest metoda z użyciem monoestrów H-fosfonianowych **81**⁸⁴ lub **82**⁸⁵, zawierających podatne na β -eliminację reszty alkilowe.



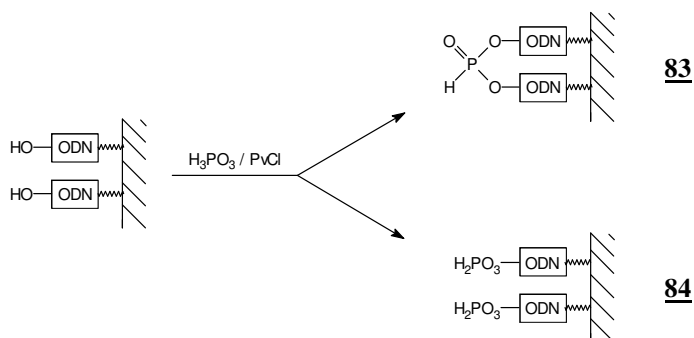
Związek **81** [H-fosfonian 2-(*p*-nitrofenylo)etylowy] otrzymano przeprowadzając PCl_3 w tris(1,2,4-triazoilo)fosforin, który poddawano reakcji z 2-(*p*-nitrofenylo)etanolem. Po hydrolizie powstałego *p*-nitrofenylofosforoditriazolidu, produkt **81** oczyszczano na żelu krzemionkowym. H-Fosfonian 2-cyjanoetylowy **82** otrzymano przez hydrolizę dichlorofosforinu 2-cyjanoetylowego i stosowano bez oczyszczania. Związki powyższe umożliwiają fosfonylację

oligonukleotydów w reakcji standardowej kondensacji z chlorkiem piwaloilu. β -Eliminacja reszty 2-(*p*-nitrofenylo)etylowej następuje w wyniku działania DBU, reszta 2-cyanoetylowa zaś ulega β -eliminacji w trakcie końcowego działania amoniakiem. W obu przypadkach uzyskuje się 5'-wodorofosforyny oligonukleotydów.

W powyższych podejściach zastrzeżenia może budzić brak zadowalającej procedury uzyskiwania czystych monoestrów. Opisana została jednak inna, prosta metoda otrzymywania wodorofosforynów monoalkilowych poprzez transestryfikację H-fosfonianu difenylowego odpowiednim alkoholem. Powstający na pierwszym etapie H-fosfonian dialkilowy hydrolyzuje się do monoestru, który wydziela się jako produkt krystaliczny⁸⁶.

Marsters i wsp.⁸⁷ opublikowali metodę bezpośredniej fosfonylacji oligonukleotydu kwasem fosforawym z użyciem chlorku piwaloilu jako czynnika aktywującego. Przy proponowanym sposobie aktywacji kwasu fosforawego i stosowanych nadmiarach reagentów produktem głównym (~90%) reakcji był symetryczny H-fosfonian 5'-5' dioligonukleotydowy (**83**). Zwiększenie ilości kwasu fosforawego względem chlorku piwaloilu w roztworze fosfonylującym poprawiło wydajność 5'-H-fosfonianu oligonukleotydu (**84**), jednakże 5'-5' symetryczny dimer był nadal jednym z głównych (~40 %) produktów reakcji (Schemat 10). Przy dalszym wzroście nadmiaru H_3PO_3 fosfonylacja zachodziła ze zdecydowanie mniejszą wydajnością.

W zamierzeniach autorów metody, jej głównym walorem miało być stosowanie prostych i tanich reagentów, a także prostej chemii prowadzącej bezpośrednio do pożądanego produktu. Otrzymane wyniki negatywnie zweryfikowały te oczekiwania. Według mojej oceny podejście to nadal zasługuje na uwagę, jednakże wymaga dopracowania metodycznego. Uważam, że warunkiem koniecznym kontroli procesu fosfonylacji w proponowanym systemie jest identyfikacja czynnika fosfonylującego. Bez większego ryzyka można postulować, że układ produktów opisany przez Mastersa i wsp. wiąże się nie z samą reakcją fosfonylacji, lecz ze sposobem aktywacji kwasu fosforawego chlorkiem piwaloilu i kontrola tej ostatniej reakcji może znacznie poprawić chemoselektywność procesu.



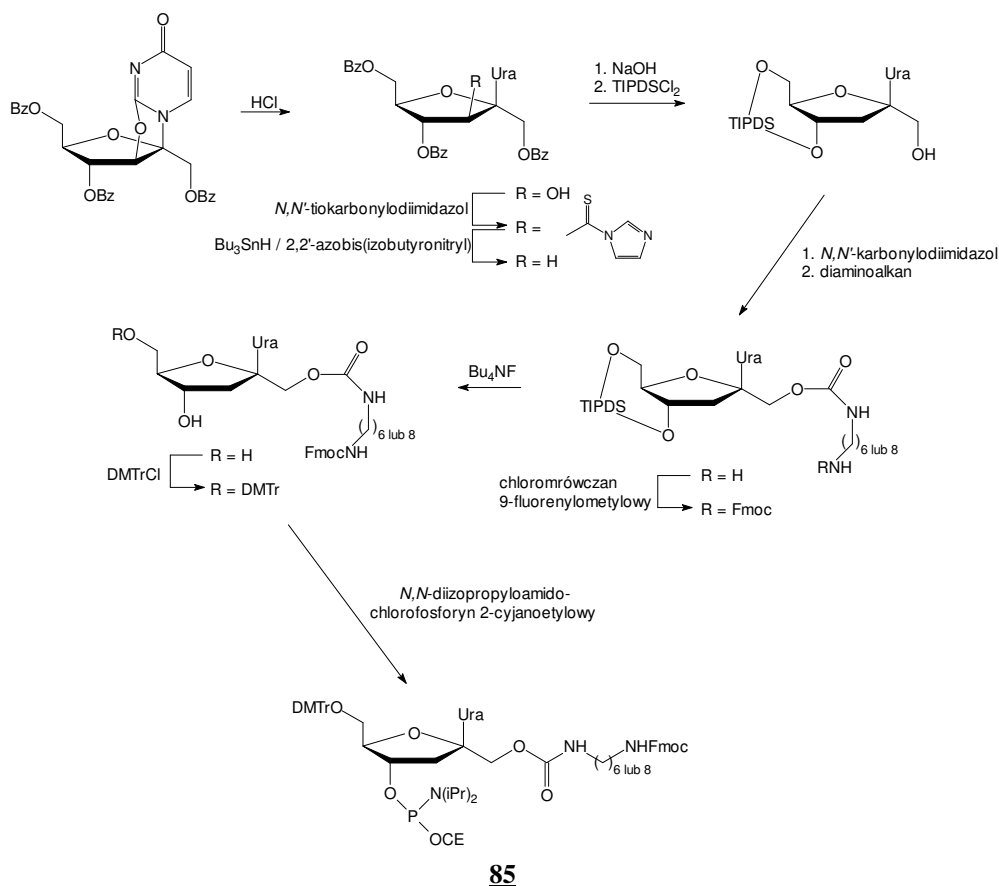
SCHEMAT 10

4. MODYFIKACJE W POZYCJACH 1', 2' I 4' SZKIELETU CUKROWEGO

Idea modyfikacji reszty cukrowej (C-1', C-4' i 2'-OH) oparta jest na założeniu, że reszta ta nie jest bezpośrednio uwikłana w proces hybrydyzacji, w związku z czym jej modyfikacje nie powinny w istotny sposób wpływać na trwałość dupleksu. Wybór takiego sposobu modyfikacji z reguły wymaga przygotowania w pierwszej kolejności odpowiednio zmodyfikowanego nukleozydu, następnie jego amidofosforynu lub H-fosfonianu i wprowadzenie go do oligomeru. Syntony tego typu można wprowadzać w dowolnej pozycji łańcucha oligonukleotydu. Możliwe jest też wprowadzanie do oligomeru wielu tego typu jednostek.

A. Modyfikacje pozycji 1'

Amidofosforyn nukleozydu zmodyfikowanego w pozycji 1' (**85**)⁸⁸ otrzymany został w wieloetapowej syntezie (Schemat 11), w której substratem był 2,3'-O-anhydro-1-(1,4,6-tri-O-

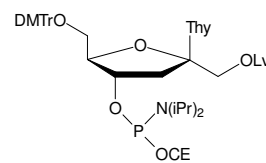


SCHMAT 11

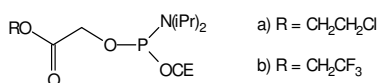
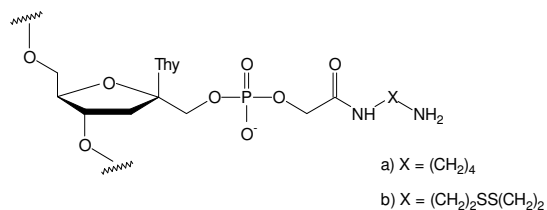
benzoilo-β-D-fruktofuranosylo)uracyl. Po hydrolizie mostka tlenowego 2,3' grupa 2'-OH usunięta została działaniem N,N'-tiokarbonyloimidazolu i wodorkiem tributyllocyny wobec 2,2'-azobis(izobutyronitrylu). Benzoilowe grupy ochronne tak otrzymanej 3'-deoksypsikourydyny usunięto następnie roztworem NaOH. Reszty -OH w pozycjach 4' i 6' zablokowano

dwufunkcyjną grupą 1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksan-1,3-diolową (TIPDS), a w pozycji 1'-OH przyłączono diaminę za pośrednictwem N,N'-karbonylodiimidazolu. Wolną resztę -NH₂ zablokowano grupą 9-fluorenylometoksykarbonylową (Fmoc), a resztę siloksanową usunięto z pozycji 3'-O i 5'-O działaniem fluorku tetrabutylamoniowego. Ostatecznie w grupę 5'-hydroksylową zablokowano dimetoksytrytylem i przeprowadzono fosfitylację w pozycji 3'-O, co doprowadziło do syntonu **85**. Włączany był on do oligonukleotydów wg standardowych procedur, a po odblokowaniu i oczyszczeniu oligomeru reszta 1'-aminoalkilowa wykorzystana była do przyłączenia pirenu i antrachinonu.

W innym podejściu⁶¹, stosując amidofosforyn typu **86**, wprowadzono w wybrane pozycje łańcucha oligonukleotydowego jednostki 3'-deoksypsikotymidynylowe z pozycją 1'-hydroksylową zabezpieczoną resztą lewulinylową. Po zakończeniu syntezy oligomeru grupę lewulinylową usunięto selektywnie octanem hydrazyny i do uwolnionej reszty 1'-OH przyłączono amidofosforyn typu **57** (str. 27)

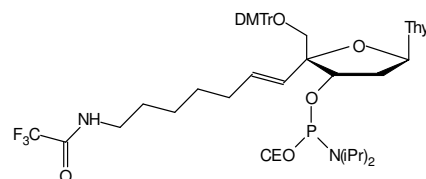
**86**

niosący resztę glikolanu trifluoroetylowego lub chloroetylowego jako miejsce dalszej modyfikacji. Tego typu ugrupowanie karboksyestrowe pod wpływem diaminy przekształca się łatwo w ugrupowanie aminoalkilokarbamidowe (związek typu **87**). Po usunięciu wszystkich grup blokujących, w reakcji z chlorkiem 4-(dimetyloamino)azobenzeno-4'-sulfurylu, do reszty aminoalkilowej w pozycji 1' przyłączono grupę dabsylową jako znacznik nieradioizotopowy sondy.

**57****87**

B. Modyfikacje pozycji 4'

Modelowanie komputerowe wykazało, że przyłączenie łańcucha alkilowego do węgla 4' ma znacznie mniejszy wpływ na stabilność dupleksu DNA-DNA niż podobne modyfikacje w innych pozycjach reszty cukrowej. Weryfikację eksperymentalną obliczeń i wyników komputerowych zrealizowano przez syntezę oligomeru, w którym w wybranych pozycjach ulokowano odpowiednio modyfikowane jednostki nukleotydowe⁸⁹. W tym celu przed syntezą oligonukleotydu konieczne było przygotowanie odpowiednio modyfikowanego amidofosforynu **88**. Substratem do syntezy tego ostatniego był unikalny nukleozyd (4'-hydroksy-2'-deoksyurydyna), który w siedmiu etapach syntetycznych

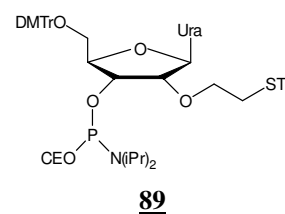
**88**

przekształcono w 4'-aminoalkilo-2'-deoksyurydunę i, po zablokowaniu funkcji 5'-OH, w amidofosforyn **88**.

Przeprowadzono syntezy szeregu oligomerów z modyfikacjami w różnych pozycjach sekwencji. Do odsłoniętych w trakcie końcowego odblokowania grup aminoalkilowych przyłączano biotynę, otrzymując zestaw sond molekularnych modyfikowanych w jednej lub kilku pozycjach. Porównawcze pomiary efektywności hybrydyzacji wykazały, że każdy 4'-modyfikowany nukleotyd obniżał T_m jedynie o 1,2 – 1,7°C, co potwierdziło eksperymentalnie wcześniejsze wyniki otrzymane z modelowania komputerowego.

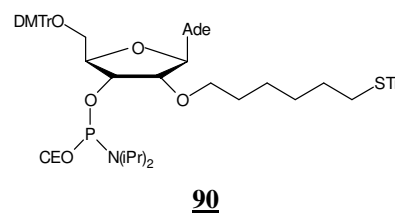
C. Modyfikacje pozycji 2'-OH

W odróżnieniu od modyfikacji w pozycjach 1' i 4', które wymagały syntezy nienaturalnych jednostek nukleozydowych jako substratów, do modyfikacji w pozycji 2' wykorzystano naturalne rybonukleozydy, a reakcje funkcjonalizacji ukierunkowano na alkirowanie grupy 2'-hydroksylowej. Przykładem takiego podejścia może być alkirowanie bromkiem S-trytyloalkilowym odpowiednio przygotowanego nukleozydu z wolną grupą 2'-OH⁹⁰. Po fosforynacji otrzymywano amidofosforyn modyfikowanego nukleozydu **89**, który włączano do oligonukleotydu.



Ze względu na obecność objętościowej grupy trytylowej w sąsiedztwie centrum fosforowego, po to, by zapewnić dostatecznie wysoką wydajność przyłączenia tak modyfikowanego syntonu do łańcucha oligonukleotydowego, konieczne było wydłużenie czasu kondensacji z 1 min. do 10 min. Próby zastąpienia grupy trytylowej mniej objętościowymi grupami *tert*-butylową czy 2-cyanoetylową zakończyły się niepowodzeniem.

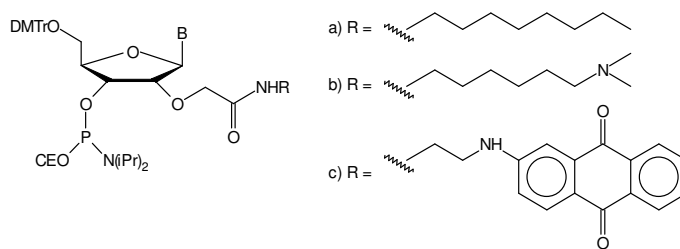
W podobny sposób otrzymano analogicznie zmodyfikowany amidofosforyn nukleozydu **90**⁹¹. Zastosowanie dłuższego łącznika *n*-heksylenowego w miejsce etylenowego nie zmieniło zasadniczo efektywności kondensacji i także w tym przypadku konieczne było wydłużenie czasu kondensacji do 10 min.



W obu podejściach należało stosować na etapie utleniania wodoronadtlenek *tert*-butylowy w miejsce standardowo używanego I₂/H₂O, gdyż w obecności jodu grupa trytylotioeterowa była nietrwała. Z oligomeru, po syntezie usuwano grupę trytylową (AgNO₃), a do wygenerowanej reszty -SH przyłączano piren, fluoresceinę czy fenantrolinę jako grupy reporterowe.

Ponieważ alkirowanie nukleozydów wiąże się z niebezpieczeństwem modyfikacji reszt zasadowych, T. H. Keller i R. Haner zaproponowali przeprowadzenie reakcji alkirowania odpowiednio blokowanej rybozy [3,5-O-(1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksan-1,3-diylo)-β-D-rybofuranozydu metylowego] i dopiero tak modyfikowany cukier wykorzystywano w reakcji glikozylacji tyminy lub adeniny⁹². Uzyskany rybozyd tyminy posłużył do syntezy pochodnej cytydynowej, nie przedstawiono natomiast metody otrzymywania modyfikowanej w ten

sposób guanozyny. Dimetoksytrytylowanie i fosforynowanie tak otrzymanych nukleozydów prowadziło do amidofosforynów typu **91a** – **9**, niosących w pozycji 2'-O różne grupy modyfikujące⁹³.

**91**

Otrzymane oligonukleotydy pozwoliły porównać wpływ charakteru reszty modyfikującej na trwałość duplexu DNA-DNA. I tak, grupy lipofilowe w pozycji 2'-O (np. *n*-oktyl) powodowały destabilizację duplexu (obniżenie T_m), natomiast grupy hydrofilowe (kation *n*-alkiloamoniowy) czy interkalujące (antrachinon) wywierały efekty stabilizujące duplex. Wprawdzie prace te nie opisywały syntezy sond molekularnych z nieradioizotopowymi grupami reporterowymi, jednak uważam, że mieszczą się w tematyce niniejszego przeglądu.

D. Podsumowanie

Opisane powyżej metody modyfikacji pozycji 1', 4' i 2'-OH pozwalają na wprowadzanie różnych ugrupowań w dowolne miejsce oligonukleotydu. Modyfikacje te nie powodują zwykle znaczącego pogorszenia właściwości hybrydacyjnych oligomerów, a nawet mogą je polepszyć. Umożliwiają przeprowadzanie różnorodnych badań oddziaływań DNA – DNA i DNA – białko. Pomimo faktu, że molekularne sondy oligonukleotydowe opisane w tym rozdziale mają pewne zalety w porównaniu z sondami o innym typie modyfikacji, to zalety te nie są aż tak dominujące, by polecać modyfikacje w pozycjach 1', 4' czy 2'-O jako zdecydowanie najlepsze. Dodatkowo, ze względu na stopień trudności i złożoność przygotowania tego typu sond, ich zastosowania będą ograniczone jedynie do specjalnych celów lub przypadków, gdy inne typy modyfikacji nie będą możliwe.

5. MODYFIKACJE ZASAD HETEROCYKLIKARNYCH

Przyłączenie grup reporterowych do zasad nukleinowych jest metodą równie popularną jak stosowanie syntonów nienukleotydowych. Związki te teoretycznie mogą być włączane w dowolne miejsce oligonukleotydu. Należy jednak pamiętać, że modyfikacja zasady azotowej może w znacznym stopniu obniżyć jej zdolność do tworzenia wiązań wodorowych z zasadą komplementarną. Ma to szczególne znaczenie w krótkich syntetycznych sondach molekularnych. Dla uniknięcia destabilizacji podwójnej nici kwasu nukleinowego, do wprowadzania grup reporterowych wykorzystuje się zasady nukleotydowe ze skrajnych pozycji łańcucha – zwykle z końca 5'. Podobnie jak w przypadku syntonów nienukleotydowych, ze względu na niezwykle bogaty materiał literaturowy, przykładowe metody modyfikacji reszt zasadowych nukleozydów zestawiono w tabeli (Tabela 5).

TABELA 5. Modyfikacje reszt zasadowych nukleozydów

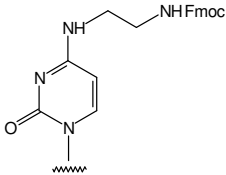
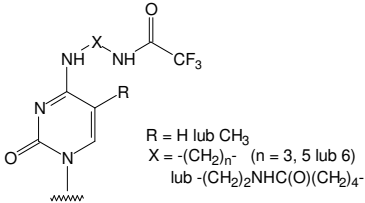
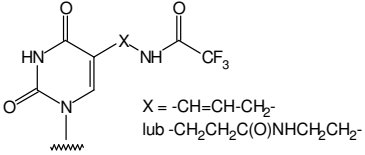
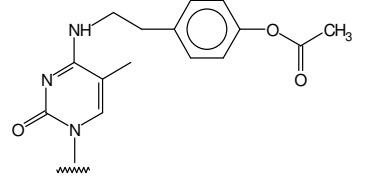
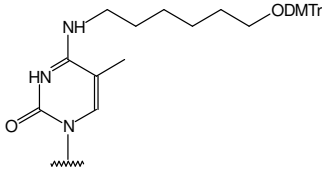
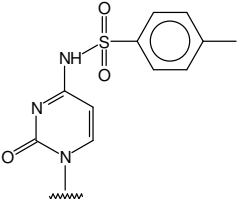
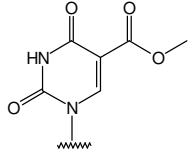
Nr	Zasada	Komentarz	Lit.
92		<ol style="list-style-type: none"> Otrzymywanie: transaminacja cytydyny etylenodiaminą, następnie wprowadzenie grupy Fmoc i standardowe reakcje prowadzące do przyłączenia nukleozydu do podłoża stałego. Odblokowanie grupy aminowej podczas końcowego działania amoniakiem. Do oligomeru po odblokowaniu przyłączono enzym (AP) poprzez dodatkowy łącznik z wolną grupą tiolową (str. 50). 	94
93	 <p>R = H lub CH₃ X = -(CH₂)_n- (n = 3, 5 lub 6) lub -(CH₂)₂NHC(O)(CH₂)₄-</p>	<ol style="list-style-type: none"> Otrzymywanie nukleozydu: z 5',3'-O-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-4-N-tosylocytydyny w 4 etapach z wyd. 46%⁹⁵; z 5'-dimetoksytrytylotymidyny poprzez pochodną 4-triazolopirymidynową, 4 etapy, wyd. 54%¹⁸; z cytydyny przez pochodną 4-O-(2-nitrofenylową) w 6 etapach z wyd. 41%⁹⁶; z cytydyny przez transaminację w 3 etapach z wyd. 33%⁹⁷. Odblokowanie grupy aminowej podczas końcowego działania amoniakiem. 	18, 95-97
94	 <p>X = -CH=CH-CH₂- lub -CH₂CH₂C(O)NHCH₂CH₂-</p>	<ol style="list-style-type: none"> Otrzymywanie nukleozydu: z 5-chlorortęcio-2'-deoksyurydyny w 2 etapach z wyd. 21%⁹⁸ lub w 3 etapach z wyd. <50%⁹⁷. Odblokowanie grupy aminowej podczas końcowego działania amoniakiem. 	97, 98
95		<ol style="list-style-type: none"> Otrzymywanie nukleozydu: z 4-tiotymidyny, proces trój etapowy, wyd. 34%. Resztę fenolową wykorzystano po syntezie oligomerów do wprowadzania atomów ¹²⁵I. Wydajność jodowania wynosiła ok. 10%. 	99

TABELA 5 cd.

Nr	Zasada	Komentarz	Lit.
96	 <p>The structure shows a pyrimidine ring with a carbonyl group at position 2, a methyl group at position 5, and a wavy line at position 1. At position 4, there is an amino group (-NH-) connected to a hexyl chain ending in an ODMTr group.</p>	<ol style="list-style-type: none"> Otrzymywanie nukleozydu: z 5'-dimetoksytrytylotymidyny, w 4 etapach, wyd. 53%¹⁰⁰ lub z 5'-dimetoksytrytylo-4-tiotymidyny, w 2 etapach, wyd. 79%⁶². Związek 96 służy do uzyskiwania rozgałęzionych oligonukleotydów (typu „drzewo”) umożliwiającą wprowadzanie wielu grup reporterowych. 	62, 100
97	 <p>The structure shows a pyrimidine ring with a carbonyl group at position 2, a wavy line at position 1, and a 4-N-p-toluenesulfonyl group (-NH-SO₂-C₆H₄-CH₃) at position 4.</p>	<ol style="list-style-type: none"> Otrzymywanie nukleozydu: z cytydyny, w dwóch etapach, wyd. 74%. Aby uzyskać wolne reszty aminowe, oligomer, po odcięciu od podłoża stałego (NH₃ aq. stęż., 1h, temp. pok.), inkubowano w 1,2-bis(2-aminoetoksy)etanie* (80°C przez noc). Pod wpływem tej diaminy reszty 4-N-<i>p</i>-toluowe ulegały transaminacji, a jednocześnie następowało całkowite odblokowanie oligomeru. 	101
98	 <p>The structure shows a pyrimidine ring with carbonyl groups at positions 2 and 4, a wavy line at position 1, and a methoxycarbonyl group (-COOCH₃) at position 5.</p>	<ol style="list-style-type: none"> Otrzymywanie nukleozydu nietrytylowanego: z 5-jodo-2'-deoksyurydyny, w jednym etapie, wyd. 95%. Oligomery na podłożu poddawano działaniu diamin, które reagowały z ugrupowaniem estrowym 5-metoksykarbonylouracylu dając pochodne z wolnymi grupami aminowymi. Równocześnie następowało całkowite odblokowanie i odcięcie oligomeru od podłoża stałego. 	102

* Wpływ mostków tlenowych na właściwości łącznika opisano na str. 13.

TABELA 5 cd.

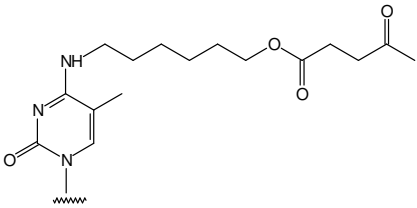
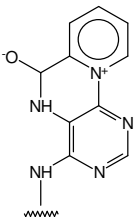
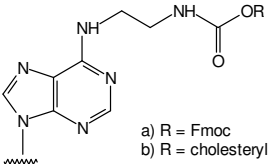
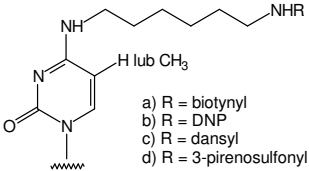
Nr	Zasada	Komentarz	Lit.
99		<ol style="list-style-type: none"> Otrzymywanie nukleozydu: z 5'-dimetoksytrytylotymidyny, w 4 etapach, wyd. 56%. Po wprowadzeniu kilku jednostek nukleozydowych typu 99 funkcję hydroksylową odblokowywano hydrazyną i prowadzono dalej syntezę, uzyskując modyfikowany oligomer typu „grzebień”. 	100, 103, 104
100		<ol style="list-style-type: none"> Otrzymywanie nukleozydu: z inozyny, w trzech etapach. Kluczowa reakcja to fotochemiczne przekształcenie chlorku N-(3',5'-di-O-acetylo-2'-deoksynebularyn-6-ylo) – pirydyniowego w diacetylową pochodną luminarozyny (wyd. 30%). Deoksylluminarozyna jest silnym fluoroforem. 	105
101		<ol style="list-style-type: none"> Otrzymywanie nukleozydu: z rybozydu 6-chloropuryny, w 3 etapach, wyd. 66% (101a) i 63% (101b). Nukleozydy typu 101 przyłączono do podłoża stałego i wykorzystano do syntezy oligomerów modyfikowanych na końcu 3'. 	106
102		<ol style="list-style-type: none"> Otrzymywanie nukleozydów: z 3',5'-di-O-acetylo-2'-deoksyurydyny (lub tymidyny) poprzez pochodną 4-tio, w 4 etapach, wyd. rzędu 40%. Grupa 2,4-dinitrofenylowa okazała się nietrwała w warunkach odblokowania (30% rozkładu po 16h w NH₃ aq. stęż., 55°C). 	78

TABELA 5 cd.

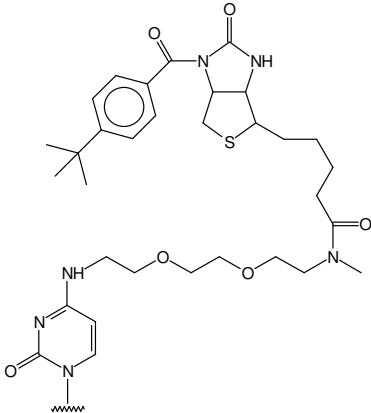
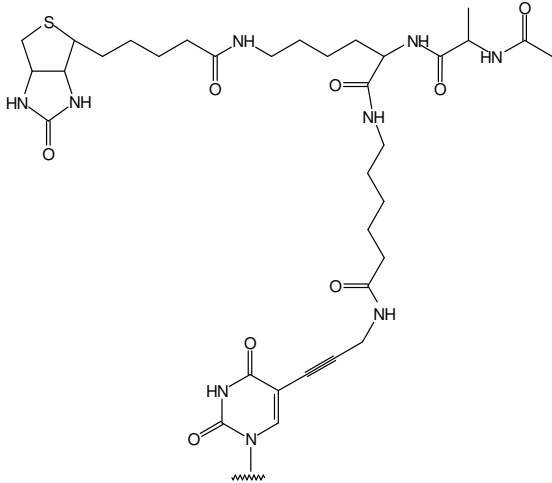
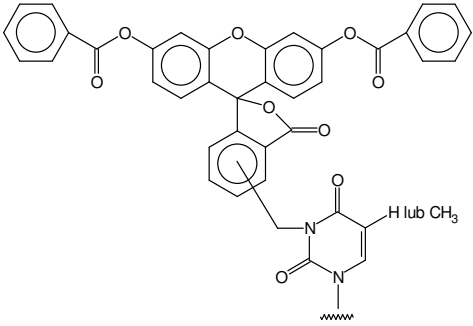
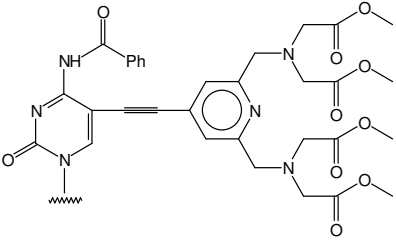
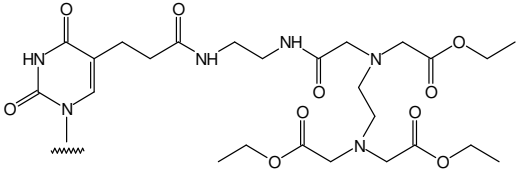
Nr	Zasada	Komentarz	Lit.
103		<ol style="list-style-type: none"> Otrzymywanie nukleozydu: z 2'-deoksyurydyny, w 7 etapach, wyd. 16%. Jako łącznik wykorzystano 1,2-bis(2-metyloaminoetoksy)etan ze względu na jego podatność na hydratację (przypis str. 22). Pozycja N-1 pierścienia ureidowego biotyny chroniona była grupą <i>p</i>-(<i>tert</i>-butylo)benzoiłową. Związek 103 włączano w dowolne miejsce oligonukleotydu. 	107
104		<ol style="list-style-type: none"> Otrzymywanie: wychodząc z 5-jodo-2'-deoksyurydyny, w 3 etapach otrzymano pochodną 5-[3-(Boc-amino)prop-1-yn-1-ylową lub 5-[3-(Pix-amino)prop-1-yn-1-ylową z wydajnością odpowiednio 33 i 53%. Pochodne te przyłączono do podłoża stałego i w 5 etapach przeprowadzono w podłoże 104, zawierające pochodną deoksyurydyny, wykorzystując reakcje i odczynniki stosowane w syntezie oligopeptydów. Podłoże to wykorzystano następnie do standardowej syntezy oligonukleotydu. Biotynylowany 23-mer uzyskano z niską wydajnością (2%). Autorzy nie badali możliwości zachodzenia reakcji ubocznych w ureidowym pierścieniu biotyny podczas syntezy oligonukleotydu. 	108

TABELA 5 cd.

Nr	Zasada	Komentarz	Lit.
105		<ol style="list-style-type: none"> Otrzymywanie nukleozydu: z 5'-O-dimetoksytrytylotymidyny, w 2 etapach, wyd. 27%. Do alkilowania pozycji N-3 użyto 3',6'-dibenzoilo-4(5)-(bromometylo)fluoresceiny otrzymanej z bezwodnika 4-metyloftalowego i rezorcyny (3 etapy, 50%). Z nukleozydu otrzymano 5'-O-amidofosforyn i przyłączono do oligonukleotydu z wydajnością ok. 70% uzyskując wiązanie 5' – 5'. Ochronne grupy benzoilowe usunięto w trakcie działania amoniakiem. Wiązanie fluoresceiny z nukleozydem okazało się stabilne w standardowych warunkach odblokowania. 	109
106		<ol style="list-style-type: none"> Otrzymywanie nukleozydu: z N⁴-benzoilo-5-jodo-2'-deoksycytydyny lub 5-jodo-2'-deoksyurydyny, w 2 etapach, wydajności: odpowiednio 60% i 81%. Przed końcowym działaniem amoniakiem należy zhydrolizować wiązania estrowe roztworem NaOH. Ugrupowanie typu 106 wykorzystano do chelatowania kationów Eu³⁺ i Tb³⁺, co pozwoliło na zastosowanie szybkiej fluorymetrii do wykrywania tak zmodyfikowanych oligomerów. 	110
107		<ol style="list-style-type: none"> Otrzymywanie nukleozydu: z 2'-deoksyurydyny, w 4 etapach, wyd. 31%. Do odblokowania użyto 0,1 M NaOH zamiast amoniaku. Pochodną typu 107 wykorzystano do chelatowania kationów Fe²⁺, które katalizowały specyficzną hydrolizę komplementarnej nici DNA w sąsiedztwie modyfikacji. 	37

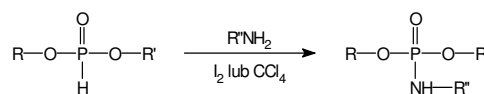
Syntony zawierające modyfikowane zasady można w standardowy sposób wprowadzać do łańcucha oligonukleotydowego podczas jego syntezy. Można uzyskiwać w ten sposób modyfikacje w dowolnej pozycji oligomeru, a także modyfikacje wielokrotne. Pomimo to, syntony tego typu, ze względu na trudności w ich przygotowaniu, stosowane są w ograniczonym zakresie.

6. MODYFIKACJE INTERNUKLEOTYDOWYCH GRUP FOSFORANOWYCH

Aktualnie stosowane metody syntezy oligonukleotydów oparte są o chemię fosforu trójwartościowego (amidofosforyny lub wodorofosforyny). W obu stosowanych metodach powstałe w reakcji kondensacji triestry fosforynowe lub diestry H-fosfonianowe należy utlenić do fosforanów. Konieczność utlenienia internukleotydowego wiązania w trakcie lub też po zakończeniu syntezy oligomeru otwiera możliwości modyfikacji centrum fosforowego. Reakcje utleniania triestrów i diestrów kwasu fosforowego zachodzą według innych mechanizmów, co zostało wykorzystane do wprowadzania punktowych modyfikacji reszty fosforanowej ukierunkowanych na syntezę oligonukleotydowych sond molekularnych niosących nieradioizotopowe grupy reporterowe.

A. Modyfikacje prowadzące do amidofosforanów

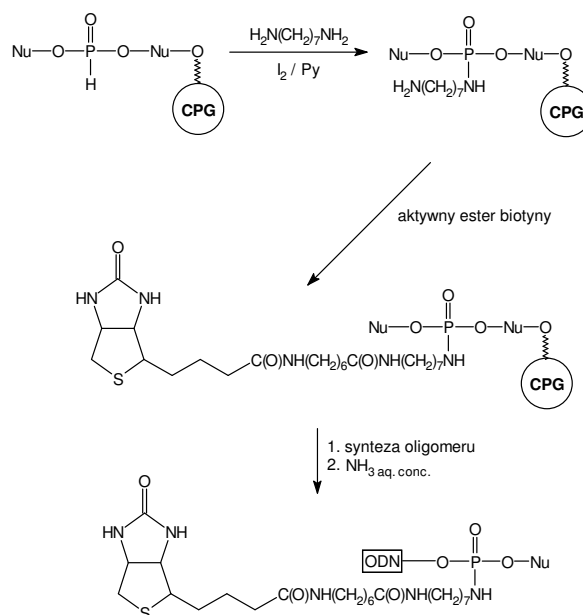
Ten typ modyfikacji można stosować w przypadku, gdy w oligomerze występuje diestrowe wiązanie H-fosfonianowe. W podejściu tym wykorzystano fakt, że utlenianie diestrów wodorofosforynów halogenoalkanami (CCl_4) lub jodem prowadzi w pierwszej kolejności do halogenofosforanów, które w reakcjach z nukleofilami można przekształcać w pochodne fosforanów. Tak więc, w reakcjach utleniania wobec nadmiaru wody finalnymi produktami są diestry fosforanowe. Jeżeli w analogicznej reakcji nukleofilem jest amina, finalnymi produktami utlenienia są amidofosforany (Schemat 12), które mogą być wykorzystane do przyłączenia grup reporterowych.



SCHEMAT 12

Powyższe właściwości wodorofosforynów wykorzystano w syntezie modyfikowanych oligonukleotydów¹¹¹, gdzie do nukleozydu związanego z podłożem stałym przyłączano następną jednostkę nukleozydową z wytworzeniem diestrowego wiązania H-fosfonianowego (Schemat 13).

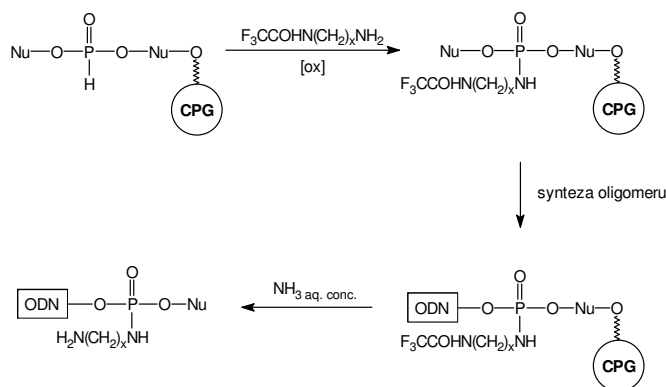
Utlenianie (I_2) otrzymanego diestru H-fosfonianowego wobec nieblokowanego 1,7-diaminoheptanu prowadziło do amidofosforanu N-(7-aminoheptylowego). Do wolnej grupy aminowej przyłączano aktywny ester biotyny, wprowadzając w ten sposób grupę reporterową i uzyskując jednocześnie trwałe ugrupowanie podczas dalszej elongacji łańcucha



SCHEMAT 13

oligonukleotydu. Po uwolnieniu z podłoża i odblokowaniu oligomeru otrzymano gotową sondę z przyłączoną na końcu 3' biotyną jako grupą reporterową.

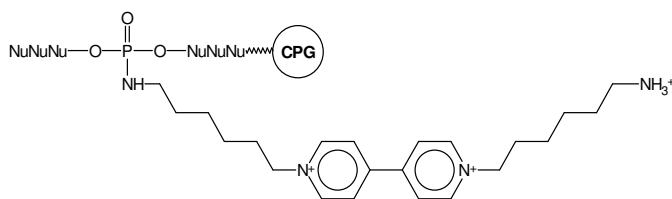
Innym wariantem podobnej modyfikacji może być podejście, w którym jako nukleofil zastosowano N-trifluoroacetyloalkilodiaminę¹¹²⁻¹¹⁴ (Schemat 14).



SCHEMAT 14

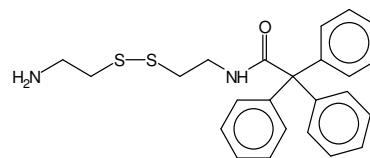
W wyniku oksydatywnej amidacji otrzymywano prekursor sondy oligonukleotydu z ugrupowaniem amidofosforowym, w którym funkcja aminowa reszty aminoalkilowej chroniona była trwałą podczas syntezy oligomeru grupą trifluoroacetylową. W trakcie odblokowania (NH_3 aq. stęż.) odsłaniano także tę funkcję i dopiero po izolacji sfunkcjonalizowanego oligomeru przyłączano grupę reporterową.

Analogicznie otrzymano oligomer typu **108** z przyłączoną w różnych pozycjach łańcucha pochodną wiologenu (bis-czwartorzędową solą 4,4'-dipirydylu, będącą potencjalnym źródłem wolnych rodników) z odsłoniętą resztą aminową, która nie była chroniona podczas syntezy łańcucha oligonukleotydu¹¹⁵.

**108**

Autorzy metody nie dyskutowali wpływu wolnej grupy aminowej w łańcuchu bocznym na efektywność dalszej syntezy oligonukleotydu.

Dalszym przykładem modyfikacji centrum fosforowego diestrów H-fosfonianowych jest oksydacyjna kondensacja z N-trifenyloacetylocystaminą **109**¹¹⁶, która prowadziła do oligomeru niosącego lipofilową grupę trytylową ułatwiającą jego oczyszczanie (HPLC – faza odwrócona). Po oczyszczeniu oligomer poddawano działaniu DTT, pod wpływem którego pękał mostek disiarczkowy i uwalniała się funkcja -SH, co umożliwiało przyłączanie grup reporterowych np. w reakcjach alkilowania.

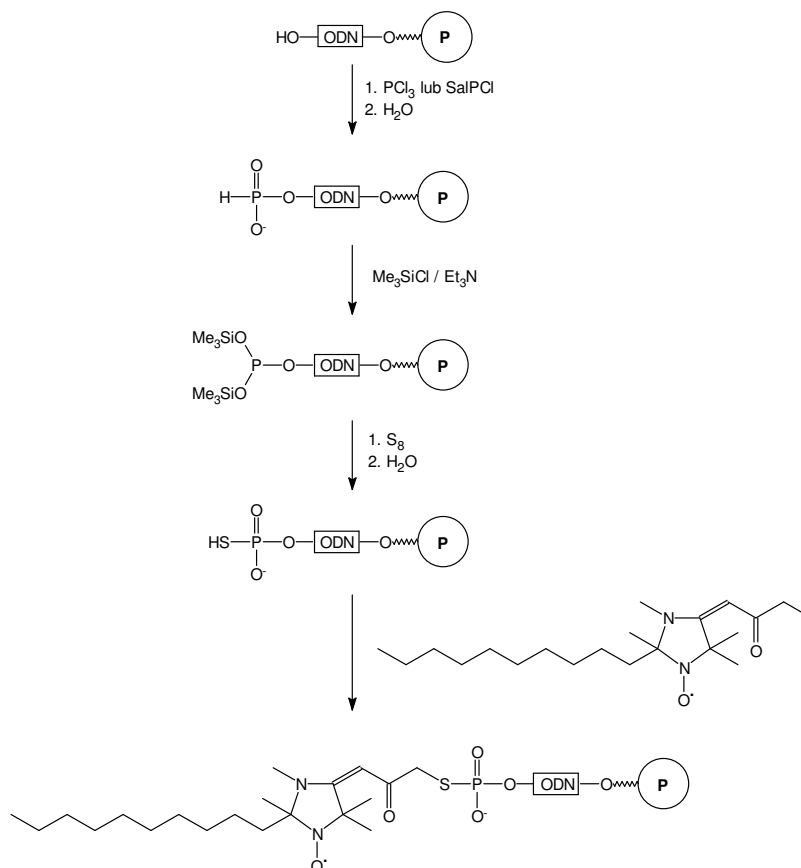
**109**

B. Modyfikacje prowadzące do tiofosforanów

Innym sposobem funkcjonalizacji reszty fosforanowej jest przeprowadzenie jej w pochodną tiofosforanową. Tego typu związki, podobnie jak tiole, podatne są na reakcje alkilowania, co pozwala na wprowadzenie do oligomeru grupy reporterowej.

Przykładem takiego podejścia jest szereg reakcji przedstawiony na Schemacie 15. Oligomer związany z podłożem fosforynowano za pomocą trichlorku fosforu lub salicylochlo-rofosfiny (2-chloro-5,6-benzo-1,3,2-dioksaforin-4-onu). Resztę H-fosfonianową ternalizowano trimetylochlorosilanem i następnie utleniano siarką elementarną. Powstający tiofosforan alkilowano 1-tlenkiem 2-decylo-2,3,5,5-tetrametylo-4-(3-jodo-2-oksopropylideno)imidazolu. Tak otrzymany oligomer odblokowano roztworem amoniaku i wykorzystywano w badaniach elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR)⁴⁶.

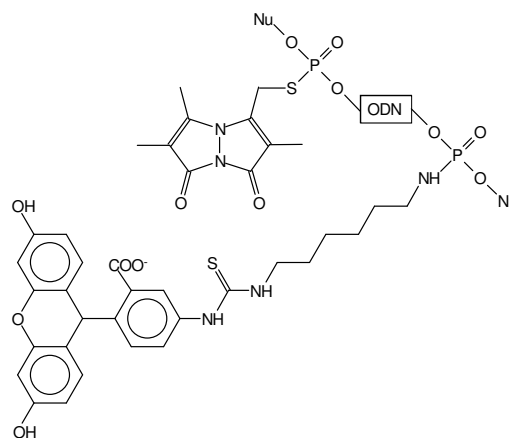
Innym podejściem pozwalającym na otrzymanie oligonukleotydów zawierających wiązanie tiofosforanowe jest prowadzenie syntezy oligonukleotydu metodą amidofosforynową, a jedynie ostatnią kondensację metodą H-fosfonianową. Ugrupowanie wodorofosforynowe utleniano następnie siarką, uzyskując na końcu 5' oligomeru diestrową resztę tiofosforanową. Oligonukleotyd odblokowywano roztworem amoniaku i w reakcji alkilowania wprowadzano takie grupy reporterowe jak biman, dansyl lub fluoresceinę¹¹³.



SCHEMAT 15

C. Kombinacja modyfikacji poprzez amidofosforany i tiofosforany

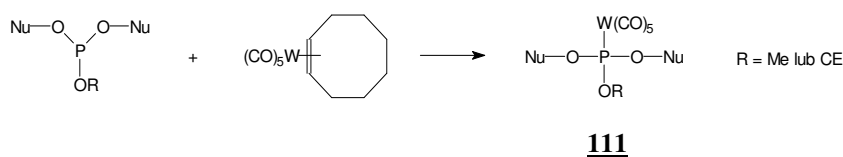
Różnice w reaktywności funkcji aminowej i tiofosforanowej pozwalają na wprowadzenie do oligomeru dwóch różnych grup reporterowych¹¹³. W tym celu w trakcie syntezy oligonukleotydu metodą amidofosforynową dwukrotnie zastosowano syntony wodorofosforynowe. Pierwszy H-fosfonian wprowadzono na początku syntezy (koniec 3') i utleniono czterochlorkiem węgla wobec 1-N-trifluoroacetylo-1,6-diaminoheksanu. Drugi synton H-fosfonianowy użyto na zakończenie syntezy oligomeru (koniec 5') i wiązanie H-fosfonianowe utleniono siarką. Tak modyfikowany oligomer odblokowano w standardowy sposób po czym resztę tiofosforanową na końcu 5' alkilowano selektywnie monobromobimananem {3,6,7-trimetylo-4-bromometylo-1,5-diazabicyklo-[3.3.0]okta-3,6-dien-2,8-dionem} (znacznik fluorescencyjny). Funkcję aminową łańcucha aminoalkilowego na końcu 3' wykorzystano do przyłączenia biotyny (w postaci estru aktywnego) lub fluoresceiny (w postaci izotiocyanianu), uzyskując sondę oligonukleotydową typu **110**.



Stosowanie oligomerów z przyłączonymi w określonych pozycjach łańcucha dwiema różnymi grupami reporterowymi powinno uprościć prowadzenie takich badań jak np. analiza strukturalna DNA, oddziaływania DNA – białko czy dynamika kwasów nukleinowych.

D. Inne metody modyfikacji

Pisząc o modyfikacjach internukleotydocy reszt fosforanowych prowadzących do oligomerów z nieradioizotopowymi grupami reporterowymi, warto wspomnieć, że modyfikacje mogą być wykorzystane do innych celów, np. w badaniach rentgenograficznych. Przykładem może być praca Dalla Riva Tomy i Bergstroma¹¹⁷, którzy wprowadzili atom wolframu do wiązania internukleotydocy w reakcji triestru fosforynowego z pentakarbonylo(η^2 -*cis*-cyklooktano)wolframem(0).



Dinukleotydy typu **111** otrzymano w roztworze, jak i na podłożu stałym, jednak wydajności reakcji były bardzo niskie (16 – 25%). Próby zastosowania powyższego podejścia do modyfikacji oligonukleotydów zakończyły się niepowodzeniem.

E. Podsumowanie

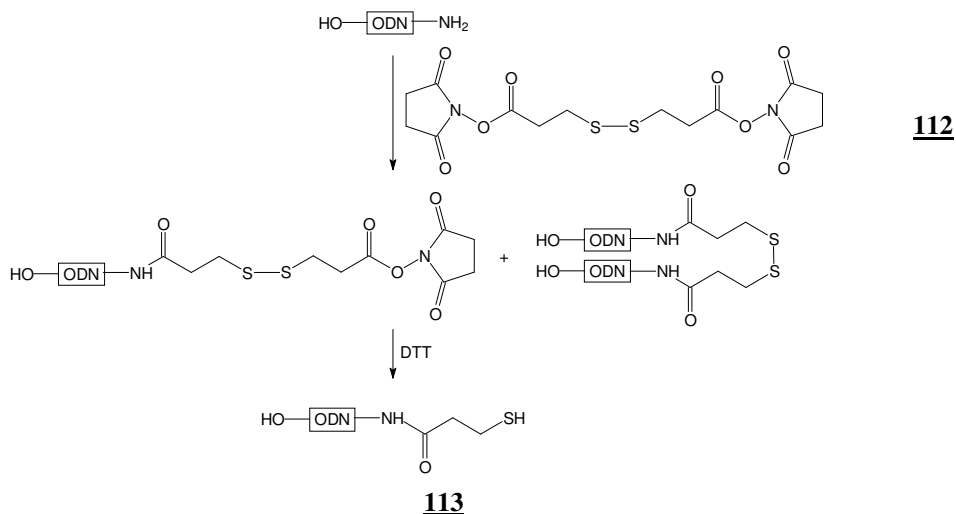
Modyfikacje wiązania internukleotydocy dają możliwości otrzymywania oligonukleotydów znakowanych nieradioizotopowo w różnych (również wielu) pozycjach i z różnymi łącznikami. Metody te są atrakcyjne także dlatego, że można je łatwo modyfikować, podobnie jak w etapowym modyfikowaniu końca 5'. Wady tego podejścia to powstawanie diastereoizomerów oraz konieczność zachowania bezwodnych warunków podczas utleniania.

7. ZAMIANA GRUP FUNKCYJNYCH

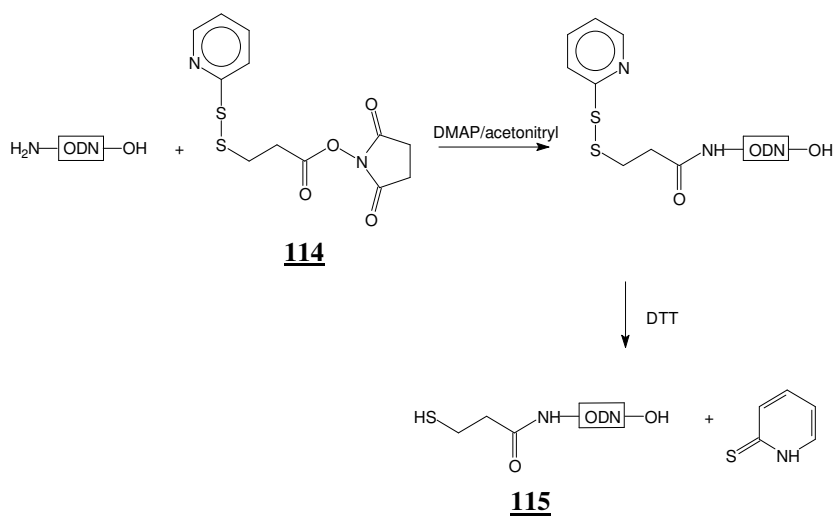
Najczęściej stosowane metody modyfikacji ukierunkowane są na oligonukleotydy niosące wolne reszty $-\text{NH}_2$, gdyż zdecydowana większość handlowo dostępnych pochodnych grup reporterowych jest na tę funkcję ukierunkowana (ugrupowania acylujące lub aktywne estry karboksylowe). Jednakże białka enzymatyczne czy hapteny peptydowe korzystniej przyłączać jest do oligomeru *via* mostki disiarczkowe. Zachodzi więc konieczność ponownej syntezy i modyfikacji oligomeru. Po to, by tego uniknąć, podjęto udane próby zamiany grupy funkcyjnej.

Przykładem takiego rozwiązania może być podejście⁹⁴, w którym oligomer z wolną grupą $-\text{NH}_2$ na końcu 3' acylowano handlowym bifunkcyjnym estrem N-hydroksybursztynimi-

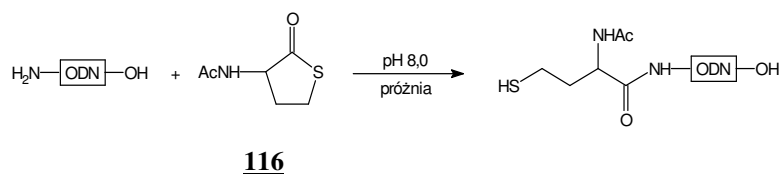
dowym kwasu ditio-*bis*-propionowego (**112**) i po redukcji (DTT) ugrupowania disiarczko-
wego otrzymywano produkt finalny **113** z wolną grupą -SH.



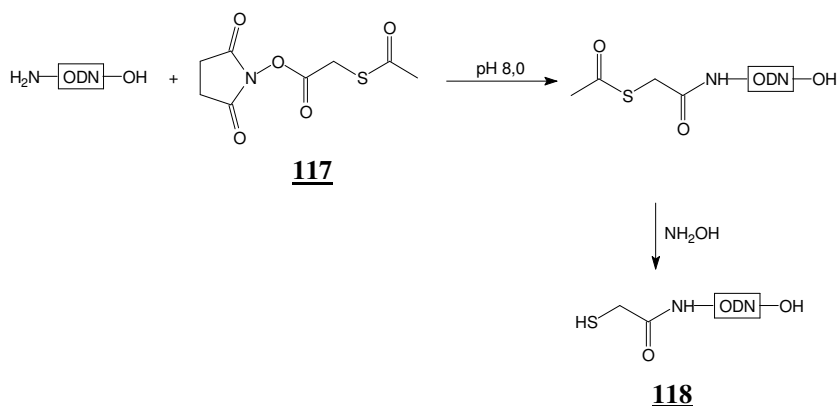
W podobnej metodzie⁵⁹ zastosowano monofunkcyjny reagent, 3-(2-pirydyloditio)-
propionian N-hydroksybursztynimidu **114**. Także w tym przypadku wolne reszty -SH, tym
razem na końcu 5', oligomeru **115** generowano po redukcji disiarczku ditiotreitolem.



Innym, prostszym podejściem²⁶ wydaje się być takie, w którym zastosowano tiolakton
N-acetylo-DL-homocysteiny (**116**), gdyż acylowanie grupy -NH₂ zachodzi z otwarciem
pierścienia tiolaktonu i wygenerowaniem wolnej reszty -SH.



Do zamiany grup funkcyjnych stosowano także¹¹⁸ reagenty acylujące, w których funkcja -SH chroniona jest grupą acetylową (**117**). Na drugim etapie usuwano grupę blokującą (hydroksyloamina) otrzymując sfunkcjonalizowany 5'-SH oligonukleotyd typu **118**.



Otrzymywanie oligomerów z wolnymi grupami tiolowymi wiąże się zawsze z pewnymi komplikacjami wynikającymi z łatwości utlenienia tych ugrupowań. Konieczne jest zapewnienie w środowisku reakcji warunków beztlenowych (próżnia, atmosfera obojętna, dodatek reduktorów do reakcji). Utrudnienie to w przypadku grup aminowych nie występuje.

8. PODSUMOWANIE

Przedstawiony powyżej przegląd metod modyfikacji oligonukleotydów jest oczywiście skrótowy i niekompletny*. Daje jednak pogląd na skalę zagadnienia i potrzeby laboratoriów, do których adresowane są te prace. Pomimo dostępu do całego spektrum związków modyfikujących oligonukleotydy, oferowanych przez wiele firm (m.in. Peninsula, Beckman, Milipore, Pharmacia, Applied Biosystems, Glen Research, MWG – Biotech, Biotronik), opracowywane są wciąż nowe protokoły funkcjonalizacji.

Spowodowane jest to różnymi niedogodnościami adaptacji opublikowanych metod, m.in.:

- wieloetapowe procedury wymagające oczyszczania produktów pośrednich,
- ściśle bezwodne warunki reakcji, wymagające profesjonalnego laboratorium chemicznego i doświadczonego personelu,
- trudno dostępne i/lub drogie odczynniki,
- konieczność syntezy czterech różnych podłoży stałych lub syntonów,
- niskie wydajności,
- brak elastyczności stosowanych metod – trudności modyfikacji.

Celowe jest więc podjęcie prób opracowania innych podejść, w których dotychczasowe niedogodności syntetyczne będą znacznie ograniczone lub wyeliminowane.

* Dokładniejsze opracowania są opublikowane w pracach przeglądowych Beaucage'a i Iyera^{152,153} oraz Korshuna i Berlina¹⁵⁴. Protokoły otrzymywania modyfikowanych oligonukleotydów można znaleźć np. w dwóch tomach z serii „Methods in Molecular Biology” pod redakcją S. Agrawala^{22,155}.

V. WYNIKI I DYSKUSJA

I. WSTĘP

Wśród dotychczas opisanych metod syntezy oligonukleotydowych sond molekularnych niosących grupy reporterowe o nieradioizotopowej detekcji, trudno jest wyróżnić taką, którą można by uznać za podejście uniwersalne, pozwalające na możliwie prostą, szybką, taną i wydajną syntezę produktów docelowych. Ocenę swoją opieram o być może nieco wygórowane kryteria, jednakże uważam, że tylko takie mogą przyczynić się do dalszego udoskonalania metod i w efekcie do coraz to bardziej uniwersalnych procedur otrzymywania nieradioizotopowych sond molekularnych.

Podejmując temat pracy doktorskiej przyjąłem następujące kryteria metodyczne i ekonomiczne jej realizacji:

- stosowane odczynniki powinny być proste, tanie i łatwo dostępne,
- metody syntezy powinny być nieskomplikowane, szybkie i łatwe w realizacji, bez angażowania unikalnego, specjalistycznego wyposażenia,
- stosowanie wielu różnych grup blokujących powinno być ograniczone lub wyeliminowane,
- w zależności od potrzeb możliwe powinno być wprowadzanie różnych znaczników nieradioizotopowych,
- metody modyfikacji oligonukleotydu powinny być tak dobrane, by można je przeprowadzić w sposób zautomatyzowany, z wykorzystaniem syntetyzera DNA.

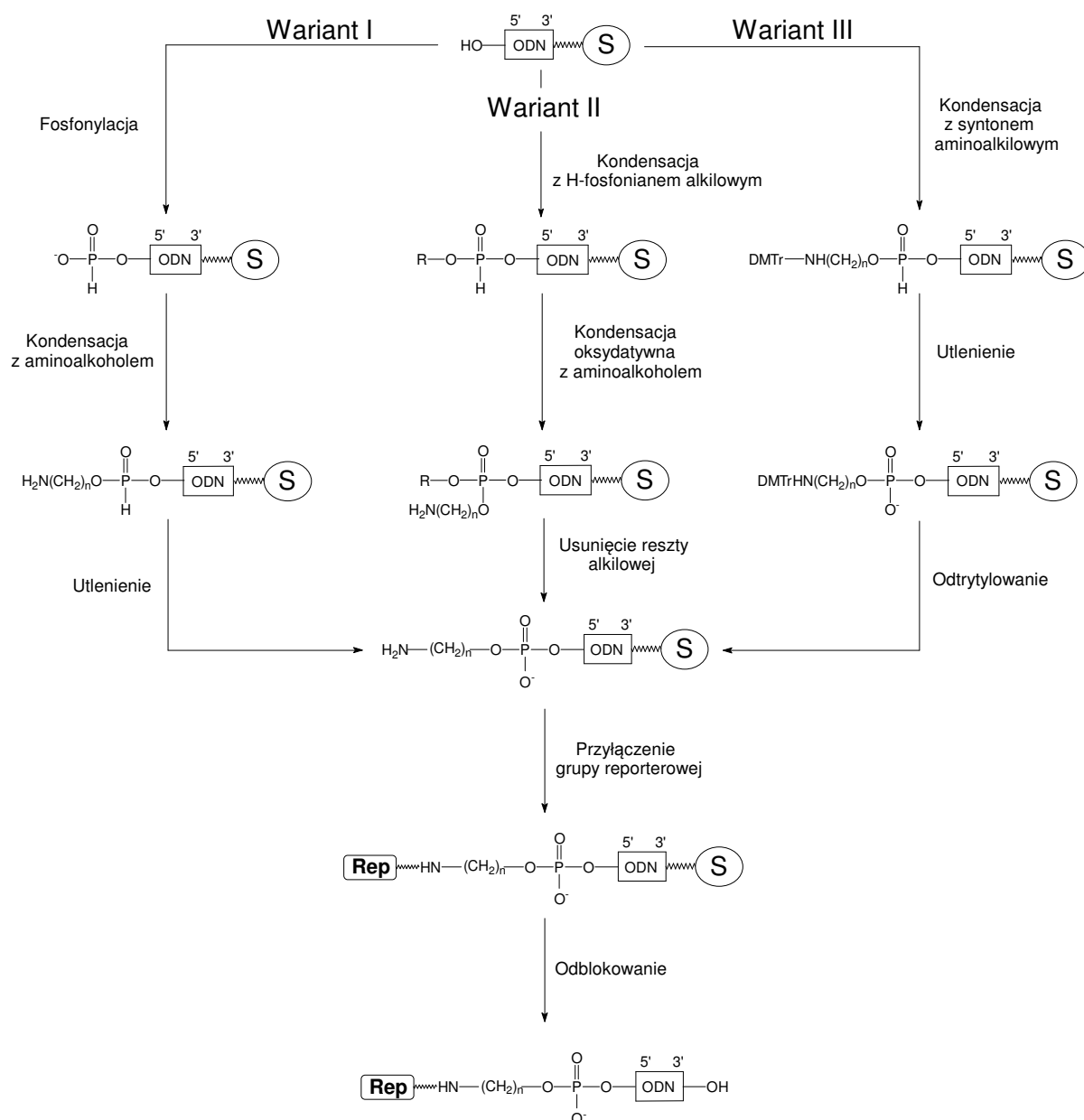
Powyższe kryteria doprowadziły do powstania koncepcji realizacji pracy według przedstawionego Schematu 16.

Ze względu na fakt, że metody realizacji poszczególnych etapów syntezy były jak dotąd nieznanne, koncepcja uwzględnia trzy warianty dochodzenia do docelowych modyfikowanych oligonukleotydów.

Wariant I to modyfikacja stopniowa, w którym oligomer z odsłoniętą resztą 5'-OH poddaje się działaniu kolejnych prostych reagentów, będących fragmentami ugrupowania modyfikującego oligomer.

Wariant II to wprowadzenie na koniec 5' oligomeru nienukleotydowego monoestru H-fosfonianowego i modyfikację tak otrzymanego ugrupowania diestrowego w drodze kondensacji oksydacyjnej.

Wariant III zakłada syntezę jednostki nienukleotydowej niosącej grupę funkcyjną (synton nienukleotydowy). Zastosowanie takiego podejścia pozwala na jednoetapową funkcjonalizację oligomeru.



SCHEMAT 16

We wszystkich przedstawionych podejściach etapem kluczowym jest dochodzenie do oligomeru niosącego na końcu 5' ugrupowanie aminoalkilowe z wolną grupą $-NH_2$, umożliwiającą przyłączenie wybranej grupy reporterowej. Jak już wcześniej wspomniano, metody modyfikacji czy syntezy komponentów jej służących, spełniające kryteria stawiane w tej pracy, nie były dotąd znane. Dlatego też w swojej pracy doktorskiej podjąłem badania nad opracowaniem nowych metod syntezy komponentów i nowych procedur modyfikacji oligonukleotydów.

Zgodnie z metodyką ogólnie przyjętą w chemii oligonukleotydów, na pierwszym etapie przeprowadziłem badania na związkach modelowych, a reakcje prowadziłem w roztworze. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowałem i zoptymalizowałem protokoły modyfikacji oligomerów na podłożu stałym.

2. BADANIA NAD FUNKCJONALIZACJĄ OLIGONUKLEOTYDÓW WEDŁUG WARIANTU I

A. Badania na związkach modelowych

Zgodnie z założeniami *Wariantu I* funkcjonalizacja oligonukleotydu związanego z podłożem ma być realizowana w dwóch etapach:

1. wprowadzenie na koniec 5' oligomeru reszty H-fosfonianowej,
2. funkcjonalizacja w reakcji reagenta binukleofilowego (np. aminoalkoholu) z 5'-końcowym H-fosfonianem oligonukleotydu.

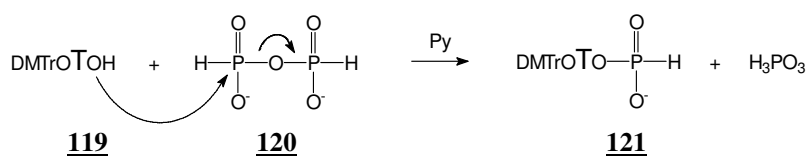
Według tego planu prowadziłem badania na możliwie najprostszym i najłatwiej dostępnym związku modelowym – 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidynie. Przedstawione wyniki opisują reakcje prowadzone na funkcji 3'-OH nukleozydu. Przyjąłem je jako reprezentatywne, gdyż nie obserwuje się istotnych różnic w reaktywności funkcji 3'- i 5'-OH deoksynukleozydów podczas fosfonylacji⁴⁶.

a) Fosfonylacja

Znanych jest kilka stosunkowo efektywnych metod fosfonylacji nukleozydów, jednakże każda z nich angażuje znaczne nadmiary czynników aktywujących (chlorki piwaloilu czy karbonyloadamantylu lub chlorofosforany), skutkiem czego w mieszaninach poreakcyjnych znajdowano znaczące ilości O-acylowanych produktów. Produkty te są wynikiem konkurencyjnych reakcji czynnika kondensującego z ligandem hydroksylowym. Reakcje te w znacznej mierze ograniczają bezpośrednią adaptację omawianych metod do celów stawianych w niniejszej rozprawie. Inną niekorzystną konsekwencją stosowania w sposób niekontrolowany nadmiarów chlorków acylowych do aktywacji kwasu fosforawego są reakcje dimeryzacji oligonukleotydów związanych z podłożem⁸⁷. Dlatego też w swojej pracy ograniczyłem się do opracowania nowych bądź modyfikacji już znanych metod, w których reakcje uboczne byłyby znacznie ograniczone lub całkowicie wyeliminowane.

(1) Kwas pirofosfonowy

Kwas pirofosfonowy (**120**) w pirydynie znany jest jako łagodny reagent wprowadzający resztę H-fosfonianową do nukleozydów¹¹⁹. Ponieważ reagent ten nie jest zbyt aktywny, stosowano kilkakrotne nadmiary molowe (5 ekw.) po to, by reakcję zakończyć w ciągu kilku godzin (Schemat 17).



SCHEMAT 17

Pomimo długiego czasu reakcji zdecydowałem się jednak podjąć prace nad kwasem pirofosfonowym jako czynnikiem fosfonylującym, gdyż reakcje fosfonylacji z jego użyciem zachodzą wyjątkowo czysto i bez produktów ubocznych. Reagent ten wykorzystywałem do syntezy H-fosfonianu 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-tymidyny **121**. W tym celu do roztworu kwasu pirofosfonowego w pirydynie (5 ekw.), otrzymanego w reakcji kwasu fosforowego i czynnika kondensującego (chlorek piwaloilu lub NEP-Cl), dodawałem roztwór 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-tymidyny **119** (1 ekw.) i pozostawiałem na noc. Analiza TLC i ^{31}P NMR nie wykazywała powstawania jakichkolwiek produktów ubocznych*. Czysty związek **121** izolowałem z wydajnością powyżej 80%.

Można się spodziewać, że adaptacja tego systemu do fosfonylacji oligonukleotydu związanego z podłożem stałym wymagać będzie użycia zdecydowanie wyższych nadmiarów reagenta. W takiej sytuacji zasady azotowe będą eksponowane na działanie dużych nadmiarów molowych czynnika fosfonylującego, co stwarza niebezpieczeństwo zachodzenia niepożądanych reakcji ubocznych, szczególnie na O-4 tyminy i O-6 guaniny. Podjąłem więc badania nad możliwością zachodzenia takich reakcji. Substratami były odpowiednio zablokowana deoksytymidyna [(5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo), 3'-O-benzolilo] i deoksyguanozyna [5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo), 3'-O-benzoilo, N²-izoburtrytylo], które traktowano 30-krotnym nadmiarem kwasu pirofosfonowego. Jako metodę analityczną zastosowałem ^{31}P NMR, gdyż w przypadku pojawienia się produktów O-fosfonylacji, spodziewane monoestry H-fosfonianowe, przy dużej czułości aparatu jakim dysponowałem, powinny być łatwe do wykrycia. W widmach ^{31}P NMR mieszanin pochodnych guanozyny i tymidyny traktowanych przez kilka dni (72 h) kwasem pirofosfonowym nie stwierdziłem powstawania potencjalnych produktów fosfonylacji.

Te wyniki oraz wcześniej opisane właściwości fosfonylujące kwasu pirofosfonowego w pirydynie były podstawą podjęcia dalszych badań, ale już na oligomerach przyłączonych do podłoża.

(2) Fosforyn difenylowy

Jednym z podstawowych wstępnych założeń przyjętych w realizacji tej części pracy było stosowanie reagentów lub systemów fosfonylujących nie angażujących nadmiarów czynników kondensujących. Kwas pirofosfonowy wydaje się spełniać te wymagania, jednakże stosunkowo niska reaktywność tego związku była powodem poszukiwania innego czynnika fosfonylującego o zdecydowanie wyższej reaktywności, podtrzymując jednocześnie wymóg nie stosowania nadmiarów lub całkowitego wykluczenia czynników kondensujących.

W badaniach nad transestryfikacją diestrów H-fosfonianowych (opisanych w dalszej części pracy) stwierdziłem, że w kontrolowanych warunkach H-fosfonianowe diestry arylovo – nukleozydowe bardzo łatwo ulegają chemoselektywnej transestryfikacji alkoholami do

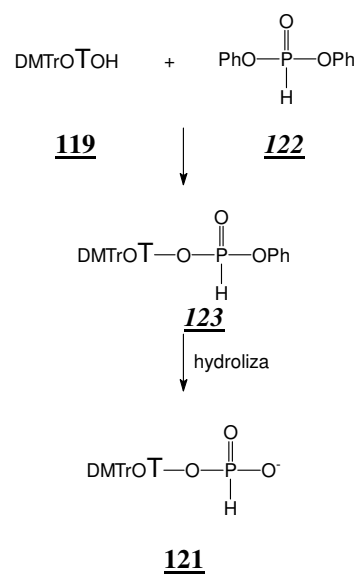
* Przesunięcia chemiczne i stałe sprzężeń ^{31}P NMR produktów pośrednich i końcowych zestawiono w Tabeli 13 (str. 127).

diestrów alkilowo – nukleozydowych. Te wyniki zachęciły mnie do podjęcia prac nad fosforynem difenylowym jako czynnikiem wprowadzającym resztę H-fosfonianową do nukleozydów. Reagent ten nie wymaga stosowania czynników kondensujących, gdyż aktywność centrum fosforowego uwarunkowana jest wyciągającymi elektrony podstawnikami aryłowymi. Czynnikiem potencjalnie limitującym zastosowania fosforynu difenylowego może być fakt, że produktem pierwszej reakcji transestryfikacji jest H-fosfonian alkilowo – aryłowy, który może ulegać dalszej reakcji transestryfikacji nadmiarem alkoholu, prowadząc do H-fosfonianu dialkilowego.

Podjąłem więc prace nad zastosowaniem fosforynu difenylowego do fosfonylacji nukleozydów, których celem było określenie czynników warunkujących szybkość i chemoselektywność reakcji fosfonylacji nukleozydów i dalszych reakcji prowadzących do H-fosfonianów nukleozydów jako produktów docelowych (Schemat 18).

W pierwszej kolejności badałem proces chemoselektywności fosfonylacji w zależności od stosunków molowych substratów tj. 3'-OH nukleozydu i fosforynu difenylowego. Reakcje prowadzone były w pirydynie przy stałym stężeniu nukleozydu (1 mmol/10 ml roztworu) a jako metodę analityczną stosowałem ponownie ^{31}P

NMR (monitorowanie produktów zawierających atom fosforu) i TLC (monitorowanie substratu nukleozydowego i nukleotydu produktu fosfonylacji). Zgodnie z oczekiwaniami, chemoselektywność reakcji silnie zależała od nadmiaru zastosowanego fosforynu difenylowego. I tak, użycie 0,5 ekw. fosforynu prowadziło do powstawania na pierwszym etapie H-fosfonianowego diestru fenylowo – nukleozydowego, który ulegał dalszej transestryfikacji nadmiarem nukleozydu, tworząc wolno (12 godzin) symetryczny H-fosfonian 3'-3' dinukleozydowy jako jedyny produkt obserwowany w mieszaninie reakcyjnej. Zastosowanie kolejno 1, 3 i 5 ekw. czynnika fosfonylującego zasadniczo zmieniło rozkład produktów, gdyż po wyczerpaniu nukleozydu obserwowano w mieszaninach poreakcyjnych odpowiednio 21%, 4% i 0% 3'-3' symetrycznego związku. W ostatnim przypadku pożądany diester fenylowo – nukleozydowy był jedynym wykrywalnym produktem nukleotydu. Reakcje zachodziły szybko i były zakończone w czasie zaledwie kilku minut (5 – 10 min. w zależności od nadmiaru czynnika fosfonylującego). Prowadzona w następnym etapie hydroliza wiązania arylofosforoestrowego w otrzymanych H-fosfonianach aryloowo – nukleozydowych zachodziła także szybko (5 min.) i z całkowitą chemoselektywnością. Produkty fosfonylacji – H-fosfoniany nukleozydów (zarówno serii rybo- i deoksyrybo-) izolowano z wydajnościami powyżej 90%. Powyższe prace doprowadziły do nowej, szybkiej i wydajnej metody otrzymywania H-fosfonianów



SCHEMAT 18

nukleozydów, nie wymagającej stosowania czynników kondensujących, a wykorzystującej wyjątkową łatwość transestryfikacji arylowych diestrów H-fosfonianów.

Ze względów opisanych wcześniej, także i w tym przypadku całkowicie zablokowane nukleozydy poddano działaniu 30-krotnego nadmiaru molowego fosforynu difenyłowego. Monitorowanie tak przygotowanej mieszaniny metodą ^{31}P NMR nie wykazało powstawania potencjalnych produktów reakcji czynnika fosfonylującego z zasadami azotowymi.

Fosforyn difenyłowy w porównaniu z kwasem pirofosfonowym okazał się równie skutecznym i jednocześnie o wiele szybciej działającym czynnikiem fosfonylującym. Fakt, że reagent ten na pierwszym etapie fosfonylacji tworzy H-fosfonianowe diestry alkilowo – aryłowe, w sprzyjających warunkach zdolne do dalszych transestryfikacji z nieprzereagowanym ligandem hydroksylowym, zmusza do bardzo ostrożnej weryfikacji jego stosowania do fosfonylacji oligonukleotydów związanych z podłożem stałym. Dopiero wyniki tych doświadczeń pozwolą na ocenę przydatności fosforynu difenyłowego jako reagenta wprowadzającego resztę H-fosfonianową na koniec 5'-oligonukleotydu.

b) Reakcje H-fosfonianów nukleozydów z reagentami bifunkcyjnymi.

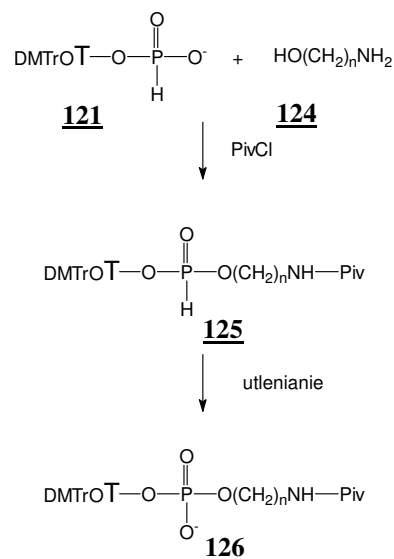
Następny etap prac nad realizacją *Wariantu I* to badania nad funkcjonalizacją 5'-końcowej reszty H-fosfonianowej. Terminem funkcjonalizacja określam wprowadzenie na resztę wodorofosforynową ugrupowania niosącego grupę funkcyjną zdolną do przyłączania grup reporterowych lub umożliwiającą dalsze modyfikacje. Wstępne badania ujawniły, że reakcje H-fosfonianów nukleozydów z niechronionymi reagentami binukleofilowymi zależą od wielu czynników i w zależności od warunków mogą prowadzić do różnych, często niespodziewanych produktów. Ograniczyłem więc studia metodyczne do dwóch typów reagentów binukleofilowych – aminoalkoholi i dioli. Wyboru tego dokonałem po to, by możliwie najlepiej poznać uwarunkowania pozwalające na kontrolowany przebieg reakcji i by móc ukierunkować je na otrzymywanie pożądaných produktów.

(1) Reakcje H-fosfonianów nukleozydów z aminoalkoholami

Aminoalkohole zawierają dwie różnego typu grupy funkcyjne. Podstawowy cel tego etapu prac to badania nad poszukiwaniem warunków i reagentów, które pozwoliłyby otrzymywać pochodne nukleotydu z wolnymi grupami aminoalkilowymi lub hydroksyalkilowymi. Pierwszy typ produktów (z wolnymi grupami aminowymi) wydaje się być bardziej użyteczny w realizacji *Wariantu I* syntezy sond molekularnych, gdyż wolna grupa aminowa jest doskonałym ligandem dla większości dostępnych handlowo pochodnych (izotiocyjaniany, aktywne estry karboksylowe) potencjalnych grup reporterowych (fluoresceina, rodamina, biotyna). Tak więc w tej części pracy przedstawione są wyniki badań zmierzających do H-fosfonianów aminoalkilowo – nukleozydowych.

(a) Kondensacja wobec chlorku piwaloilu

W reakcji 3'-H-fosfonianu 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-tymidyny **121** z aminoalkoholami **124a**, **b**, **e*** w warunkach standardowych [aktywacja nukleotydu chlorkiem piwaloilu (2,5 ekw.) w obecności aminoalkoholu (1,1 ekw.) w pirydynie]¹²⁰ powstają produkty, dające w ³¹P NMR sygnały charakterystyczne dla H-fosfonianowych diestrów alkilowych. Reakcja jest szybka, czysta i chemoselektywna (nie stwierdzono obecności związków z wiązaniem P-N). Próby izolacji produktów reakcji zakończyły się jednak niepowodzeniem ze względu na ich nietrwałość podczas przerobu i chromatografii. W celu ich identyfikacji utleniłem je (3% roztwór jodu w pirydynie zawierającej 10% wody) i oczyściłem za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Analiza widma ¹H-NMR i MS potwierdziła, że są to fosforany nukleozydowo – aminoalkilowe. Ponadto okazało się, że funkcja aminowa tych związków jest acylowana grupą piwaloilową. Acylowanie zachodzić może w różnych fazach reakcji, nie podjąłem jednak badań mających na celu dokładne przebadanie tego procesu, gdyż niezależnie od momentu, w którym następuje acylowanie, otrzymuje się produkty typu **125**, których dalsze aplikacje są raczej ograniczone ze względu na dużą trwałość wiązania karbamidowego. Przebieg powyższych reakcji przedstawiony jest na Schemacie 19.



SCHEMAT 19

(b) Kondensacja z preaktywacją H-fosfonianu

Aby zapobiec reakcji acylacji grupy aminowej podczas otrzymywania H-fosfonianowych diestrów nukleozydowo – aminoalkilowych próbowałem zastosować podejście z preaktywacją monoestru **121**. W ten sposób istotnie zmniejsza się nadmiar nieprzereagowanego chlorku piwaloilu podczas kondensacji z aminoalkoholem.

H-Fosfonian **121** w pirydynie poddałem działaniu 2,5 ekw. chlorku piwaloilu generując fosforyn nukleozydowo – dipiwaloilowy **127**, który następnie traktowałem aminoalkoholami **124a** – **e** (Schemat 20).

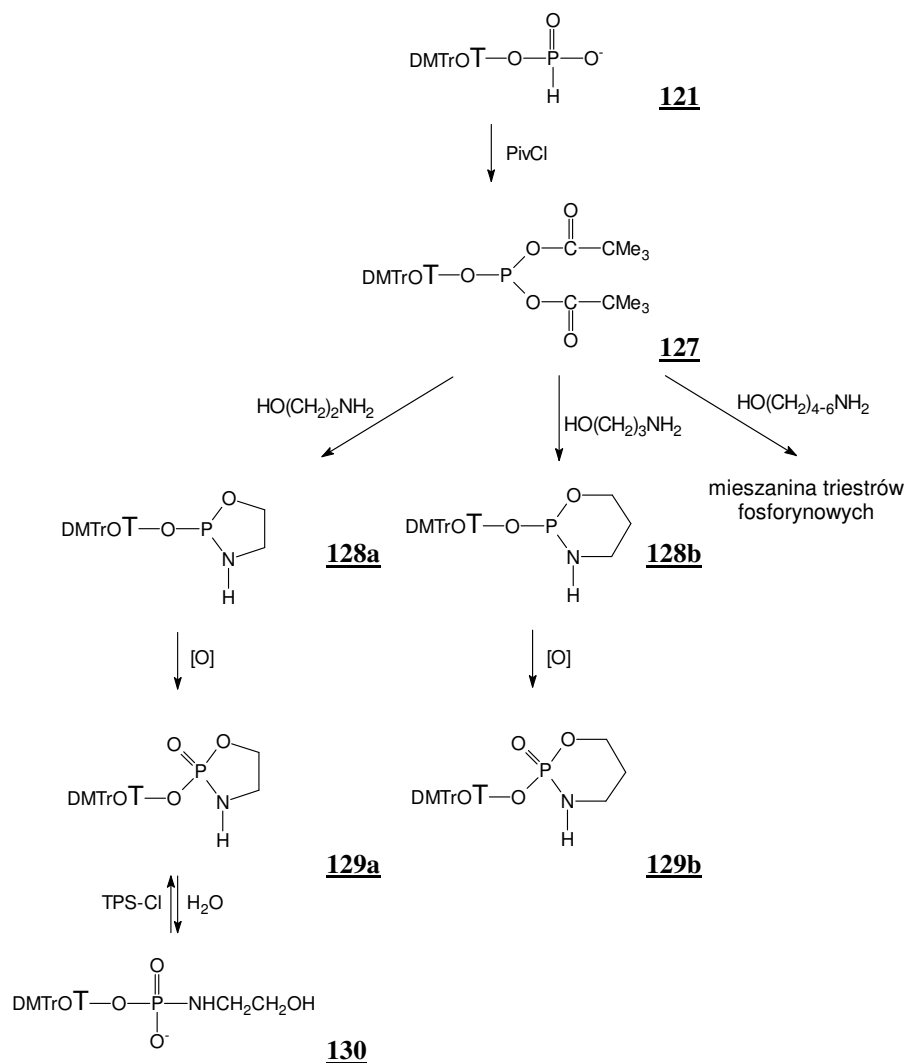
Mając na uwadze na mnogość centr reaktywnych w preaktywowanym nukleotydzie typu **127** i aminoalkoholu oraz liczbę kombinacji z tym związanych, można się spodziewać

* Litery przy numerach związków oznaczają długość łańcucha polimetylenowego, odpowiednio:

„a”: n=2; „b”: n=3; „c”: n=4; „d”: n=5; „e”: n=6

Jedynie litera „f” oznacza łańcuch etoksyetylowy -(CH₂)₂O(CH₂)₂-

powstawania wielu produktów reakcji. Analizując mieszaniny reakcyjne metodą ^{31}P NMR można było zauważyć, że charakter i dystrybucja produktów zależy od rodzaju użytego aminoalkoholu.



Tak więc, fosforyn nukleozydu **127** w reakcji z aminoetanolem (**124a**) prowadził do produktu rezonującego przy ok. 138 ppm. Sądząc z położenia sygnału oraz jego multipletowości można postulować, że jest to cykliczny amidofosforyn nukleozydu typu **128a**. Powstawanie takiego produktu jest możliwe w sekwencji reakcji, w których na pierwszym etapie następuje atak nukleofilowy na centrum fosforowe z odejściem jednej reszty piwaloilowej i z wytworzeniem liniowego estru, 2-aminoetylofosforynu lub też N-(2-hydroksyetylo)-amidofosforynu nukleozydowo – piwaloilowego. Na następnym etapie wciąż aktywowane (grupą piwaloilową) centrum fosforowe atakowane jest wewnątrzcząsteczkowo przez nukleofil (-OH lub -NH₂) z pozycji β, co prowadzi do zamknięcia pierścienia, z wytworzeniem cyklicznego amidofosforynu nukleozydu **128a**. Mimo podjętych prób, ze względu na

szybkość zachodzących reakcji, nie udało mi się ustalić, który nukleofil (-OH czy -NH₂) atakuje centrum fosforowe jako pierwszy.

Próby izolacji fosfolidyny **128a** nie powiodły się, gdyż w trakcie przerobu związek ten był nietrwały i rozkładał się niespecyficznym do kilku produktów. Spodziewając się, że analog fosforanowy będzie trwalszy, podjąłem próbę utlenienia związku **128a** jodem wobec niewielkiego (15 ekw.), ale koniecznego nadmiaru wody. W tych warunkach powstawał jeden produkt rezonujący przy 8,2 ppm. Został on wyizolowany i na podstawie analiz ¹H, ³¹P NMR i MS jego struktura została określona jako N-(2-hydroksyetylo)amidofosforan nukleozydu **130**. Można przyjąć, że otrzymany związek **130** jest produktem hydrolizy cyklicznego amidofosforanu **129a**. Jeżeli jest tak faktycznie, to jest to produkt niespodziewany, gdyż na podstawie wcześniej opisanych prac nad hydrolizą w warunkach zasadowych analogicznych pięcioczłonowych układów heterocyklicznych (pochodne N-alkilowe i N-fenylowe)¹²¹ należało oczekiwać otwierania pierścienia z rozerwaniem wiązania P-N, z wytworzeniem fosforodiestru nukleozydowo – aminoalkilowego.

Ponieważ w trakcie utleniania, ze względu na szybkość procesu, nie rejestrowałem domniemanego cyklicznego amidofosforanu **129a**, wygenerowałem go, aktywując oczyszczony produkt **130** chlorkiem arylosulfonowym (TPS-Cl). W tej reakcji, zachodzącej szybko (< 3 min.) i czysto, powstawał jeden produkt – cykliczny amidofosforan nukleozydu **129a**. Mimo, że związek ten nie został wyizolowany, to jego przesunięcie chemiczne (³¹P NMR) i multipletowość sygnałów w widmie sprzężonym mocno sugerują proponowaną strukturę. Dodanie wody do mieszaniny reakcyjnej powoduje natychmiastową hydrolizę **129a** do wyjściowego N-(2-hydroksyetylo)amidofosforanu nukleozydu **130**. To doświadczenie można traktować jako pozytywną weryfikację wcześniej postulowanego szeregu reakcji utleniania cyklicznego amidofosforynu nukleozydu **128a** do cyklicznego amidofosforanu **129a** i dalej w łagodnych warunkach zasadowych jego hydrolizę do finalnego produktu **130**.

Na tym etapie prac nie potrafię wyjaśnić różnic w chemoselektywności otwierania powyżej opisanych pierścieni heterocyklicznych, gdyż ilość danych doświadczalnych, którymi dysponuję jest zbyt skąpa. W czasie realizacji tej rozprawy takich prób nie podjąłem, jednakże sądzę, że zastosowanie N-alkilo- lub N-aryloaminoetanoli w analogicznych reakcjach mogłoby dostarczyć danych, które pozwoliłyby lepiej poznać i zdefiniować czynniki decydujące o chemoselektywności hydrolizy w warunkach zasadowych omawianych związków.

3-Aminopropan-1-ol (**124b**) na pierwszych etapach reakcji reaguje z dipiwaloilofosforem nukleozydu **127** podobnie jak 2-aminoetanol, tworząc cykliczny amidofosforyn nukleozydu **128b** (³¹P NMR). Reakcja cyklizacji zachodzi bardzo łatwo a jej siłą napędową jest tendencja do wewnątrzcząsteczkowego ataku nukleofila (-OH lub -NH₂) z pozycji γ na centrum fosforowe. Utlenianie **128b** w obecności 15 ekw. H₂O prowadzi do trwałego cyklicznego amidofosforanu nukleozydu **129b** – 2-[5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-tymidyn-3'-yloksy]-2-okso-1,3,2-oksazaperhydrofosforinu, który wyizolowano i scharakteryzowano metodami spektroskopowymi (¹H, ³¹P NMR i HRMS). Mając na uwadze fakt, że reakcje

cyklizacji i utleniania zachodzą szybko i wydajnie, a cykliczny amidofosforan nukleozydu **129b** jest związkiem trwałym, można traktować powyższy cykl reakcji jako dogodną metodę syntezy pochodnych nukleotydów typu **129b**.

Wyższe aminoalkohole **124c – e** w reakcji z fosforem **127** prowadziły do mieszaniny wielu produktów, których nie izolowano ze względu na ich nietrwałość. Jest bardzo prawdopodobne, że w tych przypadkach otrzymuje się różnego typu (estry lub/i amidy) i różnie podstawione (mono i bis) fosforyny nukleotydów co może być konsekwencją mnogości centr aktywnych substratów. W odróżnieniu od 2-aminoetanolu i 3-aminopropan-1-olu, wyższe homologi nie tworzą struktur cyklicznych typu **128**, które w pierwszych dwóch przypadkach decydowały o kierunku dalszych reakcji.

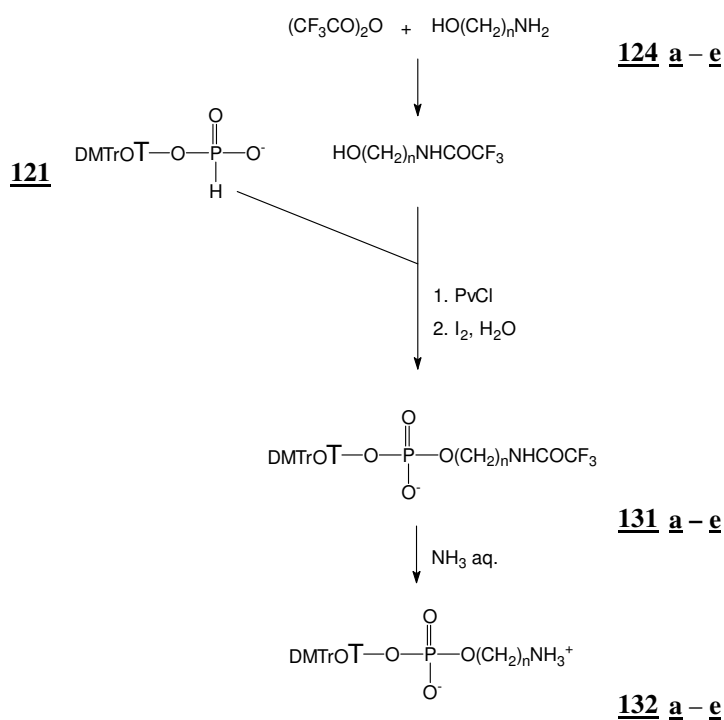
(c) *Kondensacja z preacylacją aminoalkoholi*

Opisane powyżej podejścia nie doprowadziły do pożądanych diestrów nukleozydowo – aminoalkilowych z wolną funkcją aminową. Rozwiązaniem tego problemu może być zastosowanie aminoalkoholu z resztą aminową chronioną zasadowo labilną grupą ochronną.

W celu weryfikacji poprawności tych założeń, 2-aminoetanol **124a** traktowałem równomolową ilością bezwodnika trifluorooctowego (TFAA) w pirydynie. Otrzymałem mieszaninę wykorzystałem bezpośrednio do kondensacji z monoesetrem H-fosfonianowym **121** wobec chlorku piwaloilu. Po utlenieniu w standardowych warunkach otrzymałem fosforan **131a** (^{31}P NMR). Grupę trifluoroacetylową

usunąłem poprzez traktowanie stężonym roztworem amoniaku (Schemat 21). Analogiczne reakcje doprowadziły do otrzymania diestrów fosforanowych również dla innych aminoalkoholi (związki **131b – e**). Po zakończeniu cyklu reakcji pożądane produkty izolowałem za pomocą chromatografii na żelu krzemionkowym z wydajnościami powyżej 80%.

Podejście z preacylacją aminoalkoholu można traktować jako uniwersalną metodę syntezy aminoalkilofosforanów nukleotydów typu **132**, jednakże konieczność stosowania amoniaku w celu odsłonięcia funkcji $-\text{NH}_2$ na ostatnim etapie syntezy znacznie ogranicza wykorzystanie tego podejścia do funkcjonalizacji oligonukleotydów związanych z podłożem



SCHEMAT 21

stałym. Wiąże się to z faktem, że podczas usuwania grupy trójfluorooctowej ugrupowanie karboksyloestrowe wiążące oligomer z podłożem także ulega amonolizie z uwolnieniem sfunkcjonalizowanego oligonukleotydu do roztworu. W konsekwencji, w tym podejściu, przy stosowaniu powszechnie używanych podłoży stałych, realizacja ostatniego etapu *Wariantu I* (przyłączenie grupy reporterowej do oligonukleotydu zakotwiczonego do podłoża) nie jest możliwa.

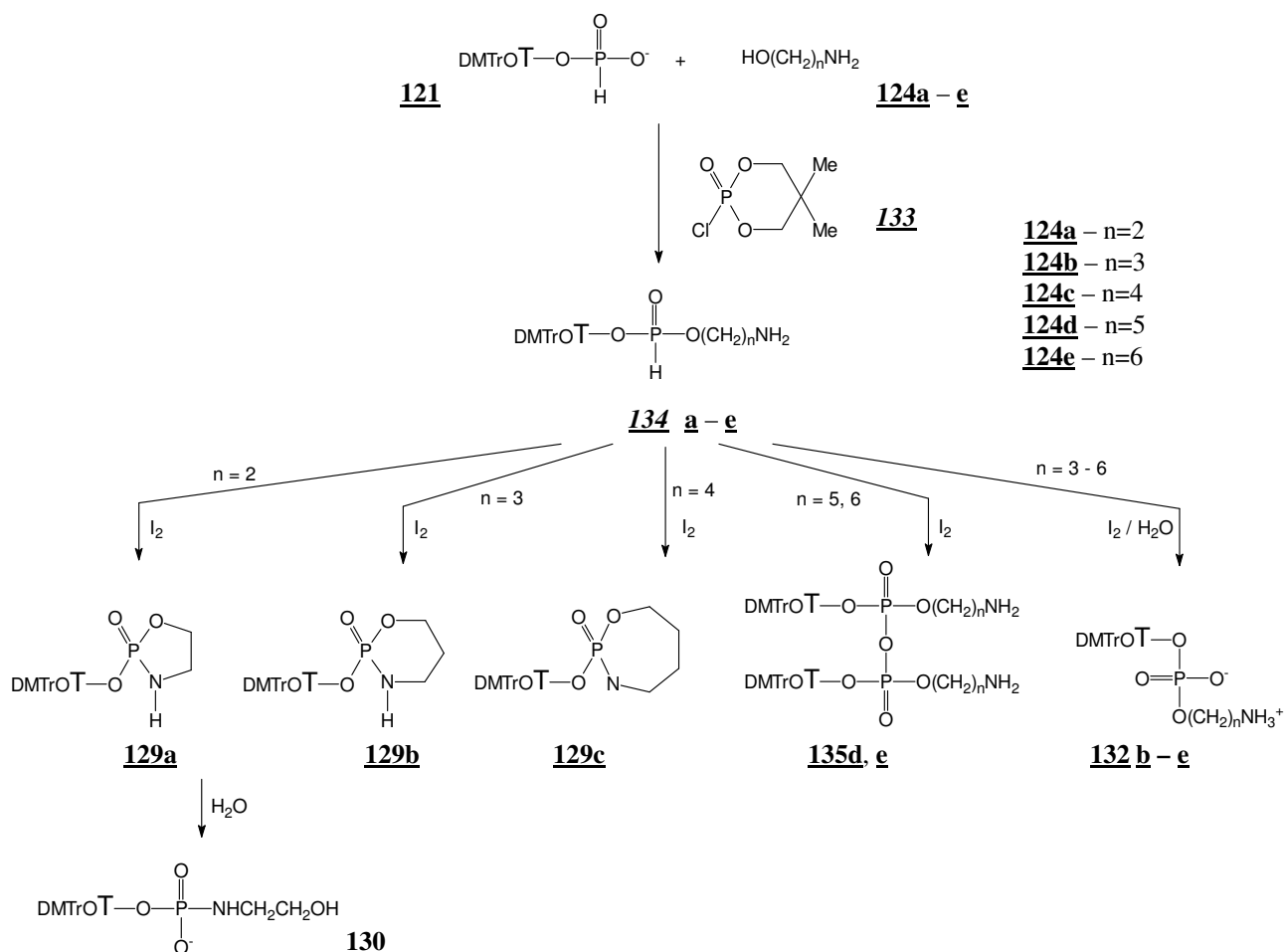
(d) *Kondensacja wobec 2-chloro-5,5-dimetylo-2-okso-2λ⁵-1,3,2-dioksafofinanu (NEP-Cl)*

Wyniki otrzymane z użyciem chlorku piwaloilu aktywującego H-fosfoniany nukleozydów w reakcji sprzęgania z aminoalkoholami wskazują, że tego typu czynnik kondensujący nie może być stosowany ze względu na równoległe bądź następcze acylowanie funkcji aminowej reszty aminoalkilowej. Dlatego też podjąłem próby otrzymywania aminoalkilofosforanów nukleozydów z użyciem innego typu czynników kondensujących. Dobrym kandydatem do reakcji sprzęgania H-fosfonianów nukleozydów i aminoalkoholi wydawał się być cykliczny chlorofosforan **133** (NEP-Cl)¹²². Związek ten jest mało aktywny w reakcjach fosforylacji (np. alkoholi), natomiast jest stosunkowo efektywny jako aktywator monoestrów H-fosfonianowych w reakcjach kondensacji¹²³.

Reakcje H-fosfonianu nukleozydu **121** i aminoalkoholi **124a** – **e** wobec NEP-Cl prowadziły do aminoalkilo-H-fosfonianów nukleozydów typu **134** (Schemat 22). Monitorowanie reakcji za pomocą spektroskopii ³¹P NMR pozwoliło stwierdzić, że reakcje te zachodzą szybko (<3 min.) i z całkowitą chemoselektywnością, gdyż bez względu na rodzaj użytego aminoalkoholu, jedynymi nukleotydowymi produktami reakcji były H-fosfoniany aminoalkilowo – nukleozydowe typu **134**. Próby izolacji tych produktów nie powiodły się, gdyż w czasie przerobu i izolacji diestru typu **134** okazały się niedostatecznie trwałe. Związki te utleniałem oczekując, że ich fosforanowe analogi będzie można wyizolować i w pełni scharakteryzować

Utlenianie H-fosfonianodiestru **134a** jodem wobec dużego nadmiaru wody (300 ekw.) prowadziło do otrzymania produktu, którego przesunięcie chemiczne w widmie ³¹P NMR było identyczne z otrzymanym wcześniej N-(2-hydroksyetylo)amidofosforanem nukleozydu **130**. Identyczność otrzymanego produktu ze związkiem **130** została potwierdzona także innymi metodami analitycznymi (¹H NMR, TLC, testy chemiczne – reakcja z TPS-Cl – odtworzenie cyklicznego amidofosforanu). Można przypuszczać, że związek ten jest końcowym produktem cyklu reakcji zapoczątkowanym wytworzeniem jodofosforanu jako pierwszego produktu utleniania diestru H-fosfonianowego **134**. Po to, by wyjaśnić tę sprawę, przeprowadziłem utlenianie diestru **134** w warunkach bezwodnych. Jedynym produktem obserwowanym w widmie ³¹P NMR był poznany już wcześniej cykliczny amidofosforan **129a**. Dodanie wody do mieszaniny reakcyjnej powodowało szybką hydrolizę **129a** do trwałego amidofosforanu nukleozydu **130** jako jedyne produktu. Tak więc, reakcja wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji do produktu pośredniego **129a** zachodzi z chwilą

powstania jodofosforanu na pierwszym etapie utleniania bez względu na nadmiar konkurencyjnego nukleofila (H_2O), a finalny produkt **130** jest produktem następczej, chemoselektywnej reakcji hydrolizy amidofosforanu nukleozydu **129a**.



SCHEMAT 22

Typ produktów utleniania jodem 3-aminopropyl-H-fosfonianu nukleozydu **134b** zależał od ilości wody obecnej w medium reakcyjnym. I tak, utlenianie **134b** w warunkach bezwodnych prowadziło ilościowo do trwałego cyklicznego amidofosforanu nukleozydu **129b**. Reakcja ta zachodzi wyjątkowo czysto i można ją polecać jako dogodną metodę szybkiej syntezy cyklicznych pochodnych nukleotydów typu **129b** z H-fosfonianów nukleotydów typu **121** jako łatwo dostępnych substratów. Utlenianie **134b** wobec niewielkiego nadmiaru wody prowadziło do powstawania dwóch produktów – opisanego wcześniej cyklicznego amidofosforanu **129b** oraz symetrycznego pirofosforanu **135b**. Z dużą dozą pewności można postulować, że ten ostatni związek powstaje w reakcji niezhydrolizowanego jodofosforanu (pierwszego produktu utlenienia) z produktem już zhydrolizowanym tj. **132b**. Dodatkowym potwierdzeniem takiego rozumowania było doświadczenie, w którym utleniano diester H-fosfonianowy **134b** w bezwodnych warunkach

wobec fosforodiestru **132b**. Jedynym produktem w tej reakcji był stosunkowo trwały pirofosforan **135b**.

Stosunek cyklicznego produktu **129b** i pirofosforanu **135b** zmieniał się w zależności od ilości wprowadzanej wody w czasie utleniania, przy czym wobec większych nadmiarów H₂O zaczął się pojawiać pożądaný fosforodiester **132b**. Jeżeli reakcję utleniania **134b** przeprowadzano przy dużych nadmiarach (300 ekw.) wody, to 3-aminopropylofosforodiester nukleozydu **132b** był jedynym otrzymanym produktem. Tak więc nadmiar wody jako zewnętrznego nukleofila całkowicie zapobiega zachodzeniu konkurencyjnych reakcji cyklizacji czy dimeryzacji. Po izolacji, strukturę produktu **132b** ustalono rutynowymi metodami spektralnymi (¹H, ³¹P NMR, HRMS) i chromatograficznymi (TLC).

H-Fosfonianodiester **134c** z grupą 4-aminobutyłową, utleniany w warunkach bezwodnych także tworzył siedmioczłonowy cykliczny amidofosforan nukleozydu **129c**. Manipulowanie ilością wody podczas utleniania pozwoliło, podobnie jak w przypadku pochodnej 3-aminopropylowej **134b**, wykluczyć cyklizację czy dimeryzację i w konsekwencji pożądaný produkt finalny **132c** był otrzymany z wysoką wydajnością.

W przypadku pochodnych wyższych homologów aminoalkoholi podczas utleniania nie obserwowano powstawania struktur cyklicznych, a odpowiednie nadmiary wody pozwoliły na ukierunkowanie reakcji na tworzenie wyłącznie aminoalkilofosforanoamidów nukleozydów **132d – e**.

Opisane procedury można traktować jako uniwersalną metodę syntezy aminoalkilowych fosforanów nukleozydów typu **132**. Wyjątek stanowią pochodne 2-aminoetyłowe, w których w przypadku aktywacji centrum fosforowego (tworzenie jodofosforanów) tendencja do wewnątrzcząsteczkowej substytucji jest tak silna, że pomimo stosowania dużych nadmiarów zewnętrznego nukleofila nie udało się zapobiegać cyklizacji.

Opracowana metoda, angażująca proste substraty i procedury spełnia kryteria funkcjonalizacji oligonukleotydów wg *Wariantu I*, a jej efektywność będzie weryfikowana (w dalszej części rozprawy) na oligonukleotydach związanych z podłożem stałym.

(2) Reakcje H-fosfonianów nukleozydów z diolami

W reakcjach H-fosfonianów nukleozydów z aminoalkoholami, w zależności od warunków i sposobu przeprowadzenia reakcji oraz rodzaju stosowanych czynników kondensujących, obok pożądaných aminoalkilo-H-fosfonianów nukleozydów można otrzymać szereg interesujących analogów nukleotydu. Wydawać się może, że podobne reakcje z diolami, ze względu na równoważność obu centr nukleofilowych, powinny zredukować liczbę potencjalnie możliwych produktów. Podejmując badania nad reakcjami dioli z H-fosfonianami nukleozydów spodziewałem się opracowania metod syntezy hydroksyalkilo-H-fosfonianów, które to ugrupowania mogą służyć np. jako podstawowy element szkieletu łącznika, regulujący dystans między oligonukleotydem a grupą reporterową.

(a) Kondensacja standardowa wobec chlorku piwaloilu

W warunkach standardowych kondensacje H-fosfonianu nukleozydu **121** z diolami **136a** – **d** wobec chlorku piwaloilu prowadziły do złożonych mieszanin diestrów H-fosfonianowych, a w przypadku glikolu etylenowego pojawiał się dodatkowy produkt (~ 23 ppm), który mógł być produktem cyklizacji diestru typu **141** do cyklicznego fosfolanu **143a** (Schemat 24). Obecność kilku produktów związana jest prawdopodobnie z następczymi reakcjami dimeryzacji, a także O-acylowania nadmiarem czynnika kondensującego. Ze względu na niedostateczną trwałość nie udało się wyizolować powstałych produktów i potwierdzić ich przypuszczalnej struktury. Jednakże informacje uzyskane z tych eksperymentów, a w szczególności powstawanie domniemanego fosfolanu **143a** zachęciły mnie do podjęcia bardziej szczegółowych badań, które powinny pozwolić lepiej poznać właściwości hydroksyalkilo-H-fosfonianów nukleozydów typu **141** jako pierwszych produktów kondensacji i ocenić ich potencjalne zastosowania w syntezie oligonukleotydowych sond molekularnych.

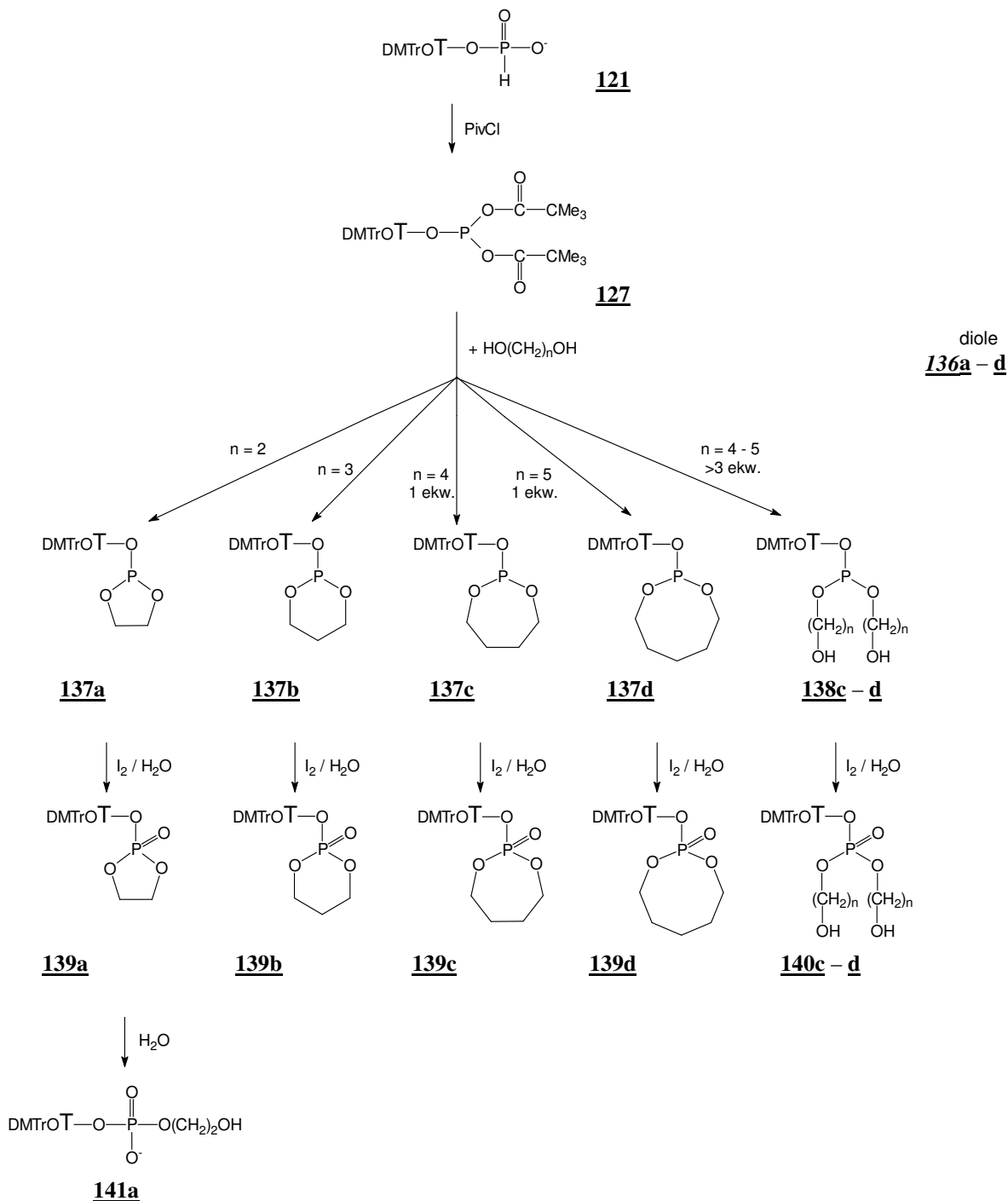
136a – n=2
136b – n=3
136c – n=4
136d – n=5

(b) Kondensacja z preaktywacją H-fosfonianu

Bis-piwaloilofosforyn nukleozydu **127**, generowany podczas preaktywacji H-fosfonianu **121**, wydaje się być dobrym substratem do badań nad potencjalnie możliwymi reakcjami cyklizacji z diolami, gdyż na pierwszym etapie powinien tworzyć się diester acylofosforynowy, który następnie może ulegać reakcji wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, z podstawieniem drugiej grupy piwaloilowej. Jak można było się spodziewać, reakcje mieszanego bezwodnika bis-piwaloilowego typu **127** z diolami **136a** – **d** prowadziły do cyklicznych fosforynów nukleozydów typu **137** (Schemat 23), jednakże ich wydajność zależała od długości mostka polimetylenowego diolu i jego nadmiaru molowego.

I tak, glikol etylenowy (**136a**) i propanodiol-1,3 (**136b**) bez względu na nadmiar molowy, w reakcji z bis-acylofosforynem **127** tworzyły produkty cykliczne, odpowiednio 2-[5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-tymidyn-3'-yloksy]-1,3,2-dioksafosfolan (**137a**) i 2-[5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-tymidyn-3'-yloksy]-1,3,2-dioksafosfinan (**137b**). Diole **136c** i **136d** dodane w niewielkim (1,5 ekw.) nadmiarze do związku **127** także tworzyły cykliczne fosforyny nukleozydu 2-[5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-tymidyn-3'-yloksy]-1,3,2-dioksafosfepan (**137c**) i 2-[5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-tymidyn-3'-yloksy]-1,3,2-dioksafosfokan (**137d**) jako główne produkty. Zwiększanie nadmiaru dioli **136c** i **136d** prowadziło do powstawania liniowych di(hydroksyalkilowych) fosforynów nukleozydów **138c** i **138d**, które przy nadmiarze powyżej 3 ekw. były głównymi produktami reakcji. Z tych doświadczeń można wnioskować, że w przypadku dioli **136a** i **136b**, tendencja do tworzenia pierścieni pięcio- lub sześcioczłonowych jest tak silna, że bez względu na nadmiar diolu, cykliczne fosforyny **137a** i **137b** są jedynymi produktami. W przypadku dioli **136c** i **136d** reakcje cyklizacji zachodzą jedynie w sprzyjających warunkach i konkurują z produktami międzycząsteczkowej substytucji prowadzącej do liniowych triestrów fosforawych **138c** i **138d**.

Próby oczyszczania produktów cyklicznych **137b** – **d** nie powiodły się, gdyż były one



SCHEMAT 23

nietrwałe w warunkach izolacji. Cykliczny fosforyn nukleozydu **137a** okazał się natomiast dostatecznie trwały i po izolacji został scharakteryzowany metodami spektralnymi (^1H oraz ^{31}P NMR).

Utlenianie cyklicznych fosforynów **137b** – **d** jodem wobec wody prowadziło do otrzymania trwałych cyklicznych fosforanów **139b** – **d**, które wyizolowano, a ich struktury

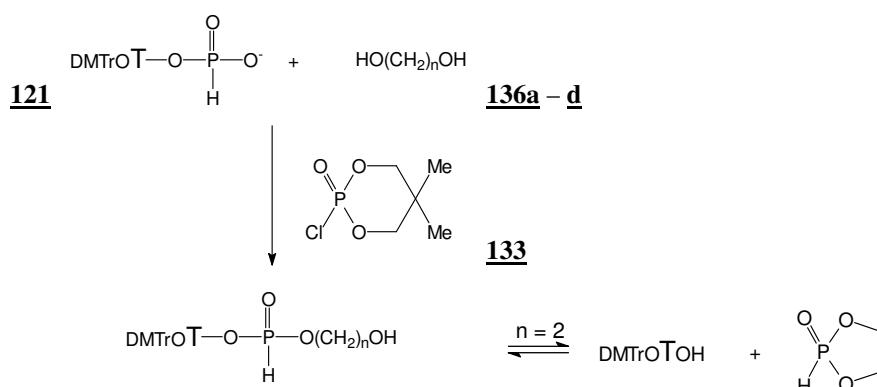
potwierdzono metodami spektralnymi. W tych samych warunkach produktem utleniania fosfolanu **137a** był fosforan 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-tymidyn-3'-ylowo – 2-hydroksyetylowy **141a**, który jak można przypuszczać, był produktem hydrolizy powstałego na pierwszym etapie cyklicznego fosfortriestru **139a** {2-[5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-tymidyn-3'-yloksy]-2-okso-1,3,2-dioksafosfolanu}. Taki sposób powstawania fosfordiestru **141a** został dowiedziony przez zastosowanie niewielkiego (1,5 ekw.) nadmiaru wody podczas utleniania. W tych warunkach jedynym obserwowanym (^{31}P NMR) produktem był cykliczny fosforan **139a**, który po dodaniu wody szybko hydrolizował z otwarciem pierścienia do 2-hydroksyetylofosforanu nukleozydu **141a**. Aktywowanie (TPS-Cl) centrum fosforowego diestru **141a** powodowało natychmiastową cyklizację do **139a**. Z doświadczeń tych wynika, że fosfordiester 2-hydroksyetylowo – nukleozydowy **141a** jest związkiem podatnym na cyklizację, a produkt tej reakcji łatwo hydrolizuje do wyjściowego liniowego estru **141a**.

Podsumowując, jedynym diolem umożliwiającym otrzymanie diestru typu **141** z wolną grupą hydroksylową w reakcji z preaktywowanym H-fosfonianem typu **127** jest glikol etylenowy. W przypadku pozostałych badanych dioli **136b – d** otrzymuje się trwałe, cykliczne fosfortriestry **139b – d**.

(c) *Kondensacja wobec 2-chloro-5,5-dimetylo-2-okso-2λ⁵-1,3,2-dioksafosfinanu (NEP-Cl)*

W podejściu przedstawionym powyżej możliwe jest otrzymywanie jedynie diestru nukleozydowo – hydroksyetylowego. Poszukując bardziej ogólnej metody syntezy tego typu diestrow, przebadalem reakcje kondensacji z wykorzystaniem NEP-Cl (**133**) jako czynnika kondensującego.

Wszystkie badane diole **136a – d** w reakcji z H-fosfonianem nukleozydu **121** aktywowanym cyklicznym chlorofosforanem **133** prowadziły do pożądaných hydroksyalkilo-H-fosfonianów nukleozydów typu **142** (Schemat 24). W przypadku dioli **136b – d**, w których funkcje hydroksylowe były oddzielone co najmniej trzema grupami metylenowymi, spodziewane diestry liniowe typu **142** były jedynymi produktami reakcji kondensacji. Natomiast, w mieszaninie poreakcyjnej po kondensacji glikolu etylenowego i H-fosfonianu **121**, diester **142a** był produktem minorowym (^{31}P NMR). Głównymi produktami tej reakcji były: związek o $\delta_{\text{P}} = 23,09$ ppm (^{31}P NMR) oraz 5'-O-dimetoksytrytylotymidyna (TLC).



142a – d119143a

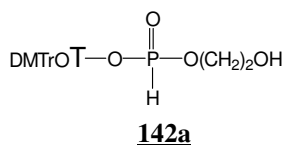
SCHEMAT 24

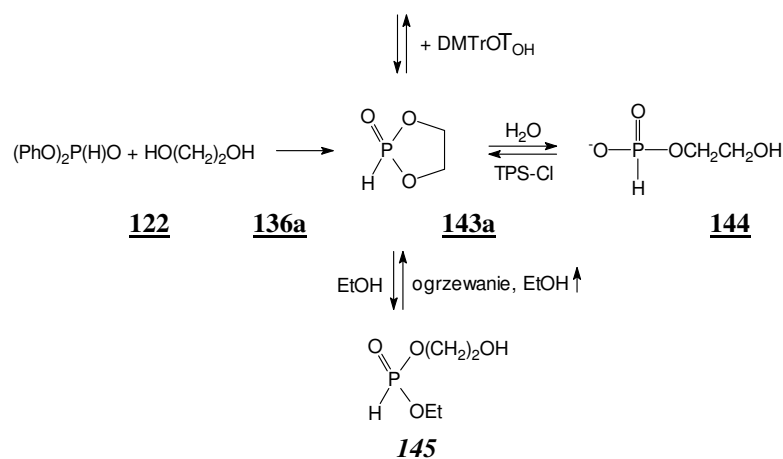
Taki skład mieszaniny poreakcyjnej może świadczyć o występowaniu reakcji następujących, w których substratem jest otrzymany po kondensacji 2-hydroksyetylo-H-fosfonian nukleozydu 142a, i który ulega spontanicznej cyklizacji do fosfolanu 143a z odejściem reszty nukleozydowej. Proporcje ilościowe produktów 142a, 143a i nukleozydu nie zmieniały się w czasie. Dodanie dużego (10 ekw.) nadmiaru nukleozydu powodowało znaczny wzrost ilości diestru 142a. To ostatnie wskazuje na występowanie równowagi $\text{142a} \rightleftharpoons \text{143a} + \text{119}$ (Schemat 24), która po dodaniu nadmiaru nukleozydu przesuwa się w stronę diestru 142a. Powstawania fosfolanu 143a można było się spodziewać, gdyż wcześniej opisane próby syntezy H-fosfonianu 3'-5' dirybonukleozydowego, w którym 3' nukleozyd miał odsłoniętą wicynalną resztę 2'-OH nie powiodły się ze względu na szybką cyklizację do 2', 3' cyklicznego H-fosfonianu nukleozydu, który w trakcie dalszego przerobu ulegał niespecyficznemu hydrolyzowi do mieszaniny 2' i 3' H-fosfonianów nukleozydu¹²⁴.

Z powyższych doświadczeń można wnioskować, że centrum fosforowe fosfolanu 143a jest podatne na atak nukleofilowy. Chcąc lepiej poznać właściwości cyklicznego H-fosfonianu 143a, otrzymałem go w reakcji równomolowych ilości glikolu etylenowego z fosforem difenylowym (Schemat 25).

W pirydynie reakcja ta zachodzi bardzo szybko (z chwilą zmieszania reagentów), a fosfolan 143a jest jedynym obserwowanym produktem (³¹P NMR). Dodanie nadmiaru wody powoduje szybką jego hydrolyzę do H-fosfonianu 2-hydroksyetylowego 144. Po usunięciu wody z medium monoester 144 poddany aktywacji (TPS-Cl) odtwarza ilościowo substrat 143a. Z kolei dodanie etanolu do roztworu 143a w pirydynie powoduje otwieranie pierścienia i przy pięciomolowym nadmiarze całkowitą linearyzację do diestru 145. Usunięcie nadmiaru etanolu z mieszaniny reakcyjnej odtwarza ilościowo substrat 143a. Fosfolan 143a podobnie reaguje z 5'-dimetoksytrytylotymidyną, a ilość 2-hydroksyetylo-H-fosfonianu nukleozydu 142a wzrasta wraz ze zwiększaniem nadmiaru nukleozydu.

Bardzo silna tendencja do wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji diestrów 2-hydroksyetylo-H-fosfonianów w zasadzie wyklucza otrzymywanie preparatywne tych związków. Z drugiej strony, przeprowadzanie monoestrów alkilowych (np. nukleozydowych) w ich pochodne 2-hydroksyetylowe diestry może być propozycją dogodnej metody defosfonylacji H-fosfonianów alkilowych (np. nukleozydów bądź oligonukleotydów).



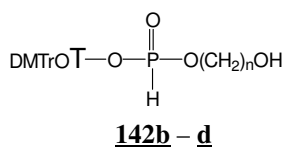


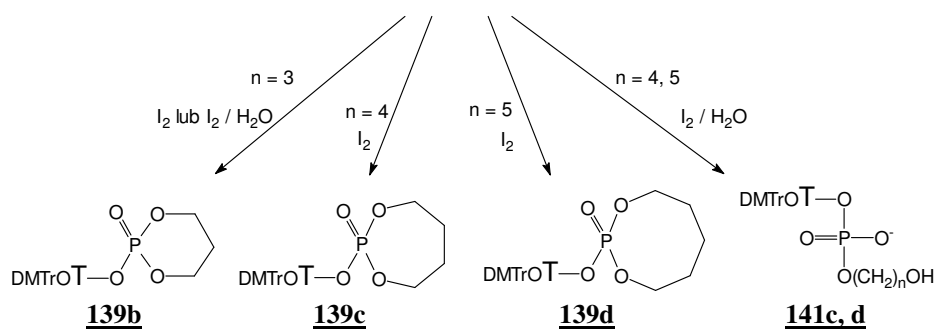
SCHEMAT 25

Wyższe hydroksyalkilo-H-fosfoniany nukleozydów **142b** – **d**, otrzymane wg Schematu 24, były utleniane jodem do analogów fosforanowych. W reakcjach tych rodzaj i dystrybucja produktów zależały od warunków utleniania i długości mostka polimetylenowego (Schemat 26). I tak, pochodna 3-hydroksypropylowa **142b**, bez względu na nadmiar wody użyty w reakcji, prowadziła do jednego produktu – 2-[5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-tymidyn-3'-yloksy]-2-okso-1,3,2-dioksafosfinanu **139b**. Cykliczny fosfinan **139b**, otrzymany jako jedyny produkt, świadczy jednoznacznie o tym, że wewnątrzcząsteczkowa cyklizacja zachodząca na etapie jodofosforanu (pierwszego produktu utlenienia) jest zdecydowanie dominującą reakcją następczą. W reakcji utleniania otrzymano analogiczne produkty wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji, 2-[5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-tymidyn-3'-yloksy]-2-okso-1,3,2-dioksafosfepan **139c** i 2-[5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-tymidyn-3'-yloksy]-2-okso-1,3,2-dioksafosfokan **139d**, odpowiednio dla pochodnych 4-hydroksybutylowej **142c** i 5-hydroksypenylowej **142c**, ale tylko w przypadku, gdy reakcje utleniania prowadzono w warunkach bezwodnych.

Ta sama reakcja przeprowadzona wobec dużego nadmiaru (30 ekw.) wody w przypadku diestru **142c** prowadziła do fosfepanu **139c** (~ 30%, ^{31}P NMR) i 3-hydroksybutylofosforanu nukleozydu **141c** (~ 70%). Stosowanie większych nadmiarów wody (60 ekw.) nie zmieniło proporcji ilościowych otrzymywanych produktów **139c** i **141c**. Utlenianie 5-hydroksypentylowej pochodnej **142d** wobec 30 ekw. wody prowadziło do powstawania pożądanego 5-hydroksypentylfosforanodiestru nukleozydu **141d** jako jedynego produktu reakcji.

Podsumowując, diestry fosforanowe typu **141** o potencjalnym zastosowaniu syntetycznym można otrzymywać z dobrymi wydajnościami utleniając wobec nadmiaru wody produkt kondensacji (wobec NEP-Cl) monoestru **121** z diolami wyższymi niż butanodiol. Ze względu na silną tendencję do cyklizacji nie można stosować dioli niższych ($n \leq 4$).





SCHEMAT 26

(d) Wnioski

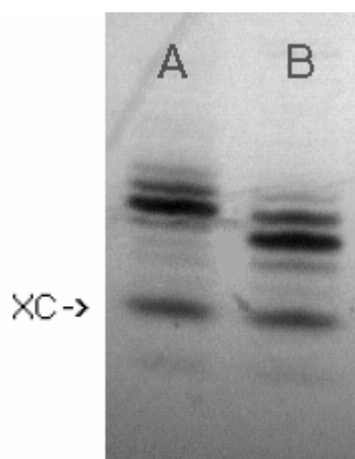
W celu otrzymania H-fosfonianu z wolną grupą hydroksylową należy zastosować jedno z następujących podejść:

- Preaktywacja monoestru chlorkiem piwaloilu, następnie reakcja z glikolem etylenowym. Po utlenieniu otrzymuje się diester typu **141a**.
- Kondensacja monoestru z diolami wyższymi niż 1,4-butanodiol wobec NEP-Cl. Po utlenieniu otrzymuje się diestry typu **141**.
- Kondensacja monoestru z aminoetanołem wobec NEP-Cl. Po utlenieniu otrzymuje się amidofosforan typu **130**.

(3) Porównanie dioli i aminoalkoholi

Na zakończenie tego rozdziału pragnę zwrócić uwagę na podobieństwa i różnice w reaktywności dioli i aminoalkoholi w reakcjach z H-fosfonianami nukleozydowymi oraz w reaktywności produktów tych reakcji:

- Kondensacja wobec chlorku piwaloilu:
 - aminoalkohole: całkowita acylacja grup aminowych;
 - diole: częściowa acylacja grup hydroksylowych.
- Reakcja z monoestrem preaktywowanym chlorkiem piwaloilu (**127**):
 - aminoalkohole: amidofosforyny cykliczne powstają dla $n = 2 - 3$; łatwo hydrolizują;
 - diole: fosforyny cykliczne powstają dla $n = 2 - 5$; łatwo hydrolizują z wyjątkiem związku z pierścieniem pięciocłonowym (fosfolan **137a**).
- Hydroliza zasadowa cyklicznych amidofosforanów **129** i cyklicznych fosforanów **139**:
 - nie hydrolizują, z wyjątkiem związków z pierścieniem pięciocłonowym, w których pęka wiązanie P-O pierścienia.
- Kondensacja wobec NEP-Cl:
 - aminoalkohole: powstają diestry nukleozydowo – aminoalkilowe (**134**);
 - diole: powstają diestry nukleozydowo – hydroksyalkilowe (**141**), jednak diester nukleozydowo – hydroksyetylowy **141a** ulega samorzutnej wewnątrzcząsteczkowej cyklizacji.



ZDJĘCIE 1

- e) Utlenianie H-fosfonianów nukleozydowo – (amino/hydroksy)alkilowych (**134/141**) jodem w warunkach bezwodnych:
- aminoalkohole: cyklizacja dla $n = 2 - 4$;
 - diole: cyklizacja dla $n = 2 - 5$.
- f) Utlenianie H-fosfonianów nukleozydowo – (amino/hydroksy)alkilowych (**134/141**) jodem w obecności wody:
- aminoalkohole: cyklizacja dla $n = 2$;
 - diole: cyklizacja dla $n = 2 - 4$.

Reasumując, przebadane pochodne aminoalkoholi i dioli

mają zbliżone własności chemiczne, jednak w przypadku dioli wyraźna jest silniejsza tendencja do tworzenia związków cyklicznych.

B. Funkcjonalizacja oligonukleotydów na podłożu stałym

Opisane w poprzednim rozdziale, metody fosfonylacji i funkcjonalizacji nukleozydów dobrze pracujące w roztworze, wymagały sprawdzenia ich skuteczności na oligomerach związanych z podłożem stałym. Do badań wykorzystałem oligomer T_{10} (**I**) zsyntetyzowany metodą amidofosforynową lub H-fosfonianową na podłożu LCAA – CPG w skali $0,1 \mu\text{mola}$. Produkty reakcji były analizowane za pomocą elektroforyzy na żelu poliakrylamidowym (PAGE).

a) Fosfonylacja

(1) Kwas pirofosfonowy

Do fosfonylacji 5'-terminalnej grupy hydroksylowej związanego z podłożem stałym oligonukleotydu **I** stosowałem $0,2 \text{ M}$ roztwór kwasu pirofosfonowego w pirydynie.

Badając przebieg reakcji w czasie (Tabela 6), obserwowałem powstawanie nowego produktu oligonukleotydowego o mobilności elektroforetycznej spodziewanej dla 5'-fosfonylowanego oligomeru **II**. Po 120 min. substrat **I** (Zdjęcie 1, linia A^{*}) ulegał praktycznie ilościowej fosfonylacji (Zdjęcie 1, linia B). Być może zastosowanie roztworu kwasu pirofosfonowego o wyższych stężeniach przyspieszyłoby reakcję fosfonylacji, jednakże próby przygotowania takiego roztworu zakończyły się niepowodzeniem, gdyż przy stężeniach wyższych niż $0,2 \text{ M}$ sól pirydyniowa kwasu pirofosfonowego wytrącała się z roztworu.

Chcąc uzyskać bardziej jednoznaczne potwierdzenie obecności reszty 5'-H-fosfonianowej w oligomerze **II**, po odcięciu z podłoża i

Czas reakcji [min.]	15	30	60	120
Stopień fosfonylacji [%]	30	60	90	~100

TABELA 6. Fosfonylacja T_{10} (**I**) kwasem pirofosfonowym

* Wszystkie zdjęcia przedstawiają obrazy surowych, nieoczyszczonych oligonukleotydów.

odblokowaniu (wodny stężony roztwór NH_3) poddałem go działaniu alkalicznej fosfatazy. 5'-Fosfonylowany T_{10} **II** nie ulegał defosforylacji (PAGE), gdyż enzym nie rozpoznaje monoestrowej reszty H-fosfonianowej jako substratu⁸⁷. Jeżeli 5'-fosfonylowany oligomer **II** w reakcji kondensacji z 2-cyanoetanołem (wobec Piv-Cl) przekształcono w diester H-fosfonianowy, a po jego utlenieniu (I_2 w wodnej pirydynie) w fosforanodiester **III**, który po odblokowaniu (wodny stężony NH_3) do **IV** traktowano alkaliczną fosfatazą, to otrzymano ilościową defosforylację **IV** do nonafosforanu dekatymidynyłowego **V** (Schemat 27). Powyższe wyniki można uznać za wystarczający dowód na to, iż reakcja fosfonylacji oligomeru **I** prowadzi do 5'-fosfonylowanego oligonukleotydu **II**.

Tak więc, kwas pirofosfonowy może być z powodzeniem stosowany jako łagodny, monofunkcyjny czynnik fosfonylujący do wprowadzania reszt H-fosfonianowych na koniec 5' oligonukleotydów związanych z podłożem stałym.

(2) Fosforyn difenyłowy

Drugi z proponowanych czynników fosfonylujących, fosforyn difenyłowy, jest, w przeciwieństwie do kwasu pirofosfonowego, reagentem dwufunkcyjnym. Łączy się to z niebezpieczeństwem powstawania 5'-5' dimerów oligonukleotydów jako produktów ubocznych, podobnych do obserwowanych przez Marstersa i wsp. podczas fosfonylacji oligonukleotydów kwasem fosforowym wobec nadmiaru chlorku piwaloilu⁸⁷.

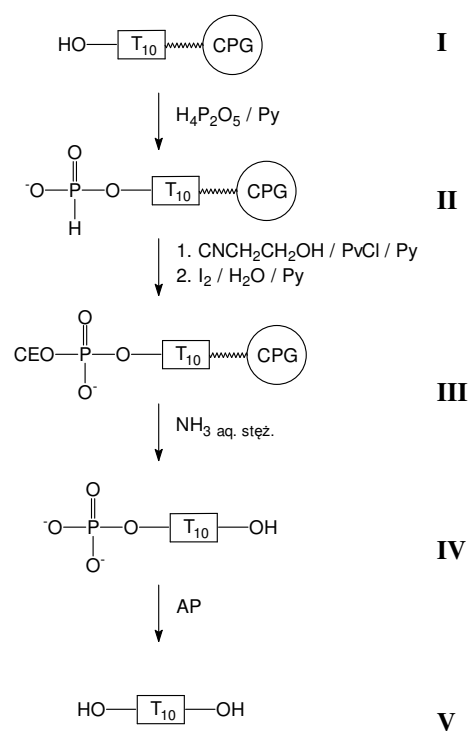
Powstawanie dimerów można było zaobserwować podczas opisywanej wcześniej fosfonylacji 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyny w roztworze (str. 57). Ilość tego typu produktu zmniejszała się wraz ze wzrostem nadmiaru fosforynu difenyłowego użytego w reakcji. Można oczekiwać, że również w reakcjach na podłożu stałym, stosując odpowiednie nadmiary czynnika fosfonylującego, dimeryzacja będzie ograniczona lub wyeliminowana.

W pierwszej kolejności badałem możliwość powstawania dimerów $\text{T}_{10}\text{-O-P(O)H-O-T}_{10}$ w zależności od stosowanych nadmiarów fosfonianu difenyłowego (Tabela 7). Oligomer **I** (Zdjęcie 2, linia A) poddałem działaniu



ZDJĘCIE 2

pirydynie o stężeniach 0,01, 0,05, 0,1 i 0,5M. Po 15 min. reakcji (czas wybrany arbitralnie),



SCHEMAT 27

Stężenie $(\text{PhO})_2\text{P(O)H}$ [M]	0,01	0,05	0,1	0,5
Stopień fosfonylacji [%]	0	50	100	100
Stopień dimeryzacji [%]	0	10	10	ślady

TABELA 7. Fosfonylacja T_{10} (**I**) fosforynem difenyłowym

hydrolizie grupy fenoksylowej z powstałego 5'-fenylo-H-fosfonianu oligonukleotydu (Py-H₂O 9:1, 30 min.) i jego odblokowaniu (wodny stężony roztwór NH₃), produkty analizowano na żelu poliakrylamidowym. Pełna fosfonylacja następowała już przy użyciu 0,1M roztworu fosforynu, jednakże obok pożądanego H-fosfonianu oligonukleotydu obecne były znaczące (ok. 10%) ilości 5'-5' dimeru. Dopiero zastosowanie roztworu 0,5 molowego pozwoliło uzyskać H-fosfonian oligomeru (**II**) jako praktycznie jedyny produkt (Zdjęcie 2, linia B).

W drugiej kolejności badałem czas konieczny do całkowitej fosfonylacji dla stężenia 0,5 M fosforynu difenylowego, gdyż wybrany arbitralnie w pierwszym doświadczeniu czas piętnastu minut mógł okazać się niepotrzebnie zbyt długi. Stosując podobną metodę analizy (PAGE) mogłem ustalić, że przy powyższym nadmiarze fosforynu difenylowego, reakcja fosfonylacji oligomeru T₁₀ (**I**, Schemat 27) do 5'-H-fosfonianu oligonukleotydu **II** jest zakończona w czasie 5 minut (Tabela 8).

Czas reakcji [min.]	1	2	5
Stopień fosfonylacji [%]	50	80	100

TABELA 8. Fosfonylacja T₁₀ (**I**) fosforynem difenylowym

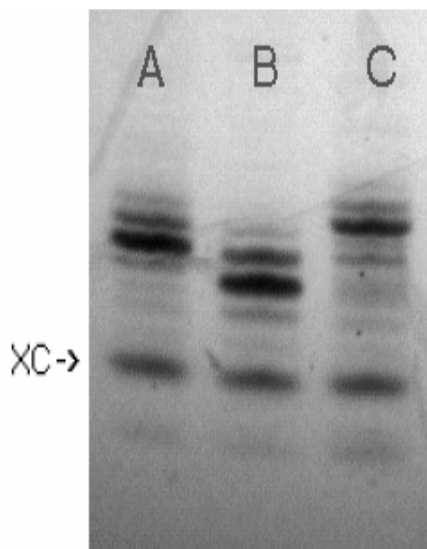
Tak więc, fosforyn difenyłowy okazał się czynnikiem pozwalającym na wydajną fosfonylację oligonukleotydów w czasie znacznie krótszym, niż w przypadku analogicznej reakcji z użyciem kwasu pirofosfonowego. Ponadto, fosforyn difenyłowy jest tanim, handlowym odczynnikiem i można go używać bez dodatkowych przygotowań.

Pragnę zwrócić uwagę, że w wyniku reakcji fosfonylacji oligonukleotydu fosforynem difenyłowym otrzymuje się 5'-fenylo-H-fosfonian oligonukleotydu, który zawiera podatną na transestryfikację grupę fenyłową. Jeżeli zamiast hydrolizy tego produktu, podda się go reakcji z aminoalkoholem, można spodziewać się powstawania 5'-aminoalkilo-H-fosfonianu oligonukleotydu, będącego docelowym produktem tego etapu modyfikacji oligomeru. Byłby to kolejny, bardzo prosty, wariant funkcjonalizacji oligonukleotydów.

b) Przyłączenie aminoalkoholu do 5'-H-fosfonylowanych oligonukleotydów

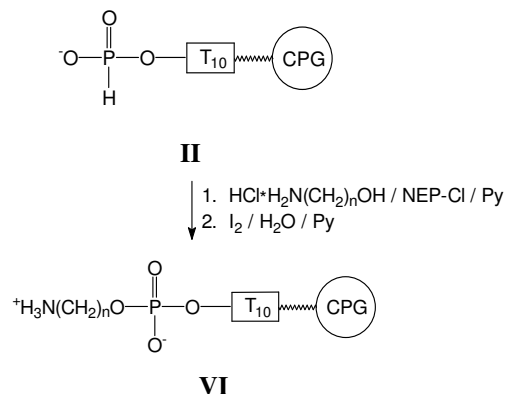
(1) Kondensacja 5'-H-fosfonianu oligonukleotydu z aminoalkoholami

Na podstawie badań prowadzonych na związkach modelowych (str. 63) można sądzić, że jedną z najlepszych metod przyłączenia wolnego aminoalkoholu do 5'-H-fosfonianu oligonukleotydu na podłożu stałym (**II**) jest kondensacja aminoalkoholu i monoestru H-fosfonianu wobec NEP-Cl. Ten czynnik kondensujący w trakcie reakcji w roztworze nie reagował z grupami aminowymi aminoalkoholi, co pozwalało na syntezę aminoalkilofosforanów nukleotydów z wolną resztą aminową.



ZDJĘCIE 3

Jednakże po to, by zapewnić wysoką wydajność reakcji w układzie dwufazowym (roztwór/podłoże stałe), koniecznym jest stosowanie dużych nadmiarów (kilkadziesiąt, a nawet kilkaset ekwiwalentów



SCHEMAT 28

molowych) reagentów. Stosowanie wolnego aminoalkoholu w tak dużym nadmiarze mogłoby powodować degradację otrzymanego metodą H-fosfonianową oligomeru (transestryfikacja internukleotydowych H-fosfonianodiesterów) lub powodować częściowe usuwanie ochronnych grup 2-cyanoetylowych w oligonukleotydzie zsyntetyzowanym metodą amidofosforynową. Aby zapobiec tym niepożądanym reakcjom ubocznym, ponownie wykorzystałem protonowanie funkcji aminowej aminoalkoholu, które, jak będzie to później wykazane (przy reakcjach kondensacji oksydatywnej, str. 79), znacznie osłabia nukleofilowość grupy -NH₂ aminoalkoholu. Jednocześnie funkcja hydroksylowa zachowuje charakter nukleofilowy i w planowanej reakcji grupa ta powinna być nukleofilem dominującym.

W celu funkcjonalizacji oligonukleotydów przeprowadziłem więc kondensację H-fosfonianu oligonukleotydu **II** z chlorowodorkiem aminoalkoholu wobec NEP-Cl jako czynnika kondensującego (Schemat 28). Zsyntetyzowany metodą H-fosfonianową oligomer **I** (Zdjęcie 3, linia A), po przeprowadzeniu w 5'-H-fosfonian (Zdjęcie 3, linia B), poddany został kondensacji z chlorowodorkiem aminopentanolu **153d** (40 μl, 0,2M roztwór w Py) wobec NEP-Cl (80 μl, 0,3M roztwór w Py).

Po utlenieniu i odblokowaniu roztworem amoniaku, pożądany 5'-aminoalkiloligonukleotyd został otrzymany z wydajnością prawie ilościową (Zdjęcie 3, linia C). Podobne wyniki uzyskane zostały dla aminoalkoholi **153e** i **f**. Jeśli jednak do takiej samej funkcjonalizacji wykorzystany został oligomer **I** uzyskany metodą amidofosforynową to, po odblokowaniu amoniakiem, obok właściwego produktu pojawiły się znaczące ilości (40 – 80%) oligomeru o innej mobilności elektroforetycznej. Produkt ten nie był natomiast obserwowany, kiedy do końcowego odblokowania zastosowana została metyloamina¹²⁵ (40% aq.) zamiast amoniaku. Problem tworzenia różnych produktów odblokowania 5'-aminoalkilofosforanów oligonukleotydów w zależności od metody ich syntezy omówię bardziej szczegółowo w dalszej części rozprawy.

Podsumowując, opisana powyżej metoda funkcjonalizacji oligonukleotydów wg *Wariantu I* realizowana jest w następujących etapach:

1. Fosforylacja (dwa podejścia):
 - a) z użyciem kwasu pirofosfonowego – 120 min.;
 - b) z użyciem fosforynu difenyłowego – 5 min. / hydroliza – 30 min.
2. Funkcjonalizacja: kondensacja z chlorowodorkiem aminoalkoholu wobec NEP-Cl – 4 min.
3. Utlenienie – 10 min.
4. Odblokowanie roztworem amoniaku lub metyloaminy.

Reagenty wykorzystywane w powyższej procedurze są trwałe, tanie i proste, dostępne handlowo (fosforyn difenyłowy) bądź łatwe do przygotowania (kwas pirofosfonowy, chlorowodorki aminoalkoholi, NEP-Cl). Stosowane reakcje są także proste (kondensacja, transestryfikacja) i zachodzą z wysokimi wydajnościami.

(2) Transestryfikacja 5'-fenylo-H-fosfonianu oligonukleotydu aminoalkoholami

W reakcjach fosforylacji oligonukleotydu związanego z podłożem z użyciem H-fosfonianu difenyłowego produktem pośrednim jest fenylo-H-fosfonian oligonukleotydu **VII**. Mając na uwadze podatność H-fosfonianów aryłowych na transestryfikację (str. 93) podjąłem próby wykorzystania produktu przejściowego **VII** do bezpośredniej funkcjonalizacji oligonukleotydów w reakcji z aminoalkoholami (Schemat 29). Ze względów omówionych wcześniej, do transestryfikacji fenyłowego H-fosfonianu oligonukleotydu **VII** stosowałem chlorowodorki aminoalkoholi. W pierwszej kolejności, stosując chlorowodorek aminopentanolu **153d** (0,2M roztwór w pirydynie) badałem przebieg reakcji transestryfikacji **VII** w czasie (Tabela 9). Po 60 minutach reakcja była zakończona, a jedynym nukleotydowym produktem obecnym w surowej mieszaninie po odcięciu z podłoża i odblokowaniu był sfunkcjonalizowany oligonukleotyd **VI** (PAGE).

Czas reakcji [min.]	2	4	10	20	30	60
Stopień funkcjonalizacji [%]	2	5	20	50	70	100

TABELA 9. Transestryfikacja oligomeru **VII** chlorowodorkiem aminopentanolu

Tak więc, w tym podejściu, nie stosując żadnych czynników kondensujących, a wykorzystując jedynie podatność aryłowych H-fosfonianów na substytucję, można było w jednym ciągu reakcji przeprowadzić fosforylację (**I**→**VII**) i funkcjonalizację (**VII**→**VI**) oligonukleotydu.

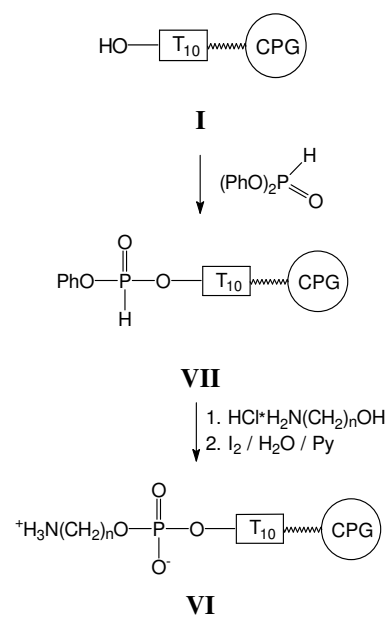
Podsumowując, do funkcjonalizacji oligonukleotydów powyższą metodą należy przeprowadzić następujące reakcje:

1. Fosforylacja: fosforyn difenyłowy – 5 min.
2. Funkcjonalizacja: transestryfikacja chlorowodorkiem aminoalkoholu – 60 min.

1. Utlenienie – 10 min.
2. Odblokowanie roztworem amoniaku lub metyloaminy.

Metoda ta będąca odmianą *Wariantu I*, angażująca wyjątkowo proste, dostępne handlowo reagenty pozwala na funkcjonalizację oligonukleotydów w sposób jeszcze prostszy i szybszy od zaproponowanego w poprzednim rozdziale niniejszej rozprawy.

Uważam, że obydwie opisane powyżej metody są równocenne i całkowicie spełniają początkowe wymogi funkcjonalizacji oligonukleotydów według *Wariantu I*. Fakt, że stosują one różnego typu substraty, a także różnego typu reakcje na poszczególnych etapach, może okazać się pomocny w przypadkach wykluczających stosowanie w trakcie funkcjonalizacji któregoś z reagentów (np. chlorofosforanów jako czynników kondensujących lub H-fosfonianu difenylowego wobec silnych zasad). Tak więc, w mojej ocenie, należy traktować powyższe metody jako uzupełniające, a nie alternatywne.



SCHEMAT 29

(3) Modyfikacje aminoalkilo-oligonukleotydów podczas odblokowania

Jak wcześniej zauważono, podczas końcowego odblokowania sfunkcjonalizowanych oligonukleotydów wodnym roztworem amoniaku, w przypadku oligomerów otrzymanych metodą amidofosforynową, obok pożądanego 5'-aminoalkilofosforanu oligonukleotydu otrzymywano produkt o zbliżonej, ale różnej mobilności elektroforetycznej. Nie powstawał on natomiast, gdy sfunkcjonalizowany oligomer otrzymywano metodą H-fosfonianową. Porównanie tych wyników sugeruje, że dodatkowy produkt tworzy się w trakcie usuwania fosforotrójestrowej funkcji 2-cyanoetylowej, z której, w reakcji β -eliminacji, powstaje potencjalnie reaktywny w warunkach zasadowych akrylonitryl. Jest bardzo prawdopodobne, że uwolniony akrylonitryl reaguje (wg Schematu 30) z funkcją aminową reszty 5'-aminoalkilofosforanowej sfunkcjonalizowanego oligonukleotydu, tworząc obserwowany jako produkt uboczny, 5'-[N-(2-cyanoetylo)aminoalkilofosforan] oligonukleotydu.



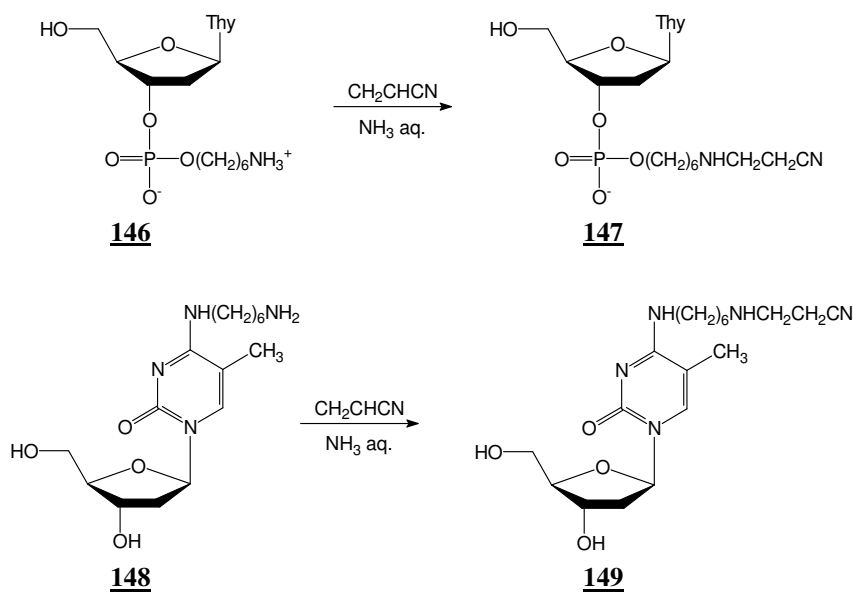
SCHEMAT 30

Dla potwierdzenia tych założeń, otrzymany metodą H-fosfonianową i oczyszczony (PAGE) 5'-aminoalkilo- T_{10} traktowano wodnym roztworem amoniaku wobec nadmiaru akrylonitrylu (10 ekw.). Po 2 godz. reakcji 5'-aminoalkilo oligonukleotyd przekształcał się ilościowo w produkt o identycznej mobilności (PAGE), jak produkt uboczny, który powstawał w trakcie odblokowania oligomerów syntetyzowanych metodą amidofosforynową. Ten wynik silnie sugeruje, że wolna funkcja aminowa grupy 5'-aminoalkilowej

sfunkcjonalizowanego oligomeru ulega N-alkilowaniu akrylonitrylem do analogu N-(2-cyanoetylo)aminoalkilowego. Jeśli tak jest rzeczywiście, to zablokowanie funkcji aminowej grupą ochronną powinno całkowicie zapobiegać N-alkilowaniu. I faktycznie, oligomer z grupą 5'-[N-(4,4'-dimetoksytrytylo)]-aminoalkilową, traktowany takim samym roztworem amoniaku wobec nadmiaru akrylonitrylu, pozostał niezmienny w ciągu 16 godzin.

Można przyjąć następane założenie, że zastosowanie do końcowego odblokowania oligomeru aminy (np. metyloaminy) w miejsce amoniaku powinno także zabezpieczyć przed N-alkilowaniem reszty aminoalkilowej, gdyż powstający akrylonitryl będzie wyłapywany przez znajdującą się w dużym nadmiarze aminę. Także i w tym przypadku założenia zweryfikowano w doświadczeniu, w którym oczyszczony 5'-aminoalkilo-oligonukleotyd pozostał niezmienny podczas szesnastogodzinnego działania akrylonitrylu (10 ekw.) w wodnym 40% roztworze metyloaminy.

Aby uzyskać bezpośrednie dowody możliwości zachodzenia reakcji alkilowania grup aminowych, przeprowadziłem badania na związkach modelowych: fosforanie nukleozydowo – aminoalkilowym **146** i aminoalkilonukleozydzie **148**⁹⁹ (Schemat 31).



SCHEMAT 31

Oba te związki traktowane akrylonitrylem (10 ekw.) w roztworze amoniaku, w ciągu 15 min. przekształcały się ilościowo w nowe produkty (TLC). Po izolacji, ustalono ich strukturę (^1H i ^{31}P NMR) jako analogi N-(2-cyanoetylo)aminoalkilowe **147** i **149**. W podobnych doświadczeniach z zastosowaniem metyloaminy w miejsce amoniaku, oba związki (**146** i **148**) pozostały niezmiennie w ciągu 24h.

Podsumowując, podczas otrzymywania sfunkcjonalizowanych oligomerów otrzymanych metodą amidofosforynową, zawierających wolne reszty aminoalkilowe, należy mieć na uwadze możliwość alkilacji tych reszt akrylonitrylem, uwolnionym w trakcie końcowego odblokowania amoniakiem. Reakcja ta nie zachodzi gdy:

- oligomer otrzymano metodą H-fosfonianową,
- grupa aminowa jest zablokowana podczas traktowania amoniakiem,
- odblokowanie przeprowadza się w roztworze metyloaminy zamiast amoniaku.

3. BADANIA NAD FUNKCJONALIZACJĄ OLIGONUKLEOTYDÓW WEDŁUG WARIANTU II

A. Badania związków modelowych

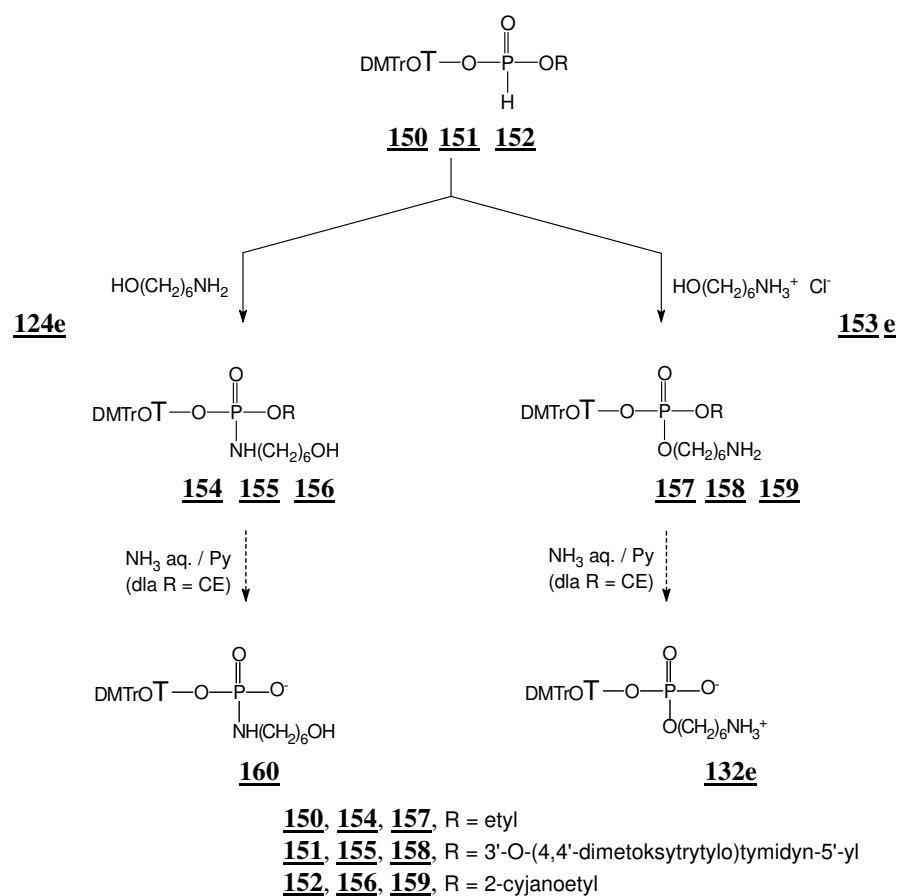
a) Kondensacja oksydacyjna nukleozydowych diestrów H-fosfonianowych z aminoalkoholami

Prace nad funkcjonalizacją oligonukleotydów wg *Wariantu II* rozpocząłem od badań nad chemoselektywnością kondensacji diestrów H-fosfonianów i aminoalkoholi, zachodzącej w trakcie utleniania. Ten typ reakcji, opisany A. Todda i wsp.¹²⁶ dla diaminoalkanów sprzęganych z diestrami H-fosfonianowymi wobec czterochlorku węgla, był i jest do dzisiaj stosowany w chemii nukleotydów¹²⁷ z dobrym skutkiem. Podjąłem więc badania nad analogicznymi reakcjami, w których oksydacyjna kondensacja prowadzona była wobec niesymetrycznych pod względem charakteru grup funkcyjnych reagentów binukleofilowych – aminoalkoholi. Jako modelowy diester H-fosfonianowy użyłem łatwo dostępny syntetycznie etylo-H-fosfonian nukleozydu **150** i 6-aminoheksan-1-ol (**124e**) jako binukleofil.

Jednym z podstawowych warunków efektywnego sprzęgania oksydacyjnego jest bezwodność środowiska reakcji. Śladowe ilości wody z substratów tj. diestru **150** i aminoalkoholu **124e** usuwałem przez odparowanie z nadmiarem bezwodnej pirydyny. Okazało się, że w trakcie takiej procedury przygotowywania substratów następuje transestryfikacja (!) z uwolnieniem nukleozydu i nienukleotydowych produktów zawierających fosfor. Na ten łatwo zachodzący, niepożądany proces zwróciłem szczególną uwagę, gdyż sądzę, że może on mieć bardziej ogólne konsekwencje w chemii H-fosfonianów nukleozydów czy diestrów H-fosfonianowych w ogóle. Dlatego też podjąłem bardziej szczegółowe badania nad transestryfikacją H-fosfonianów alkoholami, alkoholami wobec amin oraz aminoalkoholami, a ich wyniki opisałem w dalszej części rozprawy.

Przygotowując substraty **150** i **124e** osobno można zapobiec transestryfikacji i dalej prowadzić reakcję oksydacyjnej kondensacji (Schemat 32). Diester **150** poddany utlenianiu jodem (1 ekw.) w pirydynie w obecności 6-aminoheksan-1-olu **124e** (10 ekw.) w czasie ~15 s tworzy jeden produkt o przesunięciu chemicznym ~10 ppm (³¹P NMR). Związek ten, po izolacji zidentyfikowałem jako 6-hydroksyheksyloamidofosforan nukleozydowo – etylowy **154** (³¹P i ¹H NMR, TLC i analiza elementarna). Obecność amidofosforanu **154** jako jedyne produktu wskazuje, że w warunkach reakcji funkcja aminowa jest zdecydowanie

efektywniejszym nukleofilem wobec powstałego *in situ* jodofosforanu niż funkcja hydroksylowa aminoalkoholu. Dla realizacji celów tej pracy korzystniejsze byłoby odwrócenie chemoselektywności omawianej reakcji i otrzymywanie triestrów aminoalkilowych. Jest to możliwe np. przez zablokowanie funkcji aminowej aminoalkoholu, co wiąże się jednak z dodatkowym przygotowaniem aminoalkoholu, a także koniecznością selektywnego odsłonięcia funkcji aminowej. Można także zakładać prostsze rozwiązanie, w którym nukleofilowość atomu azotu funkcji $-NH_2$ będzie znacznie zredukowana przez jej protonowanie, podczas gdy charakter nukleofilowy reszty hydroksylowej aminoalkoholu pozostaje praktycznie niezmienny.



SCHEMAT 32

Założenie to zweryfikowałem pozytywnie w reakcji diestru **150** z chlorowodorkiem aminoheksanolu **153e** w warunkach utleniania identycznych jak w przypadku aminoalkoholu nieprotonowanego. Reakcja zachodziła zdecydowanie wolniej (30 min.) i prowadziła do jednego produktu o przesunięciu chemicznym $\delta_P \approx -2$ ppm (typowym dla fosforotriestrów), który wyizolowano i określono jego strukturę (^{31}P i ^1H NMR, TLC i analiza elementarna) jako etylo-6-aminoheksylo-3'-fosforan nukleozydu **157**. Tak więc, proste protonowanie funkcji $-NH_2$ aminoalkoholu rzeczywiście odwraca jego reaktywność na korzyść grupy $-OH$ i pozwala

ukierunkować reakcję oksydatywnej kondensacji na tworzenie fosfortriestrów jako jedynych produktów reakcji. Zgodnie z moją najlepszą wiedzą, jest to pierwszy przykład otrzymywania fosforotriestrów aminoalkilowych na drodze utleniania diestrów H-fosfonianów wobec nieblokowanych (a jedynie N-protonowanych) aminoalkoholi.

Biorąc pod uwagę brak odpowiedniej metody selektywnego usuwania reszty etylowej oraz nietrwałość fosfortriestrów w standardowych warunkach odblokowania oligonukleotydów (stężony wodny amoniak), syntetyczna użyteczność etylowych triestrów typu **157** jest ograniczona. Dlatego też podjąłem badania nad oksydatywną kondensacją aminoalkoholi z H-fosfonianem dinukleozydowym typu **151**, a także z 2-cyanoetylo-H-fosfonianem nukleozydu typu **152**. Dinukleozydo-H-fosfonian **151** utleniany jodem wobec 6-aminoheksan-1-olu i jego chlorowodoru prowadził, w porównywalnym czasie, do analogicznych produktów oksydatywnej kondensacji jak pochodna etylowa **150** tj. 6-hydroksyheksyloamidofosforanu **155** i 6-aminoheksylofosforo triestru **158**. W przypadku diestru **152** niosącego β -eliminacyjną grupę 2-cyanoetylową, jeżeli reakcję utleniania wobec wolnego aminoheksanolu **124e** prowadzono w pirydynie to obok spodziewanego produktu kondensacji **156** znajdowano H-fosfonian nukleozydu **121** (~20%, ^{31}P NMR). Ten ostatni związek jest produktem reakcji β -eliminacji reszty 2-cyanoetylowej z substratu **152** przed jego utlenieniem. Tak więc sądzić można, że w warunkach reakcji, β -eliminacja reszty 2-cyanoetylowej z substratu **152** jest dostatecznie szybka by konkurować z utlenianiem, co znajduje odzwierciedlenie w kompozycji produktów (obecność H-fosfonianu nukleozydu) po zakończeniu procesu utleniania. Ponadto, w mieszaninie poreakcyjnej widoczne były znaczące ilości (~20%) amidofosforanów nienukleotydowych, które były produktami oksydatywnej kondensacji dialkilo-H-fosfonianodiestrów, powstałych w szybkiej, poprzedzającej utlenienie, reakcji transestryfikacji związku **152** aminoalkoholem **124e**.

Jeżeli tę samą reakcję utleniania 2-cyanoetylo-H-fosfonianu nukleozydu **152** wobec **124e** przeprowadzono w acetonitrylu, to praktycznie jedynym (>98%, ^{31}P NMR) powstałym produktem był amidofosforan nukleozydu **156**. Tak więc można wnioskować, że zmiana środowiska reakcji z zasadowego (pirydyna) na obojętne (acetonitryl) musiała znacznie spowolnić konkurencyjne reakcje transestryfikacji oraz β -eliminacji, przy zachowaniu szybkiego procesu utleniania i równie szybkiej następczej reakcji aminolizy powstałego jodo-fosforanu do amidofosforanu **156**.

Zdecydowanie różne wyniki otrzymałem w reakcji utleniania 2-cyanoetylo-H-fosfonianu nukleozydu **152** wobec chlorowodoru 6-aminoheksanolu (**153e**). Reakcję prowadziłem w pirydynie ze względu na niedostateczną rozpuszczalność **153e** w acetonitrylu. Pomimo zastosowania pirydyny jako medium reakcyjnego, protonowanie funkcji aminowej aminoalkoholu istotnie lub całkowicie zahamowało reakcje transestryfikacji czy β -eliminacji grupy 2-cyanoetylowej. Reakcja jednak nie przebiegała czysto i oprócz aminoalkilofosfortriestru nukleozydu **159** (diastereoizomery, $\delta_{\text{P}} = -2,31$ i $-2,41$ ppm) w mieszaninie reakcyjnej obecny

był szereg produktów w zakresie -1 – -2 ppm. Całkowita transformacja substratu **152** zachodziła w czasie 30 minut. Prowadzenie reakcji wobec N-metyloimidazolu lub zmiana środowiska reakcji na 50% lutydynę w chlorku metylenu nie poprawiła znacząco obrazu reakcji. Natomiast w obecności stosunkowo niewielkich nadmiarów tetrazolu (4 ekw.) oksydacyjne sprzęganie **152** i **153e** prowadziło wyłącznie do triestru **159** i było zakończone w ciągu 5 minut. Jest bardzo prawdopodobne, że tetrazol działa tu jako nukleofil, przekształcając aktywne produkty utlenienia (jodofosforan czy addukt pirydyniowy fosforodiestru) w tetrazolid, który czysto i szybko reaguje z funkcją hydroksylową protonowanego aminoalkoholu.

Produkty **154**, **155**, **157** i **158** zostały oczyszczone chromatograficznie jako takie, natomiast pochodne 2-cyjanoetylowe **156** i **159** były niedostatecznie trwałe (β -eliminacja grupy 2-cyjanoetylowej) w trakcie izolacji. Dlatego też ze związków **156** i **159** usunięto grupę 2-cyjanoetylową (NH_3 aq. stęż./pirydyna), po czym izolowano trwałe produkty końcowe: 6-hydroksyheksyloamidofosforan nukleozydu **160** i 6-aminoheksylofosforan nukleozydu **132e**.

Powyższe prace nad oksydacyjną kondensacją H-fosfonianowych diestrów nukleozydów z aminoalkoholami są przykładem kontrolowania kierunku reakcji przez zmianę nukleofilowości funkcji aminowej aminoalkoholu na drodze prostego protonowania bez konieczności jej dodatkowego blokowania. Otwiera to możliwości stosowania jednego typu reakcji do efektywnej syntezy analogów nukleotydów niosących reszty hydrokalkilamidofosforanowe lub aminoalkilofosforanowe. Wyniki tych prac zostały opublikowane w 1995 roku¹⁴⁶.

W trakcie realizacji tej części rozprawy moją szczególną uwagę zwróciły nieoczekiwanie łatwo i spontanicznie zachodzące reakcje transestryfikacji H-fosfonianodiestrów aminoalkoholami. W dostępnej mi literaturze znalazłem bardzo nieliczne prace¹²⁸⁻¹³¹ dotyczące tego typu reakcji. Jak już wcześniej wspomniałem, sądzę, że reakcje te mogą mieć bardziej ogólne konsekwencje w chemii nukleotydów i oligonukleotydów, dlatego też poświęciłem im następny rozdział rozprawy.

b) Reakcje transestryfikacji H-fosfonianów nukleozydów

Podjmując badania nad transestryfikacją H-fosfonianów nukleozydów aminoalkoholami oczekiwałem odpowiedzi na następujące pytania:

1. Czy aminoalkohole posiadają szczególne właściwości transestryfikacji diestrów H-fosfonianów, czy być może jest to proces o bardziej ogólnym charakterze?
2. Jeżeli aminoalkohole posiadają szczególne właściwości transestryfikacji diestrów H-fosfonianów, to jakie czynniki fizykochemiczne lub strukturalne o tym decydują?
3. Dlaczego w reakcjach transestryfikacji aminoalkoholami otrzymuje się fosforoestry, a nie fosforoamidy?

4. Czy i w jakim stopniu reakcje transestryfikacji zależą od struktury H-fosfonianodiestru?

Chcąc uzyskać odpowiedzi na powyższe pytania, starałem się w pierwszej kolejności określić jakie właściwości w reakcji podstawienia nukleofilowego na centrum fosforowym H-fosfonianodiestrów mają alkohole i aminy, następnie mieszanina alkoholi i amin i w końcu aminoalkohole. Jako modelowe diestry nukleozydów wybrałem pochodną etylową, H-fosfonian dinukleozydowy, pochodną 2-cyanoetylową oraz arylową. Po to, by można było porównywać wyniki poszczególnych eksperymentów, wszystkie reakcje prowadzono w pirydynie przy jednakowym stężeniu substratów.

(1) Reakcje H-fosfonianu nukleozydowo – etylowego

(a) Reakcje z etanolem

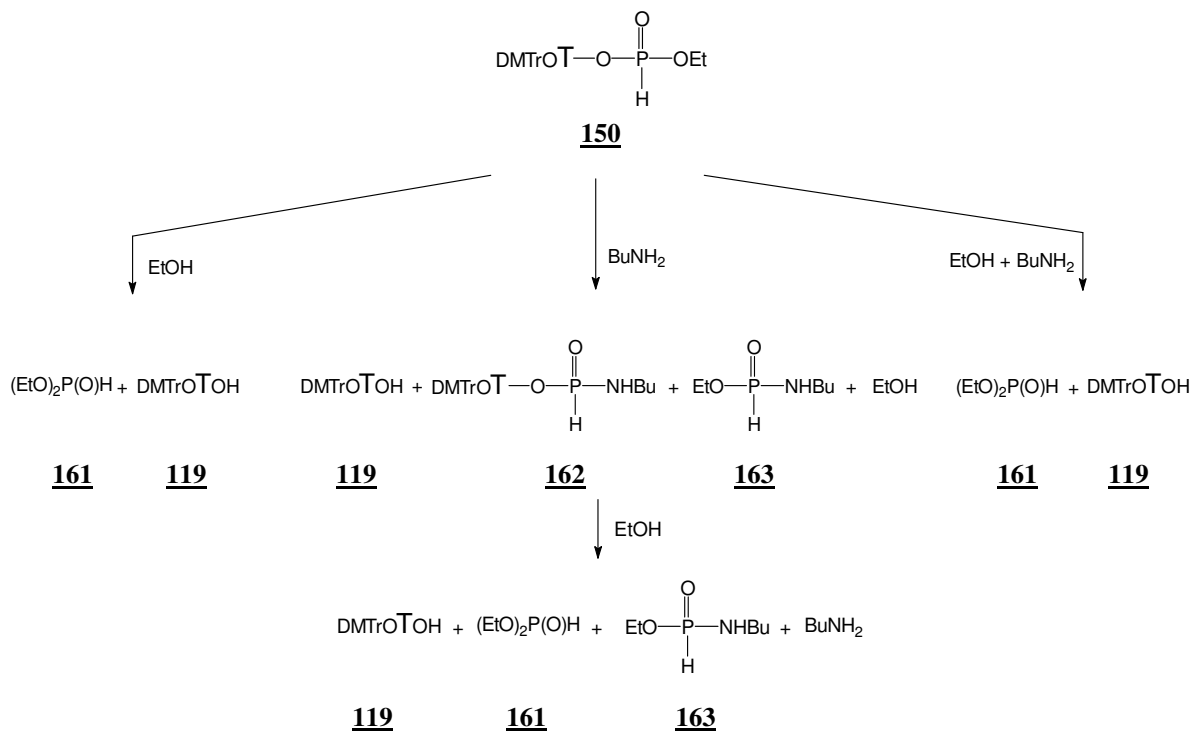
H-Fosfonian nukleozydowo – etylowy **150** (Schemat 33) poddany działaniu etanolu (10 ekw.) w pirydynie reagował bardzo wolno i po upływie 14 dni obok wciąż obecnego substratu **150** (~ 50%) jedynym produktem był H-fosfonian dietylowy **161** (^{31}P NMR) i nukleozyd [5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyna **119**] (TLC). Tak więc, reakcja transestryfikacji, pomimo dużego nadmiaru alkoholu zachodzi bardzo wolno, a jej zakończenie wymagałoby nierozsądnie długiego czasu. Należy rozważyć, iż jedną z przyczyn tak powolnego przebiegu reakcji jest osiągnięcie stanu równowagi $\text{150} + \text{etanol} \rightleftharpoons \text{161} + \text{nukleozyd}$ i jeżeli nie usunie się jednego z komponentów reakcji, to obserwowany stosunek substratów i produktów będzie stały w badanych warunkach. Jednakże, równolegle wykonana „odwrotna” reakcja fosfonianu dietylowego **161** z nadmiarem 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyny (10 ekw.) w ciągu 6 dni prowadziła do powstawania jedynie ok. 5% diestru nukleozydowo – etylowego **150**. Można więc sądzić, że równowaga reakcji transestryfikacji **150** etanolem jest bardzo mocno przesunięta w kierunku mało reaktywnego dietylo-H-fosfonianu **161**.

Jednym z istotnych czynników warunkujących szybkość omawianej reakcji może być zasadowość środowiska, wpływająca zarówno na aktywację alkoholu (generowanie jonów alkoksylowych) jak i na ternalizację substratu **150** do tri-skoordynowanego dialkilofosforynu, który powinien być bardziej podatny na substytucję na centrum fosforowym niż ten sam związek w formie H-fosfonianu. Przypuszczenie to potwierdziłem w reakcji diestru **150** z etanolem wobec trietyloaminy (10 ekw.), w których to warunkach reakcja transestryfikacji do fosfonianu dietylowego była zakończona po 60 godzinach.

Wyniki powyższych doświadczeń wskazują na to, iż transestryfikacje H-fosfonianodiestrów alkoholami w umiarkowanych zasadowych warunkach zachodzą bardzo wolno, i że można je przyspieszać wprowadzając do reakcji mocne zasady.

(b) Reakcje z n-butyloaminą

W reakcji H-fosfonianu nukleozydowo – etylowego **150** z *n*-butyloaminą (10 ekw.) czas potrzebny do całkowitego zaniku substratu wynosił 96 godz. W mieszaninie poreakcyjnej obecne były amidofosfoniany **162** i **163** (~ 95%) jako główne produkty, w stosunku 1 : 4 oraz niewielka ilość (~5%) H-fosfonianu dietylowego **161** (Schemat 33).



SCHEMAT 33

Produktów aminolizy, **162** i **163**, należało się spodziewać, natomiast produkt transestryfikacji, **161**, jest raczej nieoczekiwany. Taka kompozycja i charakter powstałych produktów jest najprawdopodobniej rezultatem następczych reakcji nieselektywnej aminolizy diestru **150** do amidofosfonianów **162** i **163** z uwolnieniem nukleozydu **119** i etanolu. Obecność amidofosfonianu etylowego **163** jako głównego produktu reakcji świadczy o tym, że aminoliza **150** z uwolnieniem nukleozydu **119** jako lepszej grupy odchodzącej niż etoksylowa, zachodzi najszybciej. W drugim równoległym, lecz wolniejszym nurcie tej reakcji, powstaje amidofosfonian nukleozydu (**163**) i etanol, który aktywowany *n*-butyloaminą (podobnie jak w przypadku trietyloaminy) transestryfikuje substrat **150** do symetrycznego diestru **161**. Dodanie dodatkowych ilości etanolu (3 ekw.) spowodowało zanik produktu nukleotydu **162**, a w mieszaninie poreakcyjnej obserwowano obecność jedynie nienukleotydu H-fosfonianów **161** i **163** w niezmienionej proporcji. To ostatnie może sugerować, że amidofosfonian nukleozydu **162** w reakcji z etanolem wobec aminy ulega nieselektywnej transestryfikacji: do amidofosfonianu etylowego **163** z uwolnieniem nukleozydu, bądź też odtwarza substrat **150** z uwolnieniem butyloaminy. Z kolei **150** w reakcji z etanolem tworzy dietylowy H-fosfonian

161 jako finalny trwały produkt. Możliwość takiej transformacji otrzymanego w inny sposób¹³² amidofosfonianu nukleozydu **162** dowiodłem w reakcji z mieszaniną etanolu i butyloaminy, której produktami były H-fosfonian dietylowy **161** i amidofosfonian etylowy **163** w stosunku 1 : 1, niezmienionym przez 48 godzin.

Podsumowując, reakcje aminolizy H-fosfonianu nukleozydowo – etylowego **150** zachodzą szybciej niż analogiczne reakcje transestryfikacji etanolem. Jednakże chciałbym zwrócić szczególną uwagę na fakt, że uwolniony w trakcie aminolizy alkohol jest na tyle silnie aktywowany przez aminę, że w mieszaninie reakcyjnej obserwuje się produkty transestryfikacji z jego udziałem jako główne, trwałe produkty finalne.

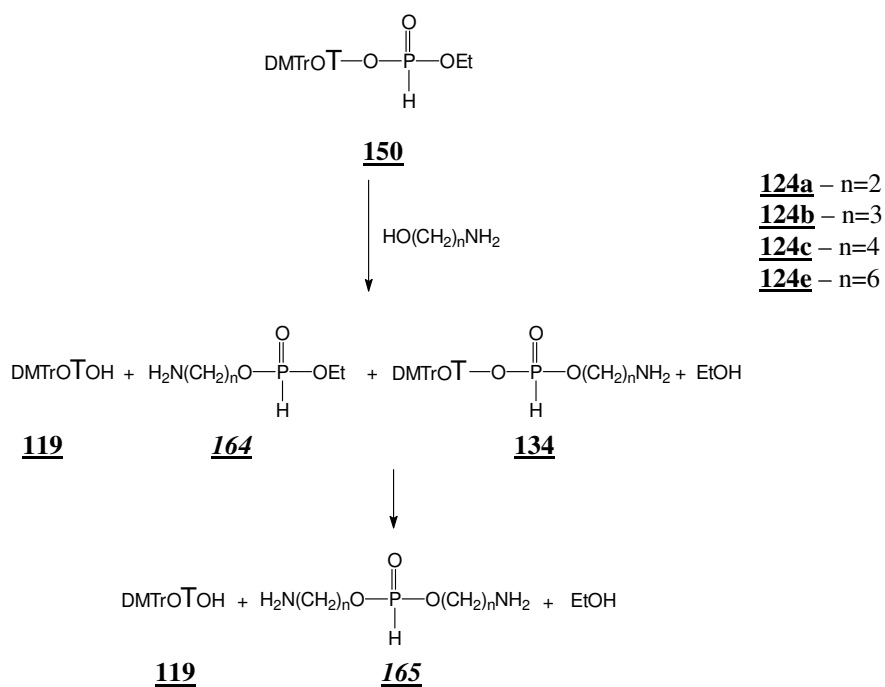
(c) Reakcje z mieszaniną etanolu i n-butyloaminy

Stosując ekwimolarną mieszaninę butyloaminy i etanolu spodziewałem się uzyskać dodatkowe informacje potwierdzające poprawność założeń i wniosków z eksperymentów, w których te różne nukleofile były stosowane osobno. Ponadto, taka mieszanina alkoholu i aminy stanowi międzycząsteczkowy układ binukleofilowy, a wyniki otrzymane z jej zastosowaniem mogą dostarczyć wstępnych danych o właściwościach aminoalkoholi w reakcjach transestryfikacji H-fosfonianowych diestrów nukleozydów.

Reakcja H-fosfonianu nukleozydowo – etylowego **150** z ekwimolarną ilością etanolu i butyloaminy (po 10 ekw.) zachodziła kilkakrotnie szybciej niż te, w których etanol i amina były stosowane oddzielnie. W czasie dziesięciu godzin substrat przereagował całkowicie, a jedynymi otrzymanymi produktami był fosfonian dietylowy **161** i nukleozyd **119** (Schemat 33). Monitorując (³¹P NMR) reakcję w czasie nie stwierdziłem powstawania teoretycznie możliwych pośrednich produktów aminolizy. Dodatkowym potwierdzeniem braku udziału amidofosfonianu nukleozydu **163** jako produktu pośredniego jest wcześniej opisana jego reakcja w podobnym układzie, w której powstają trwałe produkty – H-fosfonian dietylowy **161** i amidofosfonian etylowy **163**. Ponieważ w omawianym doświadczeniu tego ostatniego związku nie obserwowano, pozwala to twierdzić, że etanol silnie aktywowany butyloaminą (generowanie jonu etoksyłowego) jest reagentem zdecydowanie dominującym, w wyniku czego otrzymuje się bezpośrednio produkt transestryfikacji **161** bez udziału amidofosfonianów nukleozydów typu **163** jako produktów pośrednich.

(d) Reakcje z aminoalkoholami

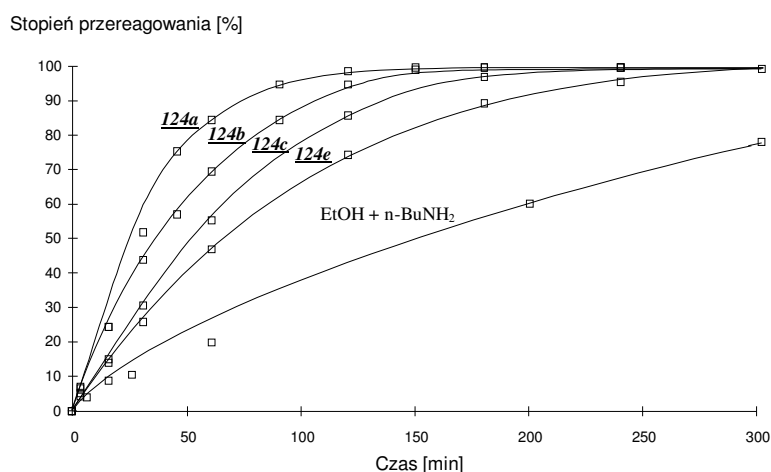
Jako ostatnie badałem reakcje H-fosfonianu nukleozydowo – etylowego **150** z aminoalkoholami **124a** – **c** i **e**. Podobnie jak w poprzednich eksperymentach, stosowałem 10 ekw. aminoalkoholu i reakcje prowadziłem w pirydynie.



SCHEMAT 34

W przypadku aminoetanolu **124a** po 2 godz. stwierdziłem całkowite przereagowanie substratu **150** do nienukleotydowego di(aminoetylo)-H-fosfonianu **165a** i nukleozydu **119** (Schemat 34). Śledzenie przebiegu reakcji (^{31}P NMR) w czasie ujawniło powstawanie jednego produktu pośredniego – aminoetylo-H-fosfonianu etylowego **164a**. Wydawać się więc mogło, że reakcja zachodzi chemoselektywnie z podstawieniem nukleozydu. Jednakże eksperyment, w którym aminoetylo-H-fosfonian nukleozydu **134a** (otrzymany przez transestryfikację arylo-H-fosfonianu nukleozydowego; omówienie w dalszej części rozprawy) traktowano nadmiarem aminoetanolu (10 ekw.), wykazał że pochodna **134a** ulega transestryfikacji do symetrycznego diestru **165a** w czasie 2 min. Jeżeli w szeregu reakcji **150** \rightarrow **134a** \rightarrow **165a** pierwsza reakcja (**150** \rightarrow **134a**) jest wolna, a reakcja następcza (**134a** \rightarrow **165a**) zdecydowanie szybsza, to nie będziemy obserwować pośredniego produktu **134a**, gdyż z chwilą jego powstania będzie on ulegał dalszej transestryfikacji do finalnego produktu **165a**. Nie można więc wykluczyć, że omawiana reakcja **150** \rightarrow **165a** zachodzi dwukierunkowo, z udziałem diestrów **134a** i **164a** jako produktów pośrednich, przy czym w trakcie reakcji obserwujemy jedynie ten ostatni związek, gdyż wolniej ulega on dalszej transestryfikacji do symetrycznego diestru **165a**.

Wyższe homologi aminoetanolu, 3-aminopropan-1-ol (**124b**), 4-aminobutan-1-ol (**124c**) i 6-aminoheksan-1-ol (**124e**) reagowały podobnie, jednak w trakcie reakcji jako produkty pośrednie, obok H-fosfonianów typu **164**, widoczne były diestry nukleozydowo – aminoalkilowe typu **134**. W miarę wydłużania się łańcucha polimetylenowego szybkości reakcji stopniowo malały, zbliżając się do szybkości reakcji mieszaniny etanolu i *n*-



WYKRES 1. Czas rozkładu H-fosfonianu nukleozydowo – etylowego **150** wobec aminoalkoholi (10 ekw.) w pirydynie

butyloaminy. Czasy całkowitego przereagowania substratu **150** wynosiły 3 h dla **124b**, 4 h dla **124c** i 5 h dla **124e**. Przebieg poszczególnych reakcji w czasie przedstawiono na Wykresie 1.

Produktami końcowymi transestryfikacji były symetryczne diestry typu **165** i nukleozyd **119**. W przypadku pochodnych aminoetylowych i aminobutylowych diestry typu **134**, **164** i **165** ulegały powolnej przemianie do produktów rezonujących w zakresie 3 – 4 ppm, których struktury nie udało mi się ustalić.

Otrzymane wyniki wskazują, że reaktywność aminoalkoholi maleje wraz ze wzrostem długości łańcucha polimetylenowego oddzielającego funkcje hydroksylową od aminowej i jest odwrotnie proporcjonalna do ich zasadowości (Tabela 10). Ponadto, podobnie jak w doświadczeniach z mieszaną alkoholu i aminy, w żadnym z przypadków nie znaleziono produktów zawierających wiązania P-N.

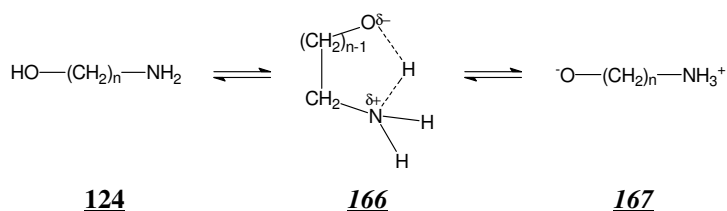
Taki stan rzeczy można tłumaczyć udziałem formy jonu obojnego w strukturze aminoalkoholi (Schemat 35). Zakładając, że efektywnym nukleofilem w reakcji transestryfikacji jest jon alkoksyłowy aminoalkoholu, to szybkość reakcji transestryfikacji będzie wzrastała wraz ze wzrostem udziału formy zwitterjonu **167** w strukturze aminoalkoholi. Można sądzić, że udział tej formy będzie wzrastał wraz z zasadowością grupy -NH₂ aminoalkoholu. Jednakże eksperymenty wykazały, że modelowy diester **150** ulega transestryfikacji najszybciej

Związek	pK _a	Czas reakcji z 150 [h]
aminoetanol 124a	9,51	2
aminopropanol 124b	9,96	3
aminobutanol 124c	10,35	4
aminopentanol 124d	10,46	–
aminoheksanol 124e	10,60	5
<i>n</i> -butyloamina	10,66	10 ^a
trietyloamina	11,01	60 ^a

^a Reakcja z etanolem wobec aminy

TABELA 10. Wartości pK_a¹³³ i czasy reakcji z diestrem **150** wybranych aminoalkoholi i etanolu wobec amin

w przypadku aminoalkoholi o najniższej zasadowości tj. **124a** i **124b**. Jest bardzo prawdopodobne, że transfer protonu z funkcji hydroksylowej na aminową w aminoetanolu (**124a**) i 3-aminopropan-olu-1 (**124b**) zachodzi wewnątrzcząsteczkowo poprzez przejściowe 5-cio- (dla **124a**) i 6-cio- (dla **124b**) członowe struktury cykliczne typu **166**, co może znacznie ułatwiać przechodzenie w formę jonów obojnaczych typu **167**. W przypadkach, gdzie funkcje aminową i hydroksylową oddziela większa liczba grup metylenowych, udział wewnątrzcząsteczkowych struktur cyklicznych zanika i przechodzenie w formę jonu obojnaczego odbywa się poprzez mniej efektywne oddziaływania międzycząsteczkowe. W rezultacie, pomimo wyższej zasadowości aminoalkoholi **124c** i **124e**, stężenie postulowanego zwitterjonu jest niższe i w konsekwencji aminoalkohole te są mniej reaktywne w reakcjach transestryfikacji. Postulat jonu alkoksylowego jako najbardziej reaktywnego nukleofila może tłumaczyć powstawanie w reakcjach transestryfikacji wyłącznie fosforestrów, a proponowane różnice trwałości takich struktur tłumaczyłyby szereg reaktywności aminoalkoholi.



SCHEMAT 35

Jednoznaczne potwierdzenie występowania struktur jonów podwójnych w aminoalkoholach byłoby, jak sądzę, bardzo trudne. Chcąc chociaż częściowo dowieść poprawności powyższych założeń, wybrałem metodę pośrednią. Założyłem, że jeżeli stężenie jonu alkoksylowego aminoalkoholu odpowiedzialne jest za szybkość transestryfikacji, to wprowadzenie do środowiska reakcji mocnej zasady (trietyloaminy) powinno w przypadku aminoetanolu reakcję spowolnić (hamowanie tworzenia przejściowej struktury **166**), a w przypadku aminoheksanolu przyspieszyć (trietyloamina jako silniejsza zasada niż grupa $-\text{NH}_2$ aminoheksanolu może efektywniej deprotonować funkcję $-\text{OH}$). Wyniki takich doświadczeń, w których obok aminoalkoholi użyłem 10 ekw. trietyloaminy były nadszpiewanie zgodne z założeniami, gdyż szybkość reakcji transestryfikacji diestru **150** aminoetanolem zmniejszyła się (całkowite przereagowanie substratu – 3 godz.) a dla aminoheksanolu wzrosła (całkowite przereagowanie substratu – 3,5 godz.). Tak więc, trietyloamina znacznie osłabiła efekty wynikające ze struktury aminoalkoholi i w konsekwencji szybkości reakcji były porównywalne.

W przypadku aminoetanolu i w mniejszym stopniu aminopropanolu należy przedyskutować także sprawę wpływu efektu indukcyjnego na nukleofilowość atomu tlenu w bardzo różnych elektronowo tautomerach hydroksy–amino typu **124** i okso–amionio typu **167**. W

tautomerze **124a** i **124b** funkcja $-NH_2$ jest grupą elektrono-donorową wzmagającą nukleofilowość atomu tlenu reszty hydroksylowej. Natomiast protonowana funkcja aminowa w tautomerach **167a** i **167b** jest grupą elektrono-akceptorową. Efekt indukcyjny w przypadku struktur zwitterjonów **167a** i **167b** powinien obniżać ich reaktywność w porównaniu z anionami aminoalkoksyłowymi $[O(CH_2)_nNH_2]$. Prawdopodobnie tak jest, ale ten sam efekt indukcyjny powinien także mieć wpływ stabilizujący tautomer okso-amonio typu **167**, prowadząc do wzrostu jego globalnego stężenia w mieszaninie reakcyjnej, co w przypadku aminoalkoholi może być czynnikiem decydującym o szybkości transestryfikacji H-fosfonianodiestrów.

Mając powyższe na uwadze, sędzę, że różnice reaktywności różnych aminoalkoholi w reakcjach transestryfikacji są wypadkową powyżej diskutowanych efektów i wynikają one z ich właściwości strukturalnych i fizykochemicznych.

(2) Reakcje H-fosfonianu nukleozydowo – cyjanoetylowego

H-Fosfonian 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylowo – 2-cyjanoetylowy **152** jako modelowy diester do badań nad transestryfikacją wybrano z dwóch powodów:

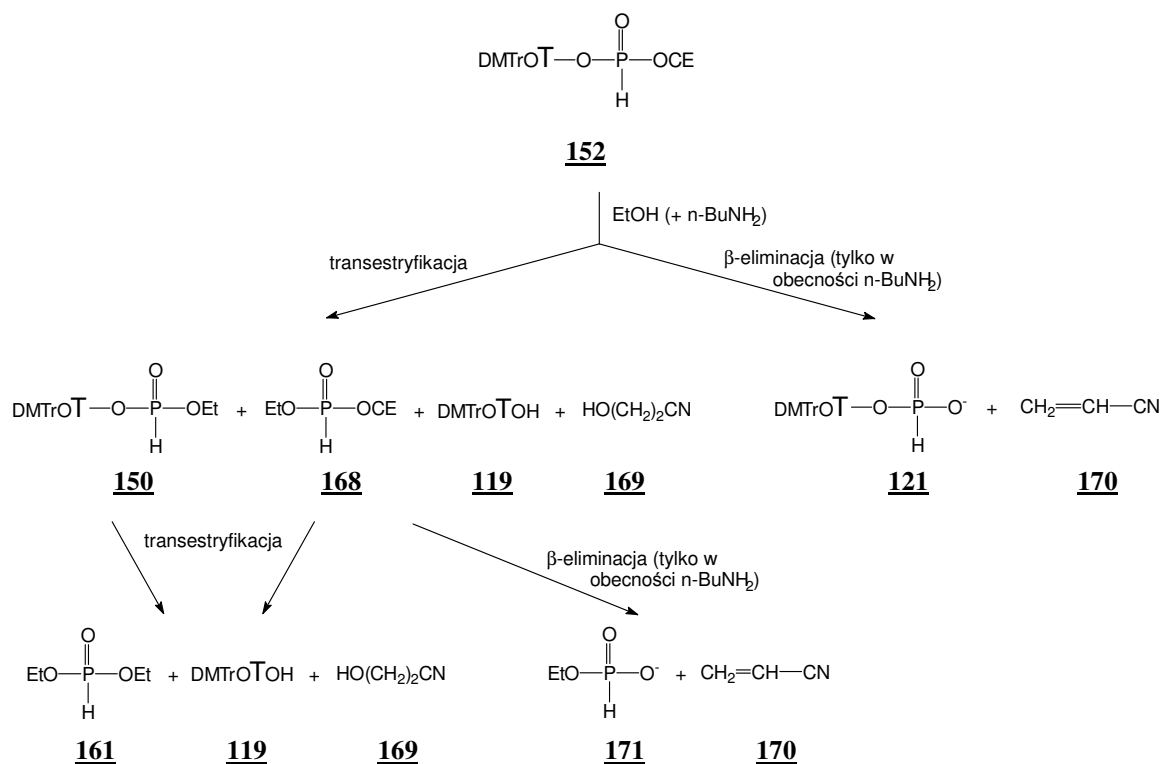
1. 2-Cyjanoetylowe pochodne fosforanów są użyteczne syntetycznie (stosunkowo łatwe usuwanie grupy 2-cyjanoetylowej z fosforano-tri- i diestrów);
2. Grupa 2-cyjanoetylowa w porównaniu z etylową powinna wzmacniać elektrofilowość centrum fosforowego, co pozwoli na oszacowanie wpływu podstawników wyciągających elektrony na aktywność centrum fosforowego i na selektywność w reakcjach transestryfikacji.

(a) Reakcje z etanolem i *n*-butyloaminą

2-Cyjanoetylo-H-fosfonian nukleozydu **152** (Schemat **36**) traktowany etanolem (10 ekw.) w pirydynie reagował wielokrotnie szybciej ($t_{1/2} = 15$ h) w porównaniu z analogiem etylowym ($t_{1/2} = 14$ dni) do diestrów: nukleozydowo – etylowego **150** i etylowo – 2-cyjanoetylowego **168**. W mieszaninie reakcyjnej można było zauważyć (^{31}P NMR) niewielkie ilości (~3%) H-fosfonianu dietylowego **161** powstałego w następczych reakcjach transestryfikacji. Stosunek produktu **150** do **168** wynoszący 3 : 1 świadczy o tym, że grupa 2-cyjanoetoksylova ulega podstawieniu łatwiej niż nukleozyd. Tak więc, w porównaniu z analogiem etylowym **150**, reakcje transestryfikacji 2-cyjanoetylo-H-fosfonianu nukleozydu **152** etanolem zachodziły wielokrotnie szybciej i z „odwróconą” chemoselektywnością.

Jedynym produktem otrzymanym w reakcji diestru **152** z nadmiarem (10 ekw.) *n*-butyloaminy był H-fosfonian nukleozydu **121**, produkt β -eliminacji grupy 2-cyjanoetylowej. Całkowite przereagowanie substratu **152** obserwowano po 30 min., a w mieszaninie poreakcyjnej nie znaleziono (^{31}P NMR) potencjalnie możliwych produktów aminolizy. Tak więc, reakcja β -eliminacji grupy 2-cyjanoetylowej butyloaminą z substratu **152** jest ok.

dwustukrotnie szybsza niż prowadzona także w pirydynie reakcja transestryfikacji tego związku etanolem.



SCHEMAT 36

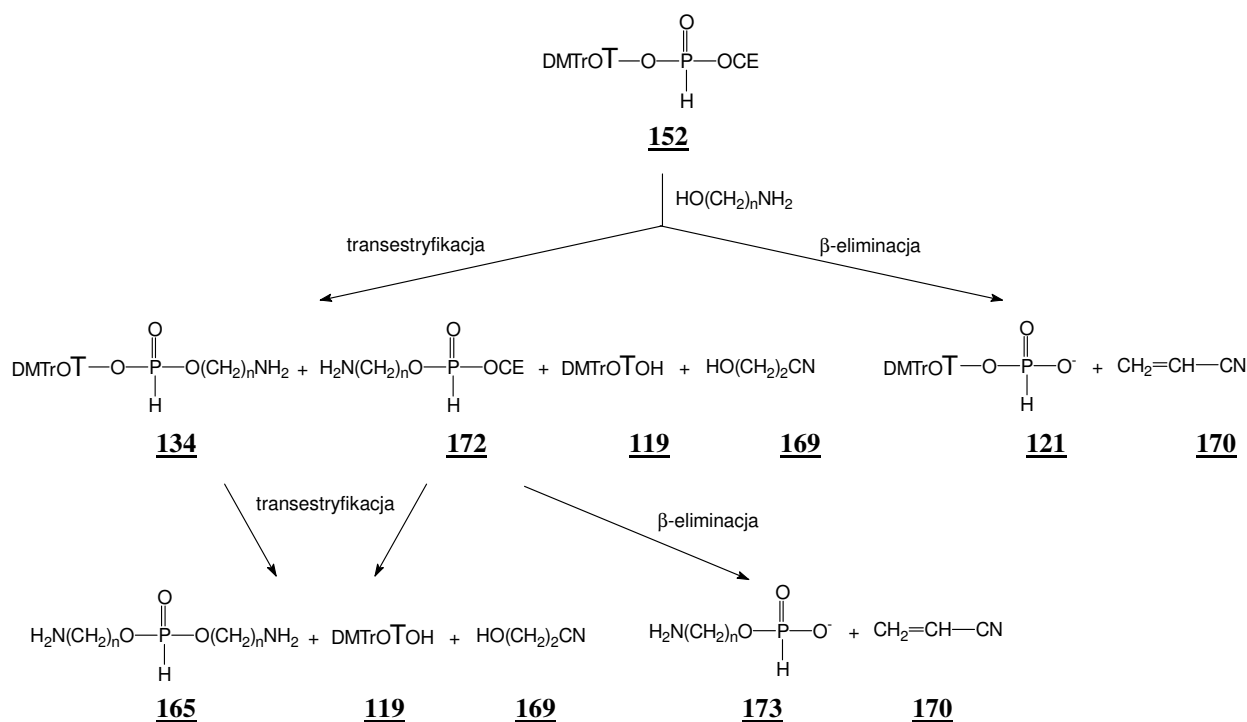
Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, dość nieoczekiwane rezultaty otrzymałem, traktując diester **152** mieszaniną etanolu i butyloaminy (po 10 ekw.). W tej szybkiej reakcji (całkowite przereagowanie substratu po ~2 min.) powstały głównie produkty transestryfikacji **150** i **168** (90%), ponownie w stosunku 3 : 1 i jedynie niewielka ilość (10%) H-fosfonianu nukleozydu **121** (produkt β -eliminacji). Jak można było się spodziewać, produkty **150** i **168** ulegały następczym reakcjom do H-fosfonianu dietylowego **161** (transestryfikacja) i H-fosfonianu etylowego **171** (β -eliminacja). Podobnie jak w przypadku etylo-H-fosfonianu nukleozydu **150** traktowanym mieszaniną etanolu i butyloaminy, także i w tym eksperymencie wyraźnie zaznacza się przewaga reakcji transestryfikacji nad pozostałymi typami możliwych reakcji (aminoliza czy β -eliminacja).

Proponowana wcześniej interpretacja właściwości estryfikujących mieszanin alkoholi i amin potwierdziła się także i w przypadku 2-cyanoetylowego diestru **152**. Bardzo wyraźnie widoczne różnice szybkości reakcji transestryfikacji w porównaniu z analogiem etylowym **150** (2 min. vs 10 h) można przypisać oddziaływaniu reszty 2-cyanoetylowej, która wzmacnia

elektrofilowość, a tym samym reaktywność centrum fosforowego substratu **152** w reakcjach substytucji nukleofilowej.

(b) *Reakcje z aminoalkoholami*

2-Cyanoetylo-H-fosfonian nukleozydu **152** reagował z aminoalkoholami **124a – c** i **124e** bardzo szybko i po czasie koniecznym do rejestracji pierwszego widma ^{31}P NMR (< 2 min.) obserwowałem całkowite przereagowanie substratu.



SCHEMAT 37

W przypadku reakcji **152** z aminoetanolem w pierwszym zarejestrowanym widmie znaleziono cztery produkty – H-fosfonian 2-aminoetylowo – nukleozydowy **134a** (25%), H-fosfonian 2-aminoetylowo – 2-cyanoetylowy **172a** (5%) i produkt główny, symetryczny H-fosfonian di(2-aminoetylowy) **165a** (59%) oraz H-fosfonian nukleozydu **121** (10%) (Schemat 37). H-Fosfonian nukleozydu **121** jest produktem reakcji β-eliminacji grupy 2-cyanoetylowej z substratu **152**, a diestry **134a**, **172a** i **165a** są produktami transestryfikacji. Na podstawie stosunków ilościowych produktów poszczególnych typów reakcji można wnioskować, że podobnie jak w przypadku stosowania mieszaniny etanolu i butyloaminy, reakcją główną jest transestryfikacja (90%). Z kolei, stosunek ilościowy produktów transestryfikacji **134a** i **172a** (5 : 1) wskazuje, iż reszta 2-cyanoetoksylowa łatwiej ulega substytucji niż nukleozyd. Przy stosowanym nadmiarze **124a** zachodzi szybka następcza reakcja transestryfikacji diestrów **134a** i **172a** do symetrycznego H-fosfonianu di(aminoalkilowego) **165a** i równoległa, wolniejsza reakcja β-eliminacji reszty 2-cyanoetylowej z **172a** do monoestru **173a**. Po ok. 10 min.

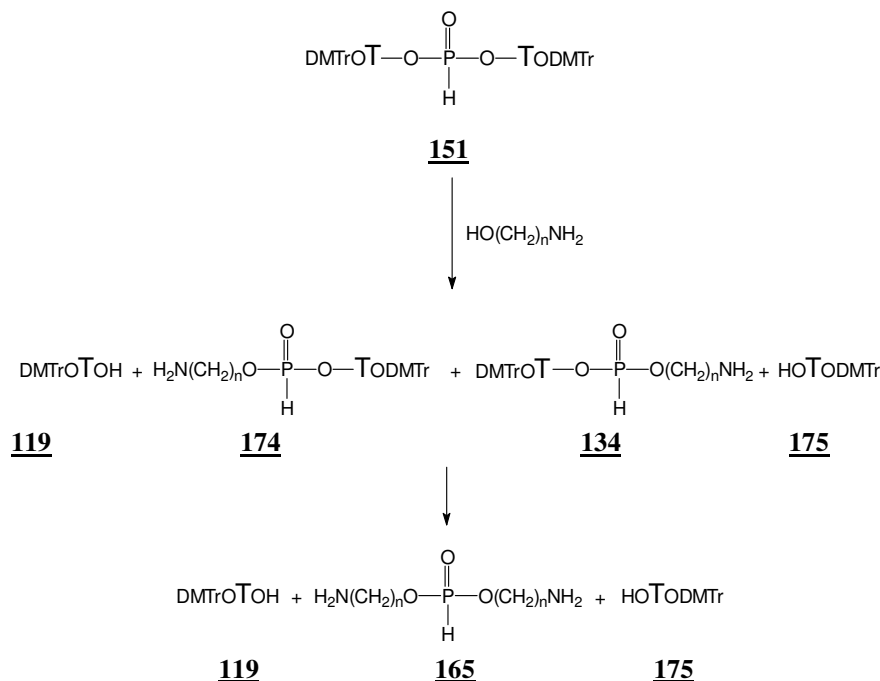
finalnymi produktami reakcji diestru **152** z 2-aminoetanolem były H-fosfonian di(2-aminoetylowy) **165a** oraz monoestry **121** i **173a**.

W przypadku aminoalkoholi **124b**, **124c** i **124e** obserwowano podobny przebieg transestryfikacji i równoległej β -eliminacji. Jednakże następcze reakcje transestryfikacji związków typu **134** i **172** do symetrycznych di(aminoalkilo)-H-fosfonianów typu **165** jako finalnych produktów zachodziły zdecydowanie wolniej (**124b** – 90 min., **124c** – 120 min. i **124e** – 180 min.) niż w przypadku 2-aminoetanolu.

(3) Reakcje H-fosfonianu dinukleozydowego z aminoalkoholami

Ponieważ w przyszłych eksperymentach biorę pod uwagę możliwość stosowania aminoalkoholi do funkcjonalizacji oligonukleotydów zawierających jedno lub więcej internukleotydowych wiązań H-fosfonianodiestrowych, w których wiązania te będą eksponowane na nadmiar aminoalkoholi, podjąłem badania nad reaktywnością aminoalkoholi względem dinukleozydo-H-fosfonianów typu **151** (Schemat 38).

H-Fosfonian **151** traktowany aminoalkoholami **124a** – **c** i **124e** we wszystkich przypadkach ulegał na pierwszym etapie transestryfikacji do 3' i 5' aminoalkilo-H-fosfonianów nukleozydów typu **134** i **174** oraz nukleozydów **119** i **175**. Całkowite przereagowanie substratu **151** przy dziesięciokrotnym nadmiarze molowym aminoalkoholu, wymagało dla

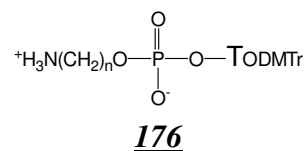


SCHEMAT 38

124a – 15 min., dla **124b** – 60 min., dla **124c** – 240 min. i dla **124e** – 360 min. Z chwilą przereagowania substratu **151**, głównymi produktami obecnymi w mieszaninach reakcyjnych były symetryczne diaminoalkilo-H-fosfoniany typu **165**, produkty następczej reakcji

transestryfikacji nukleotydowych pochodnych typu **134** i **174** powstałych w pierwszym etapie z substratu **151**. Na uwagę zasługuje fakt, że produkty **134** i **174** powstawały w prawie równych ilościach, co świadczy o braku chemoselektywności transestryfikacji H-fosfonianu dinukleozydowego.

Strukturę nieznaną dotąd 5'-(aminoalkilo)-H-fosfonianów nukleozydu typu **174** ustaliłem przez porównanie z identycznymi produktami otrzymanymi inną metodą¹³⁴. Ze względu na ich nietrwałość, przed izolacją utleniałem je do trwałych aminoalkilofosforanów nukleozydów **176**.



(4) Reakcje transestryfikacji i aminolizy H-fosfonianu nukleozydowo – *p*-chlorofenylogo

Wyniki dotychczasowych prac nad reakcjami substytucji na centrum fosforowym diestrów H-fosfonianowych wskazują, że szybkość i chemoselektywność tych reakcji zależy od charakteru grup związanych z atomem fosforu. Szybkości reakcji transestryfikacji i aminolizy różniły się drastycznie i wzrastały z elektronossącym charakterem podstawników przy atomie fosforu. W tym samym szeregu zmieniała się także chemoselektywność reakcji na korzyść pochodnych nukleotydowych. Można zakładać, że wprowadzenie na centrum fosforowe grupy jeszcze silniej wyciągającej elektrony powinno przyspieszyć reakcje substytucji i być może, zapewnić ich całkowitą chemoselektywność w kierunku tworzenia alkilo- lub aminoalkilo-H-fosfonianów nukleozydów, a także amidofosfonianów nukleozydów.

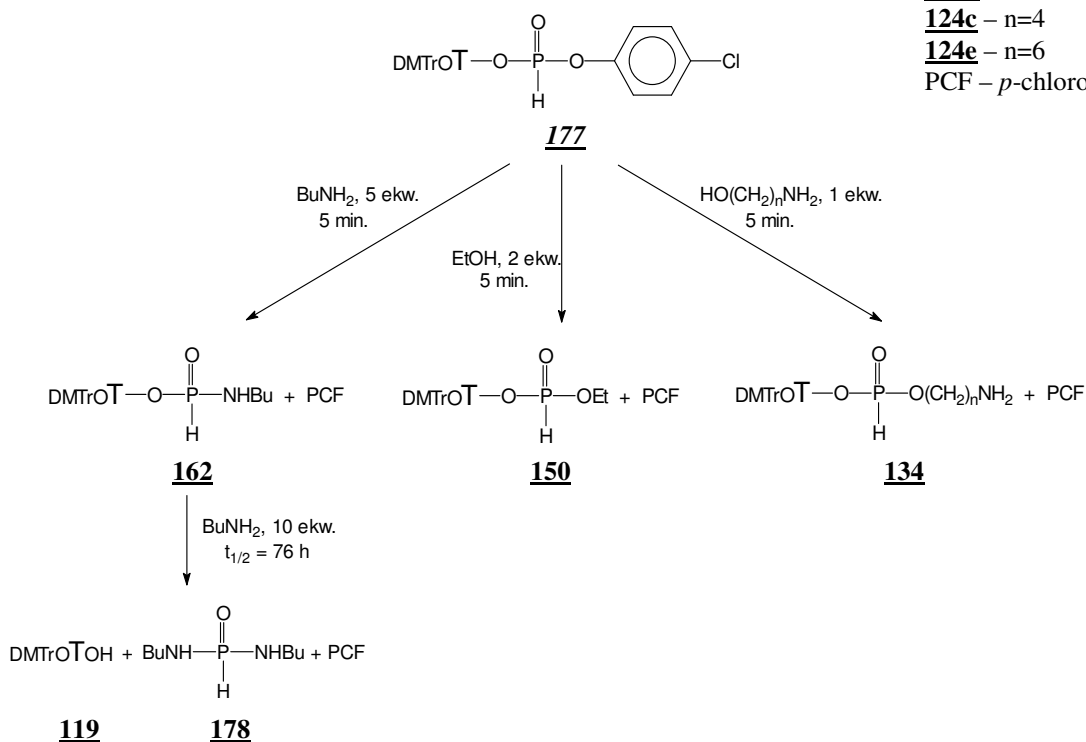
124a – n=2

124b – n=3

124c – n=4

124e – n=6

PCF – *p*-chlorofenol



SCHEMAT 39

Powyższe kryteria może spełniać odpowiednia funkcja arylova, np. *p*-chlorofenylova, która ponadto jest zdecydowanie lepszą grupą odchodzącą (anion aryloksylowy stabilizowany energią rezonansu) w porównaniu z grupami etoksylova czy 2-cyjanoetoksylova.

Dla sprawdzenia poprawności tych założeń, badałem podatność *p*-chlorofenilo-H-fosfonianu nukleozydu **177** na substytucję alkoholami, aminami i aminoalkoholami (Schemat 39). Ze względu na nietrwałość diestru **177** w warunkach przerobu i izolacji, wygenerowałem go *in situ* przez kondensację *p*-chlorofenolu i H-fosfonianu nukleozydu **121** wobec chlorku piwaloiłu w pirydynie (kondensacja standardowa).

W przypadku etanolu wystarczył niewielki jego nadmiar (2 ekw.) by transestryfikacja diestru arylowego **177** zaszła ilościowo w ciągu zaledwie 5 minut. Reakcja przebiegała czysto i z pełną chemoselektywnością do H-fosfonianu etylowo – nukleozydowego **150**.

Aminoalkohole **124a** – **c** i **e**, bez względu na długość mostka polimetylenowego i używane w ilościach ekwimolarnych, reagowały z substratem **177** równie szybko (5 min.), tworząc wyłącznie produkty transestryfikacji – odpowiednie aminoalkilo-H-fosfoniany nukleozydów **134a** – **c** i **e**. Całkowitą chemoselektywność tej reakcji można tłumaczyć udziałem postulowanej wcześniej formy zwitterjonu aminoalkoholu. Jednakże, należy rozważyć także drugą możliwość tj. fakt, że aminoalkohol dodawany był do mieszaniny reakcyjnej, w której po kondensacji fenolu i H-fosfonianu nukleozydu **121**, obecne były kwasowe produkty (chlorowodorek pirydyny, kwas piwalowy). W takich warunkach aminoalkohol mógł ulegać szybkiemu N-protonowaniu (osłabienie nukleofilowości funkcji -NH₂) i tej formie reagować z diestrem **177** wyłącznie do produktu estrowego **134**, a nie amidofosfonianu. Bez względu na to, który z czynników decyduje o chemoselektywności omawianej reakcji, jej produktami są aminoalkilo-H-fosfoniany nukleozydów typu **134** i powyższa procedura może być uznana jako alternatywna (*vs* opisana w poprzedniej części rozprawy, bezpośrednia kondensacja aminoalkoholi i H-fosfonianów nukleozydów aktywowanych chlorofosforanami), bardzo efektywna metoda syntezy związków typu **134** i ich pochodnych.

Arylo-H-fosfonian nukleozydu **177** traktowany *n*-butyloaminą (5 ekw.) reagował tak samo szybko (5 min.) jak etanol czy aminoalkohole i także z całkowitą chemoselektywnością, tworząc jeden produkt – amidofosfonian nukleozydu **162**. Zakładając, że większa część (~3 ekw.) użytego nadmiaru aminy w wyniku protonacji (obecne po kondensacji, chlorowodorek pirydyny i kwas piwalowy) mogła być przekształcona w mniej aktywną sól amoniową, to pozostały niewielki nadmiar wolnej aminy (~2 ekw.) wystarczył do szybkiej aminolizy substratu **177**. Mając na uwadze szybkość, chemoselektywność i czystość omawianej reakcji można polecać arylo-H-fosfoniany nukleozydów jako uniwersalne substraty do syntezy amidofosfonianów nukleozydów typu **162**, które z nielicznymi wyjątkami¹³⁵ były jak dotąd niedostępne.

Stosowanie większych nadmiarów etanolu i aminoalkoholi powodowało wcześniej już opisane reakcje następcze prowadzące do nienukleotydowych, symetrycznych diestrów **161** i

165. Przy dużych nadmiarach (10 – 20 ekw.) butyloaminy, powstały na pierwszym etapie amidofosfonian nukleozydu **162** ulegał dalszej powolnej ($t_{1/2} = 76$ h) aminolizie do symetrycznego diamidofosfonianu **178**.

Właściwości *p*-chlorofenylo-H-fosfonianu nukleozydu **177** w reakcjach transestryfikacji i aminolizy w pełni potwierdziły założenia i spodziewane efekty związane z wpływem podstawnika przy atomie fosforu. Reakcje te zachodziły szybko i całkowicie chemoselektywnie, co należy przypisać zarówno aktywacji centrum fosforowego przez wyciągającą elektrony grupę *p*-chlorofenyłową, jak i jej właściwościom jako grupy opuszczającej w reakcjach substytucji.

Z przedstawionych powyżej wyników badań nad reakcjami transestryfikacji i aminolizy diestrów H-fosfonianów wysnuć można kilka wniosków. Uważam, że spontaniczność tych reakcji wynika z charakteru wiązania H-fosfonianodiestrowego. Manewrując środowiskiem lub podstawnikami przy centrum fosforowym można przebieg reakcji kontrolować i ukierunkować. Umożliwia to racjonalne projektowanie substratów (np. arylo-H-fosfonianów nukleozydów), które w łagodnych warunkach pozwalają otrzymywać pochodne trudno osiągalne innymi metodami. Ponadto, otrzymane rezultaty pozwoliły mi dostrzec niebezpieczeństwa i korzyści płynące z wyboru reagentów i podejść, których celem finalnym jest opracowanie nowych metod funkcjonalizacji oligonukleotydów na podłożach stałych lub w roztworze. Wyniki prac nad reakcjami transestryfikacji zostały opublikowane^{132,136-143} w latach 1994 – 1996.

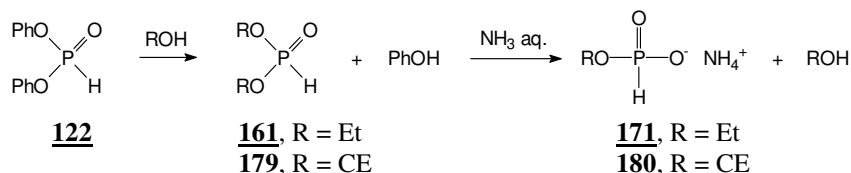
Zdaję sobie sprawę, że przedstawione w tej części rozprawy wyniki badań nad transestryfikacją i aminolizą diestrów H-fosfonianowych nie wyczerpują zagadnienia, ale, moim zdaniem, dostarczyły one istotnych danych jakościowych i ilościowych, które mogą być pomocne w dalszych pracach.

(5) Transestryfikacja fosfonianu difenyłowego alkoholami – synteza H-fosfonianowych monoestrów alkilowych

Realizacja funkcjonalizacji oligonukleotydów według *Wariantu II* wymaga na pierwszym etapie wprowadzenia na koniec 5' oligomeru reszty alkilo-H-fosfonianowej. Najprostszym podejściem wydaje się być przyłączenie odpowiedniego alkilo-H-fosfonianu i po oksydatywnej estryfikacji chlorowodorkiem aminoalkoholu, usunięcie reszty alkilowej z wytworzeniem ugrupowania 5'-aminoalkilofosforanowego. Jednym z monoestrów H-fosfonianowych spełniającym powyższe wymogi może być H-fosfonian 2-cyanoetylowy. Synteza tego monoestru została opisana, jednakże nie udało się go wyizolować i z konieczności był używany w formie surowego produktu⁸⁵. Jedną z nielicznych znanych metod otrzymywania monoestrów H-fosfonianów alkilowych typu **171** jest amoniakalna hydroliza symetrycznych diestrów typu **161**¹⁴⁴. Jednakże, dostępność symetrycznych diestrów alkilowych jest ograniczona (praktycznie jedynie H-fosfonian dietylowy **161**), a inne diestry

muszą być syntetyzowane z PCl_3 i odpowiedniego alkoholu i oczyszczane za pomocą destylacji próżniowej.

Mając na uwadze opisaną w poprzednich rozdziałach niniejszej rozprawy szczególną podatność arylowych diestrów H-fosfonianowych na transestryfikację można zakładać, że handlowo dostępny fosforyn difenyłowy w reakcji z nadmiarem alkoholi będzie ulegał podstawieniu do H-fosfonianów dialkylowych, które następnie, hydrolizowane w odpowiednich



SCHEMAT 40

warunkach, powinny tworzyć alkilowe monoestry typu **171** (Schemat 40). Przeprowadzony według tej koncepcji eksperyment, w którym fosforyn difenyłowy traktowano 2-cyanoetanołem (2 ekw.) w pirydynie prowadził w szybkiej reakcji (< 3 min.) do symetrycznego dialkylowego H-fosfonianu **179** (^{31}P NMR). Diester **179** bez izolacji poddano hydrolizie wodnym roztworem amoniaku (10 min.) do H-fosfonianu 2-cyanoetylowego **180** jako jedyne produktu. Stosując proste i szybkie procedury, związek ten izolowano z wysokimi wydajnościami w formie krystalicznej. Powyższe podejście, w przypadku wielu innych alkoholi dawało równie dobre rezultaty i zostało opublikowane w 1996 r. jako ogólna metoda syntezy różnych H-fosfonianowych monoestrów alkilowych⁸⁶.

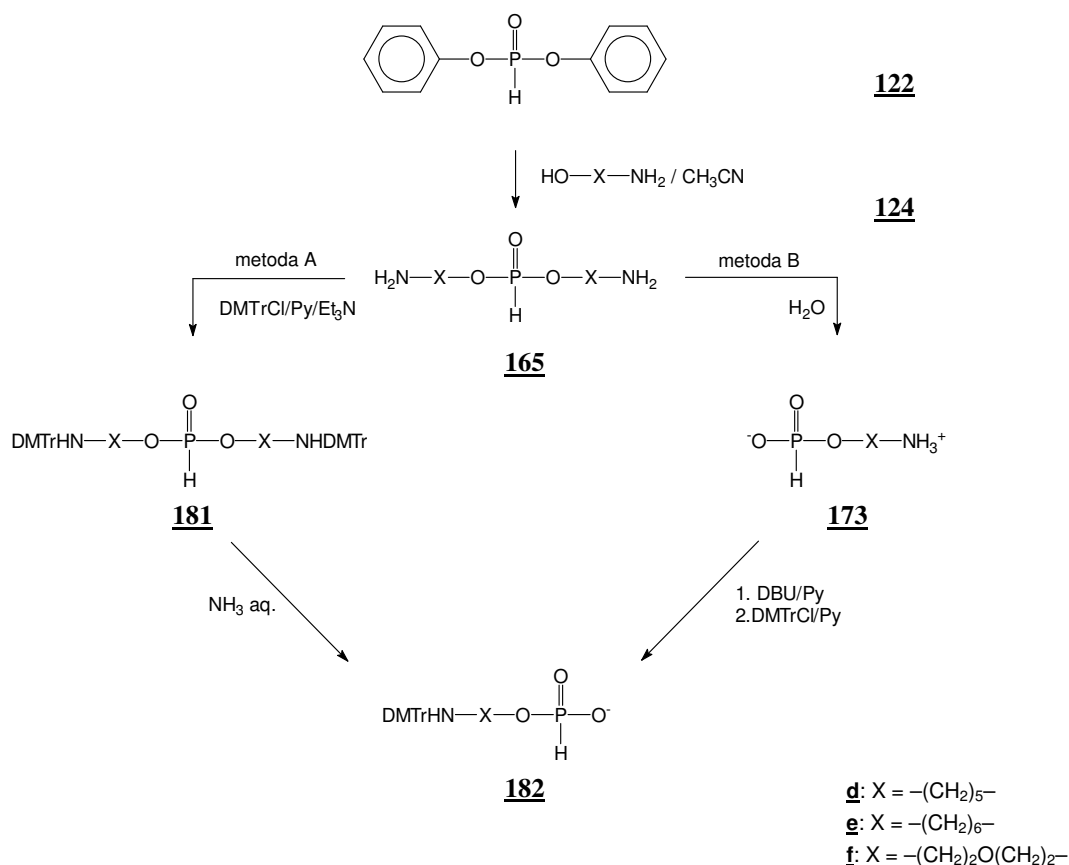
(6) Reakcje transestryfikacji fosforynu difenyłowego aminoalkoholami. Otrzymywanie syntonów nienukleotydowych

Funkcjonalizacja oligonukleotydów według *Wariantu III* wymaga przygotowania syntonu nienukleotydowego – N-chronionego aminoalkilo-H-fosfonianu. Syntezę takich jednostek przeprowadziłem wykorzystując ponownie jako substrat fosforyn difenyłowy, który poddałem transestryfikacji amino-

Amino-alkohol	n	Produkty z wiązaniem P-O ($\delta_{\text{P}} \sim 8 - 9$ ppm) [%]	Produkty z wiązaniem P-N ($\delta_{\text{P}} \sim 13 - 15$ ppm) [%]
124a	2	94	6
124b	3	95	5
124c	4	85	15
124d	5	61	39
124e	6	55	45
124f	x	73	27

TABELA 11. Produkty reakcji aminoalkoholi z fosforynem difenyłowym w pirydynie

mieszaniny produktów, w której oprócz pożądaných diestrów typu **165** obecne były (^{31}P NMR) związki zawierające wiązania P-N (od 6% w przypadku aminoetanolu **124a** do 45% w przypadku 6-aminoheksanolu **124e**; Tabela 11). Natomiast ta sama reakcja w acetonitrylu prowadziła wyłącznie do fosforoestrowych produktów typu **165**, bez różnicy, który aminoalkohol używano do transestryfikacji. Jest prawdopodobne, że przechodzenie ze środowiska zasadowego (pirydyna) do obojętnego (acetonitryl) przesunęła dyskusowaną wcześniej, równowagę form tautomerycznych aminoalkoholu na tyle mocno w kierunku alkoksyłowego jonu obojętnego, że reakcja transestryfikacji jest zdecydowanie dominująca.



SCHEMAT 41

Ponieważ symetryczne diestry typu **165** były jedynymi zawierającymi fosfor produktami transestryfikacji prowadzonej w acetonitrylu, podjąłem próby wprowadzenia *in situ* ochronnej grupy dimetoksytrytylowej na funkcję aminową (Schemat 41, metoda A). Reakcje prowadziłem wobec dodanej pirydyny (1 : 1 v/v) i trietyloaminy (4 ekw.), stosując nieznaczny nadmiar (1,1 ekw. na grupę aminową) chlorku dimetoksytrytylu. Po 16 h N-trytylowany symetryczny diester typu **181** zhydrolizowałem (wodny 32% roztwór amoniaku – 1/2 objętości mieszaniny reakcyjnej) do pożądanego monoestru typu **182**. Pomimo, iż reakcje zachodziły niemalże ilościowo (^{31}P NMR), wydajności końcowych produktów typu **182**, izolowanych chromatograficznie były raczej niskie (40 – 50%).

Niezadowalające wydajności były najprawdopodobniej spowodowane ograniczoną trwałością grupy N-dimetoksytrytylowej w obecności nadmiaru fenolu, w pierwszych fazach chromatografii. Dlatego też podjąłem próby syntezy syntonu nienukleotydowego **182**, zmieniając kolejność poszczególnych etapów (metoda B). Produkt transestryfikacji fosforynu difenylowego, symetryczny H-fosfonian di(aminoalkilowy) **165**, hydrolizowałem, dodając do mieszaniny reakcyjnej niewielką ilość wody (3 ekw.). Reakcja hydrolizy zachodziła wolno (120 h), ale w miarę jej postępu aminoalkilowe H-fosfoniany typu **173** krystalizowały z mieszaniny reakcyjnej z wysokimi wydajnościami (**173d** – 79%, **173e** – 71% i **173f** – 83%). Wprowadzanie grupy dimetoksytrytylowej na funkcję aminową aminoalkilo-H-fosfonianów typu **173** było trudne ze względu na ich bardzo słabą rozpuszczalność w pirydynie (a także innych rozpuszczalnikach organicznych), związaną, jak sądzę, z występowaniem tych związków w formie jonu obojnego. Dodanie do zawiesiny aminoalkilo-H-fosfonianu **173d** – **f** w pirydynie, silnej zasady – DBU, w celu przekształcenia jonu obojnego w formę soli [DBU-H⁺][aminoalkil-O-P(O)HO⁻] radykalnie poprawiło rozpuszczalność substratu, tak że reakcja N-trytylowania zachodziła w układzie homogenym. Produkty **182d** – **f** po standardowym przerobie izolowano na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym z wydajnościami odpowiednio 81, 74 i 89%. Związki **173d** – **f** oraz ich pochodne **182d** – **f** scharakteryzowano metodami spektroskopowymi (¹H i ³¹P NMR) i chromatograficznymi (TLC).

Powyżej opisaną metodę syntezy pochodnych aminoalkoholi (opublikowaną w 1996 roku)¹⁴⁵, angażującą tanie, komercyjne reagenty mogę polecać jako prostą i wydajną metodę syntezy H-fosfonianowych syntonów nienukleotydowych typu **182** o właściwościach chemicznych umożliwiających ich włączanie w regularne cykle syntetyczne metody H-fosfonianowej otrzymywania oligonukleotydów.

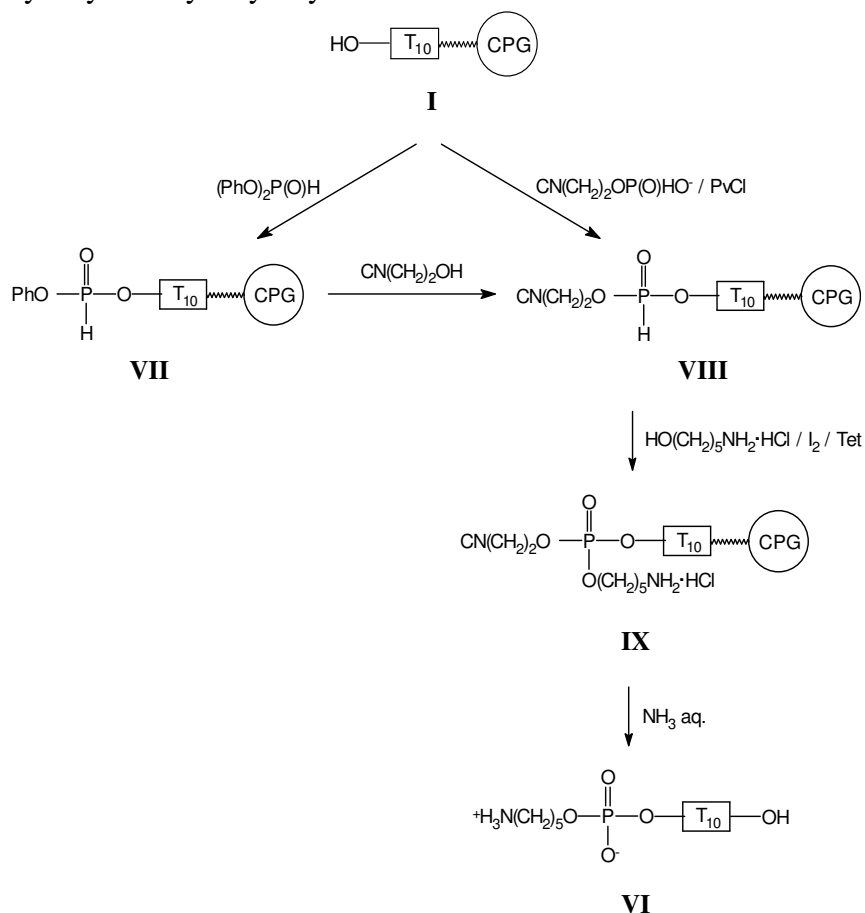
B. Funkcjonalizacja oligonukleotydów na podłożu stałym

Wprowadzanie grup funkcyjnych na koniec 5' oligonukleotydu w reakcji kondensacji oksydacyjnej wymaga, aby na tym końcu oligomeru znajdowała się diestrowa reszta H-fosfonianowa. W łańcuchu oligonukleotydowym natomiast nie mogą znajdować się grupy H-fosfonianowe, które w procesie utleniania również uległyby modyfikacji. Dlatego też według tego podejścia funkcjonalizować można jedynie oligomery otrzymane metodą amidofosforynową. Pierwszym etapem *Wariantu II* jest wprowadzenie grupy alkilo-H-fosfonianowej na koniec 5' oligomeru. Po utlenieniu w obecności chlorowodoru aminoalkoholu, diestrowa grupa H-fosfonianowa przekształci się w triestrową grupę fosforanową. Ponieważ tego typu ugrupowanie jest częściowo nietrwałe w warunkach standardowego odblokowania, należy tak dobrać grupę alkilową, aby podczas traktowania amoniakiem była ona usuwana selektywnie. Te warunki spełnia powszechnie stosowana w chemii oligonukleotydów grupa 2-cyanoetylowa. Na podstawie wcześniej opisanych w niniejszej rozprawie wyników mogę zaproponować dwie metody wprowadzania ugrupowania 2-cyanoetylo-H-fosfonianowego na koniec 5' oligonukleotydów.

a) Synteza 5'-(2-cyanoetylo)-H-fosfonianów oligonukleotydów

(1) Kondensacja z H-fosfonianem 2-cyanoetylowym

W pierwszym podejściu, analogicznym do opisanego przez Venyaminovą i wsp.⁸⁵, założyłem, że wprowadzenie reszty 2-cyanoetylo-H-fosfonianowej do oligonukleotydu **I** powinno zachodzić w standardowych cyklach reakcji stosowanych w syntezie oligonukleotydów metodą H-fosfonianową. W ten sposób, fosfonylacja oligomeru związanego z podłożem będzie rutynowym cyklem syntetycznym.



SCHEMAT 42

Zgodnie z tymi założeniami, oligomer **I** traktowałem H-fosfonianem 2-cyanoetylowym (10min., 0,2 M; 40 μl ; Py- CH_3CN 1:1) w obecności PivCl jako czynnika kondensującego (0,3 M; 80 μl ; Py- CH_3CN 1:1 v/v) (Schemat 42). Analiza (PAGE) surowej mieszaniny reakcyjnej (po usunięciu grup ochronnych) wykazała obecność praktycznie jednego produktu, 5'-H-fosfonianu oligomeru (**II**). Taki wynik wskazuje, że reakcja fosfonylacji w powyższych warunkach zachodzi ilościowo, a otrzymany 5'-(2-cyanoetylo)-H-fosfonian oligonukleotydu może być stosowany do dalszych etapów funkcjonalizacji oligomeru związanego z podłożem.

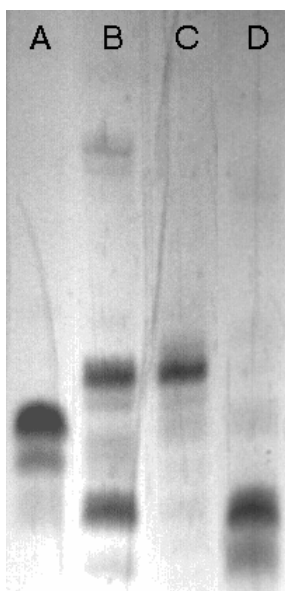
Dodatkową, ważną informacją wynikającą z tego doświadczenia jest to, że otrzymany nową metodą (str. 95), krystaliczny H-fosfonian 2-cyanoetylowy, może być z powodzeniem stosowany jako efektywny i syntetycznie użyteczny czynnik fosfonylujący.

(2) Reakcja z fosforem difenylowym

Drugą badaną metodą syntezy 5'-(2-cyanoetylo)-H-fosfonianów oligomerów typu **VIII** było podejście, w którym na pierwszym etapie zastosowałem fosforin difenylowy w celu wygenerowania, opisanego już w poprzednich częściach rozprawy (str. 76), reaktywnego ugrupowania fenylo-H-fosfonianowego na końcu 5' oligonukleotydu **VII**. Oligomer **VII** poddany transestryfikacji 2-cyanoetanolem (0,2M roztwór w pirydynie; 1 h), przekształcał się ilościowo (PAGE j. w.) w 5'-(2-cyanoetylo)-H-fosfonian oligonukleotydu **VIII**.

Obydwie opisane powyżej metody syntezy 5'-(2-cyanoetylo)-H-fosfonianów oligonukleotydów typu **VIII** okazały się równie skuteczne. Metoda bezpośredniej fosfonylacji aktywowanym (PivCl) H-fosfonianem 2-cyanoetylowym jest szybsza i nie wymaga zmiany oprogramowania jednostki sterującej pracą syntetyzera. Natomiast podejście z użyciem fosforinu difenylowego, nie angażujące chlorku piwaloilu jako czynnika kondensującego, można polecać w przypadkach gdy oligonukleotyd zawiera modyfikowane jednostki nukleotydowe podatne na acylowanie.

b) Kondensacja oksydacyjna



linia A: T₁₀ (I)
linia B: analizowana mieszanina
linia C: 5'-aminopentylo-T₁₀ (VI)
linia D: 5'-H-fosfonian-T₁₀ (II)

ZDJĘCIE 4

utleniania niż spodziewane fosforotriestry. Chodzi o to, że w reakcjach oksydacyjnej

W celu wprowadzenia funkcji aminoalkilowej, oligomer typu **VIII** poddany został działaniu (10 min.) pirydynowego roztworu utleniającego zawierającego: jod (3%), chlorowodorek aminopentanolu (0,2M) i tetrazol (0,5M). Zgodnie z wynikami doświadczeń na związkach modelowych (str. 82), protonowany aminoalkohol powinien przyłączać się chemoselektywnie tworząc fosforotriester. Analiza produktów reakcji po ich odblokowaniu (PAGE, Zdjęcie 4) wykazała obok pożądanego produktu kondensacji (sfunkcjonalizowanego oligonukleotydu **VI**), obecność znacznej ilości (~50%) 5'-fosforanu oligonukleotydu, powstałego, być może, wskutek obecności wody, której zawartości w medium utleniającym nie udało się uniknąć. Kilkakrotne powtarzanie reakcji, w których możliwie starannie przygotowano substraty, prowadziło do bardzo podobnych rezultatów. Można więc przypuszczać, że obok cząsteczek wody, także niedostateczny udział tetrazolu w procesie utleniania może wpływać na powstawanie innych produktów

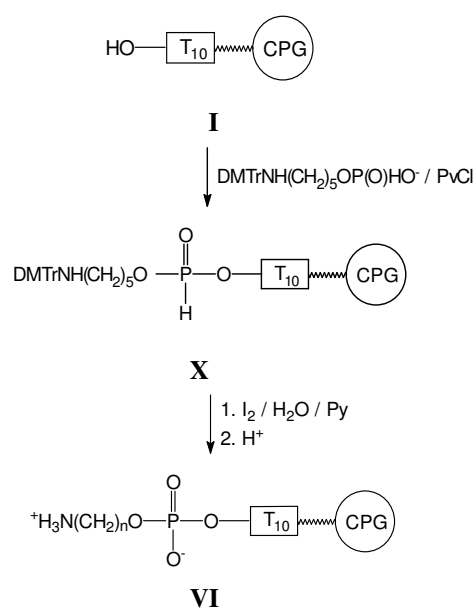
kondensacji prowadzonych w roztworze, tetrazol skutecznie ukierunkowywał te reakcje na powstawanie fosfortriestrów (str. 82). Jest prawdopodobne, że w układzie heterogennym tworzenie domniemanych, przejściowych fosfortetrazolidów jest znacznie utrudnione. W konsekwencji, z utworzonego na pierwszym etapie utleniania jodofosforanu powstają także inne pochodne (np. pirydyniowy addukt fosforodiestru i produkty jego dealkilacji), które uniemożliwiają tworzenie pożądaných fosfortriestrów. Mając na uwadze powtarzalność wyników kilkakrotnie wykonanych reakcji oksydacyjnych kondensacji, sądzę, że niedostateczna efektywność działania tetrazolu jako katalizatora nukleofilowego, w powyższych reakcjach prowadzonych w układzie heterogennym, mogła mieć znaczący (o ile nie decydujący) wpływ na charakter i stosunek ilościowy otrzymanych produktów (fosforodi- i monoestry vs fosfortriestry).

Podsumowując, próby funkcjonalizacji 5'-(2-cyjanoetylo)-H-fosfonianów oligonukleotydów związanych z podłożem stałym na drodze oksydacyjnej kondensacji z aminoalkoholem zakończyły się połowicznym sukcesem. W przeciwieństwie do oksydacyjnej kondensacji przebiegającej w roztworze, w układzie heterogennym reakcje te prowadziły do prawie równomolowych ilości di- i triestrów fosforanowych. Tak więc, na obecnym etapie zaawansowania prac nie mogę polecać tego podejścia jako wydajnej metody syntezy oligonukleotydów sfunkcjonalizowanych grupami aminoalkilowymi.

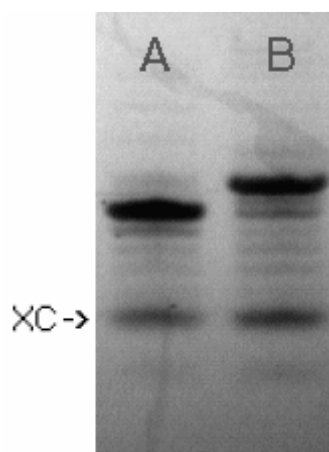
4. BADANIA NAD FUNKCJONALIZACJĄ OLIGONUKLEOTYDÓW WEDŁUG WARIANTU III

Zgodnie z założeniami (Schemat 16), *Wariant III* funkcjonalizacji oligonukleotydów na podłożu stałym polega na bezpośrednim przyłączeniu do oligomeru **I** H-fosfonianu aminoalkilowego typu **182** z odpowiednio chronioną funkcją aminową (Schemat 43). Podejście takie ma kilka zalet: (i) włączenie syntonu nienukleotydowego przebiega zgodnie ze standardowym protokołem syntezy oligonukleotydów metodą H-fosfonianową, (ii) szybka, jednoetapowa funkcjonalizacja, (iii) możliwość kontroli wydajności przyłączenia syntonu (uwolnienie barwnego kationu dimetoksytrytyliowego).

Często dyskutowana niedogodność tego podejścia wiąże się z koniecznością wcześniejszego przygotowania odpowiedniego H-fosfonianu aminoalkilo-



SCHMAT 43



ZDJĘCIE 5

wego. W niniejszej rozprawie niedogodność ta została w znacznej mierze ograniczona, gdyż w przeciwieństwie do znanych metod^{10,54}, synteza syntonu nienukleotydowego typu **182** oparta jest o proste, handlowe substraty bez konieczności ich wcześniejszego przygotowywania (str. 96).

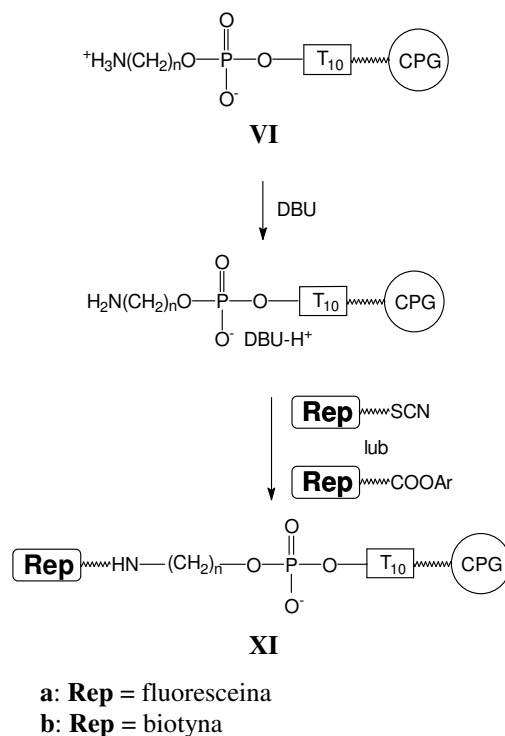
Synton **182d** (0,2M roztwór w CH₃CN–Py 1:1) przyłączyłem do oligomeru **I** (Zdjęcie 5, linia A) stosując standardowe warunki kondensacji metody H-fosfonianowej (0,3M roztwór PivCl w CH₃CN–Py 1:1, 1,5 min.). Niezależnie od metody uzyskania oligomeru wykorzystywanego do funkcjonalizacji, po utlenieniu, odblokowaniu i odtrytylowaniu otrzymywałem 5'-(5-aminopentyl)-fosforan oligonukleotydu **VI** (Zdjęcie 5, linia B) jako praktycznie jedyny produkt.

Tak więc, powyższe podejście jest szybkie i wydajne, w dużej mierze dzięki możliwości łatwego przygotowania H-fosfonianów typu **182**. Biorąc pod uwagę fakt, że przyłączanie syntonu **182** odbywa się w standardowym cyklu syntetycznym kondensacji metody H-fosfonianowej, mogę polecać *Wariant III* jako efektywną metodę funkcjonalizacji oligonukleotydów związanych z podłożem stałym.

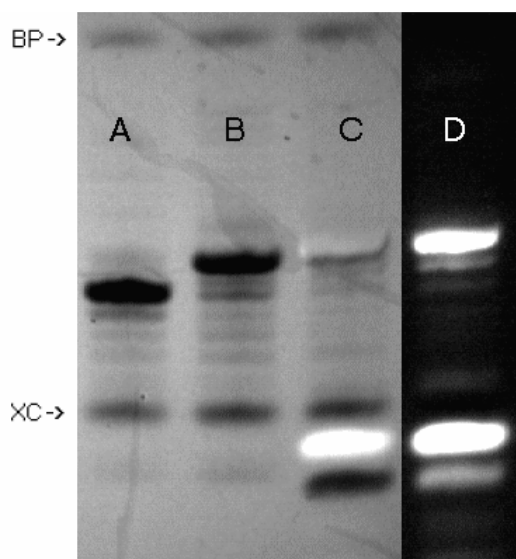
5. WŁĄCZANIE GRUP REPORTEROWYCH DO SFUNKCJONALIZOWANYCH OLIGOMERÓW

Ostatnim etapem syntezy nieradioizotopowych sond molekularnych jest przyłączenie grupy reporterowej do odpowiednio sfunkcjonalizowanego oligonukleotydu. O ile pozwalają na to właściwości chemiczne danej grupy (odporność na warunki odblokowania oligomeru), korzystne jest przeprowadzenie tego procesu na oligonukleotydzie wciąż połączonym z podłożem stałym. Upraszcza to bowiem procedurę dalszego oczyszczania sondy.

We wstępnych eksperymentach, w których 5'-aminoalkilo-oligonukleotyd **VI** traktowany był izotiocyanianem fluoresceiny lub estrem 4-nitrofenylowym biotyny, znakowany oligomer **XI** uzyskiwany był ze stosunkowo niskimi wydajnościami (~20%, PAGE), niezależnie od stężenia reagentów i czasu reakcji.



SCHEMAT 44



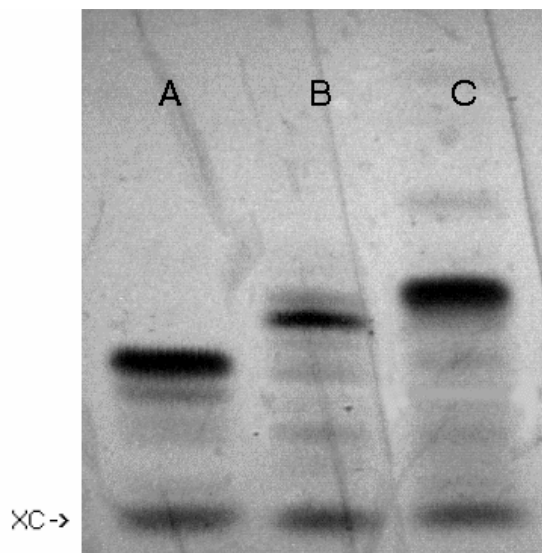
ZDJĘCIE 6

linia A: T₁₀ (**I**)
linia B: 5'-aminopentyl-T₁₀ (**VI**)
linia C: **XIa**, λ=254 nm
linia D: **XIa**, λ=366 nm

Przypuszczałem, że niska wydajność powyższych reakcji związana jest ze strukturą jonu obojnaczej reszty aminoalkilo-fosforanowej. W tego typu zwitterjonie funkcja aminowa jest sprotonowana, co znacznie obniża jej reaktywność jako nukleofila. Założyłem, że dodanie silnej zasady np. DBU spowoduje przekształcenie struktury zwitterjonu w parę jonową: kation DBUH⁺ i anion fosforanowy, w którym funkcja aminowa reszty aminoalkilowej nie będzie protonowana. Dlatego też przed przyłączeniem grupy reporterowej przemywałem oligonukleotyd **VI** 0,2 M roztworem DBU w pirydynie, po czym poddałem go reakcji z izotiocyanianem fluoresceiny. Zgodnie z oczekiwaniem, przyłączenie fluoresceiny było tym razem bardzo wydajne i oligomer **XIa** był

głównym produktem oligonukleotydowym w surowej mieszaninie reakcyjnej (Zdjęcie 6). Szybko migrujące związki (poniżej barwnika XC, linie C i D) związane są prawdopodobnie z produktami przyłączenia izotiocyanianu fluoresceiny bezpośrednio do podłoża CPG.

Analogiczne podejście zastosowałem w reakcji oligomeru **VI** z aktywnym estrem biotyny. W tym przypadku w trakcie reakcji kondensacji wydziela się 4-nitrofenol (pKa 7,4), który ze względu na swój kwasowy charakter mógłby ponownie dezaktywować (protonować) funkcję aminową. By temu zapobiec, kondensacja prowadzona była w obecności DBU (0,05M). Podobnie jak w przypadku fluoresceiny, otrzymałem znaczącą poprawę wydajności syntezy znakowanego biotyną oligomeru **XIb** (Zdjęcie 7).



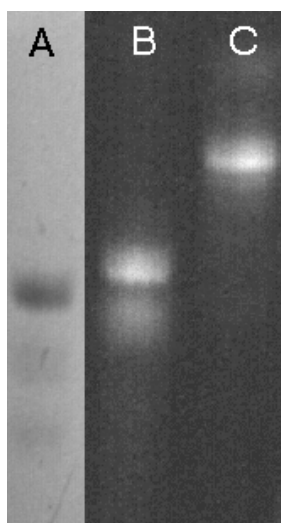
ZDJĘCIE 7

linia A: T₁₀ (**I**)
linia B: 5'-aminoalkilo-T₁₀ (**VI**)
linia C: **XIb**

Przedstawiony protokół przyłączania grup reporterowych do sfunkcjonalizowanych oligonukleotydów na podłożu stałym wydaje się być podejściem bardziej ogólnym, umożliwiającym wprowadzanie również innych znaczników, np. izotiocyanianu rodaminy, estru N-hydroksy-

bursztynimidowego kwasu digoksygenino-3-O-metylokarbonylo-ε-aminokapronowego i in.

W przypadku gdy charakter grupy reporterowej nie pozwala na przyłączenie jej na podłożu stałym, możliwe jest wyizolowanie sfunkcjonalizowanego oligonukleotydu i wykorzystanie go do przyłączenia znacznika w roztworze. Przydatność uzyskanych oligomerów w takim podejściu sprawdziłem w reakcji z izotiocyanianem fluoresceiny i izotiocyanianem rodaminy. Oligonukleotyd typu **VI**, 5'-amino-



ZDJĘCIE 8

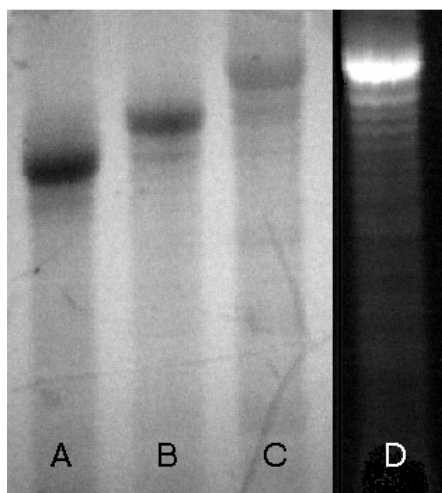
pentylo-T₁₀ (Zdjęcie 8, linia A) został rozpuszczony w buforze boranowym pH 9,2 (100 μl), potraktowany roztworem odpowiedniego izotiocyanianu (1 mg) w DMSO (30 μl) i pozostawiony na noc¹⁰¹. Po wstępnym oczyszczeniu na kolumnie wypełnionej Sephadexem G-25 (NAP-10, Pharmacia-LKB), analiza na żelu poliakrylamidowym wykazała niemalże ilościowe przyłączenie znaczników fluorescencyjnych, prowadzące do oligomeru niosącego fluoresceinę (Zdjęcie 8, linia B) lub rodaminę (linia C).

Skuteczność opracowanych metod otrzymywania nieradioizotopowych sond molekularnych została potwierdzona syntezą znakowanych oligonukleotydów ukierunkowanych na wykrywanie specyficznych sekwencji nukleotydowych (Tabela 12). Sondy te

zostały z powodzeniem wykorzystane w doświadczeniach biologicznych.

TABELA 12. Otrzymane nieradioizotopowe sondy molekularne

Sekwencja	Cel
5'-fluoresceina-d(CATACACCTCCAGCACCTAA)	wirus szyjki macicy typu 16 (HPV-16)
5'-biotyna-d(GATCTTCAGT)	matryca do ligacji RNA
5'-biotyna-d(CAGGGACAATGTGGT)	gen proteazy cysteinowej motylicy wątrobowej



ZDJĘCIE 9

linia A: HPV-16

linia B: 5'-H₂N(CH₂)₅O-(HPV-16)

linia C: 5'-Flu-HN(CH₂)₅O-(HPV-16), λ=254 nm

linia D: 5'-Flu-HN(CH₂)₅O-(HPV-16), λ=366 nm

Przykładowy obraz na żelu poliakrylamidowym kolejnych etapów otrzymywania fluoresceinowej sondy HPV-16 przedstawiony jest na Zdjęciu 9. Oligomer ten (linia A) został zsyntetyzowany metodą H-fosfonianową, a funkcjonalizację przeprowadzono według *Wariantu III* – przyłączając do oligomeru H-fosfonian N-(4,4'-dimetoksytrytylo)-5-aminopentylowy (linia B). W ostatnim etapie do oligomeru przyłączona została fluoresceina (linie C i D). Sonda została odcięta od podłoża stałego i odblokowana wodnym stężonym roztworem amoniaku. Analogiczne wyniki uzyskane zostały dla pozostałych sond.

VI. Podsumowanie

Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki można podzielić na dwie części:

- (i) badania na związkach modelowych w roztworze,
- (ii) funkcjonalizacja i znakowanie oligonukleotydów na podłożu stałym.

Reagenty i metody w badaniach na związkach modelowych dobrano tak, by później można było je stosować do funkcjonalizacji oligonukleotydów związanych z podłożem stałym. Okazało się, że w większości przypadków wyniki tych badań mają bardziej ogólny charakter i poszerzają dotychczasową wiedzę na temat właściwości chemicznych H-fosfonianów, a także mogą być podstawą do rozwinięcia nowych kierunków badawczych tej klasy związków. Znalazło to wyraz w pracach opublikowanych w trakcie realizacji niniejszej rozprawy. W mojej ocenie najistotniejsze osiągnięcia tego etapu są następujące:

- opracowanie metody syntezy H-fosfonianów aminoalkilo – nukleozydowych z wolną funkcją aminową na reszcie aminoalkilowej w bezpośredniej kondensacji H-fosfonianów nukleozydów z nieblokowanymi aminoalkoholami¹³⁴,
- wyniki prac nad czynnikami wpływającymi na transestryfikację diestrów H-fosfonianowych, w tym alkilo- i arylo-H-fosfonianów nukleozydów^{137,138},
- w oparciu o transestryfikację fosforynu difenylowego – opracowanie nowych metod syntezy H-fosfonianów nukleozydów¹⁰² i wielu, jak dotąd trudno dostępnych, H-fosfonianów alkilowych⁸⁹,
- opracowanie nowej metody syntezy fosforanotriestrów aminoalkilowych na drodze kondensacji oksydatywnej¹⁴⁶,
- opracowanie nowej metody syntezy N-chronionych H-fosfonianów aminoalkilowych (syntonów nienukleotydocowych)¹⁴⁵,
- stwierdzenie i dowiedzenie występowania reakcji amin pierwszorzędowych z akrylonitrylem w niektórych warunkach odblokowania oligonukleotydów¹⁴⁷.

Jednym z najważniejszych założeń proponowanych metod funkcjonalizacji oligomerów było ograniczenie lub wyeliminowanie stosowania grup blokujących w reagentach modyfikujących. Okazało się, że protonowanie funkcji aminowej aminoalkoholi na tyle skutecznie obniżało nukleofilowość atomu azotu, że nie obserwowano jego udziału w większości badanych reakcji substytucji nukleofilowej na centrum fosforowym. Ten prosty zabieg pozwolił na wykorzystanie nieblokowanych (a jedynie protonowanych) aminoalkoholi w następujących reakcjach:

- chemoselektywna synteza aminoalkilo-H-fosfonianodiestrów wobec NEP-Cl jako czynnika kondensującego,

- transestryfikacja H-fosfonianów arylowych z pełną chemoselektywnością w kierunku diestrów,
- uniknięcie transestryfikacji internukleotydowych wiązań H-fosfonianodiestrowych podczas funkcjonalizacji oligonukleotydu otrzymanego metodą H-fosfonianową.
- całkowicie chemoselektywna kondensacja oksydacyjna H-fosfonianodiestrów do aminoalkilofosfortriestrów.

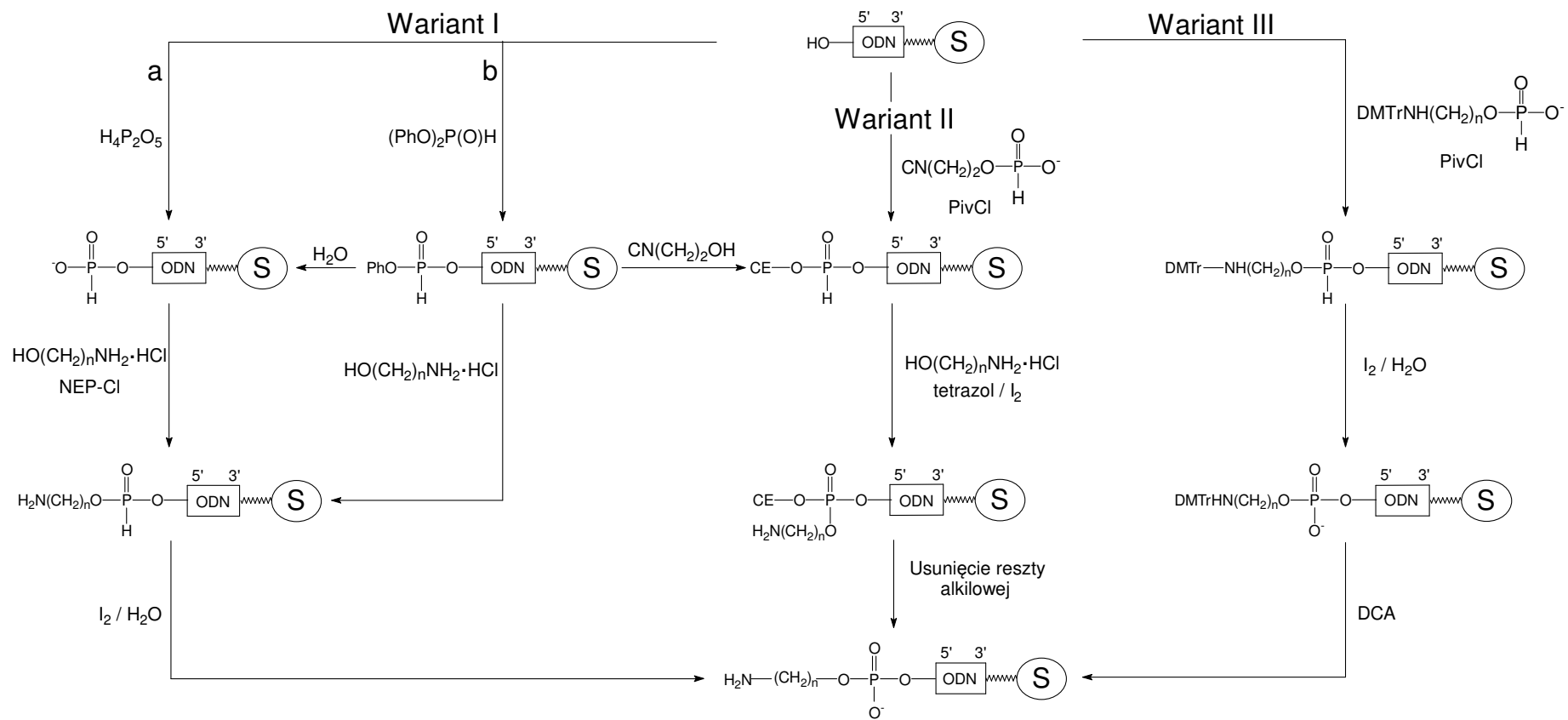
Wykorzystując wyniki otrzymane na związkach modelowych w roztworze, zgodnie z trzema planowanymi na początku wariantami (Schemat 16), opracowałem warunki funkcjonalizacji oligonukleotydów związanych z podłożem stałym. Dodatkowo, opracowałem nowy wariant (*Wariant Ib*) funkcjonalizacji oligonukleotydów, w którym wykorzystałem aktywność fosfonianu difenyloвого i jego produktów w reakcjach transestryfikacji. Tak więc, końcowym efektem badań nad funkcjonalizacją są cztery warianty przedstawione na Schemacie 45. Z wyjątkiem *Wariantu II*, opracowane podejścia można stosować do funkcjonalizacji oligonukleotydów otrzymanych zarówno metodą H-fosfonianową jak i amidofosforynową.

W trój etapowym *Wariancie Ia*, zastosowanie do fosfonylacji łatwego do otrzymania kwasu pirofosfonowego gwarantowało praktycznie ilościową fosfonylację oligonukleotydu. Kondensacja z chlorowodorkiem aminoalkoholu wobec NEP-Cl także zachodziła niemalże ilościowo i po utlenieniu jodem w warunkach standardowych otrzymywano sfunkcjonalizowany oligonukleotyd jako zdecydowanie główny produkt.

Wariant Ib to również modyfikacja stopniowa, w której do fosfonylacji stosowano odpowiedni nadmiar handlowego fosfonianu difenyloвого. Powstający ilościowo w tej szybkiej reakcji, 5'-fenylo-H-fosfonian oligonukleotydu traktowany chlorowodorkiem aminoalkoholu, ulegał ilościowej transestryfikacji do 5'-aminoalilo-H-fosfonianu oligomeru. Po jego utlenieniu (I_2/H_2O) otrzymywano końcowy pożądaný produkt – sfunkcjonalizowany oligonukleotyd, jako niemalże jedyny produkt trzech etapów modyfikacji.

W *Wariancie Ib* otrzymany na pierwszym etapie 5'-fenylo-H-fosfonian oligonukleotydu można wykorzystać do syntezy innych pochodnych np. zhydrolizować do 5'-H-fosfonianu oligomeru lub w reakcji z 2-cyanoetanołem przekształcić w 5'-(2-cyanoetylo)-H-fosfonian oligonukleotydu. Utlenienie i odblokowanie tego ostatniego prowadzi do 5'-fosforanów oligonukleotydów, z możliwością ich wykorzystania do katalizowanej enzymatycznie (T4 DNA ligaza) syntezy dłuższych fragmentów DNA, np. biologicznie funkcjonalnych jednostek genetycznych (promotory, geny struktury i wiele innych).

Ponadto, oprócz cech uniwersalności, *Wariant Ib* jest podejściem szczególnym, gdyż na żadnym etapie jego realizacji nie używa się czynników kondensujących, co może mieć decydujące znaczenie w przypadkach gdy modyfikacji poddaje się oligonukleotyd niosący ugrupowania podatne na acylowanie chlorkami acylowymi lub fosforylację chlorofosforanami.



SCHEMAT 45

Funkcjonalizacja oligonukleotydów wg *Wariantu II* przebiegała zadowalająco jedynie na pierwszym etapie tj. generowania na końcu 5' oligomeru reszty 2-cyanoetylo-H-fosfonianowej. Do otrzymywania 5'-(2-cyanoetylo)-H-fosfonianów oligonukleotydów można było stosować dwie, równie wydajne metody, tj. transestryfikację 5'-fenylo-H-fosfonianu oligonukleotydu 2-cyanoetanolem lub bezpośrednią kondensację 5'-HO-oligomeru z H-fosfonianem 2-cyanoetylowym wobec PivCl. Natomiast na etapie oksydatywnej kondensacji 5'-(2-cyanoetylo)-H-fosfonianu oligonukleotydu z chlorowodorkami aminoalkoholi, pożądanym sfunkcjonalizowany oligonukleotyd otrzymywano z wydajnościami nie przekraczającymi 50%. Ponieważ analogiczne reakcje prowadzone na związkach modelowych w roztworze zachodziły ilościowo, sądzę, że niepowodzenia w tym przypadku związane są z układem heterogennym, w którym reagenty są w roztworze, a modyfikowany oligonukleotyd w fazie stałej. Niestety, nie miałem technicznych możliwości (^{31}P NMR) śledzenia poszczególnych etapów modyfikacji centrum 5' fosforowego oligonukleotydu związanego z fazą stałą i z konieczności tę sprawę pozostawiłem nie do końca wyjaśnioną.

Jak można było się spodziewać, funkcjonalizacja oligonukleotydów wg *Wariantu III*, w którym oligomer fosfonylowano odpowiednio zablokowanym aminoalkilo-H-fosfonianem, zachodziła szybko i wydajnie. Ponieważ reakcje kondensacji i następnie utleniania prowadzi się w standardowych warunkach syntezy oligonukleotydów (metodą H-fosfonianową), to można cały proces funkcjonalizacji traktować jako dodatkowy cykl syntezy łańcucha oligonukleotydowego.

W niniejszej rozprawie opracowano trzy nowe, stosunkowo proste i jednocześnie efektywne metody funkcjonalizacji oligonukleotydów związanych z podłożem stałym. Wszystkie z nich spełniają stawiane w rozprawie kryteria metodyczne i ekonomiczne. Każda z prezentowanych w rozprawie metod funkcjonalizacji oligonukleotydów oparta jest na różnego typu reakcjach chemicznych i stosuje różne reagenty. Pozwala to na optymalny wybór jednej z nich w zależności od potrzeb i praktycznych możliwości realizacji.

Sfunkcjonalizowane oligonukleotydy znakowano różnymi grupami reporterowymi na podłożu stałym lub w roztworze, wykorzystując handlowo dostępne, aktywne pochodne fluoresceiny, rodaminy i biotyny. Przydatność otrzymanych nieradioizotopowych oligonukleotydowych sond molekularnych została sprawdzona z wynikiem pozytywnym w testach analitycznych wykonanych w niezależnych laboratoriach.

Na koniec, mając na uwadze uzyskane wyniki, pozwalam sobie wyrazić pogląd, że w mojej ocenie cele stawiane w niniejszej rozprawie zostały osiągnięte.

VII. Część doświadczalna

Materiały i metody. Widma NMR rejestrowane były na spektrometrze Varian Unity 300 BB VT. Eksperymenty ^{31}P NMR przeprowadzane były w temp 25°C w probówkach \varnothing 5 mm (0,6 ml) przy stężeniach związków zawierających fosfor wynoszących 0,1 mmol/ml. Widma masowe rejestrowano na spektrometrze JEOL MS SX 102 z wykorzystaniem alkoholu *m*-nitrobenzylowego jako matrycy i octanu sodu jako źródła jonów sodowych. Analizę elementarną przeprowadzano na aparacie Perkin Elmer 2400 CHN. Chromatografię cienkowarstwową przeprowadzałem na płytkach *silica gel* 60 F_{254} stosując następujące fazy rozwijające (v/v): A – chloroform—metanol 90:10; B₁ – chloroform—izopropanol 95:5; B₂ – chloroform—izopropanol 90:10; C – chloroform—metanol—trietyloamina 85:10:5; D – izopropanol—woda—25% woda amoniakalna 85:10:5. Wartości R_f są względne i odnoszą się do 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyny (fazy A i B) oraz 3'-H-fosfonianu 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyny (fazy C i D).

Syntezę i modyfikację oligonukleotydów przeprowadzałem na zaprojektowanym i wykonanym w Pracowni Syntezy DNA IChB PAN w Poznaniu automatycznym syntetyzerze DNA. Oligonukleotydy analizowane i oczyszczane były na żelu poliakrylamidowym denaturującym (19% akrylamid, 1% N,N'-metylenobisakrylamid, 7M mocznik). Wizualizację oligomerów uzyskiwano poprzez umieszczenie żelu na płycie z fluoroforem i oświetlenie lampą UV 254 nm. Oligomery zawierające grupy fluoryzujące wizualizowano poprzez oświetlenie lampą UV 366 nm.

Pirydyna (Lab Scan) i acetonitryl (Merck) były przechowywane nad sitami molekularnymi 4\AA , aż zawartość wody obniżała się poniżej 20 ppm (miareczkowanie kulometryczne Karla-Fischera na kulometrze Metrohm 684 KF). Chlorek piwaloilu (Merck), 2-aminoetanol (Fluka), 3-aminopropan-1-ol (Aldrich) i glikol etylenowy (POCH) były przedestylowane przed użyciem. Trietyloamina (Loba) była przedestylowana i przechowywana nad wodorkiem wapnia (Fluka). Kwas fosforawy (Fluka), fosforyn dietylowy (Aldrich), fosforyn difenyłowy (Aldrich), 4-aminobutan-1-ol (Merck), 5-amino-pentan-1-ol (Fluka), 6-aminoheksan-1-ol (Aldrich), 1,3-propanodiol (Fluka), 1,4-butanodiol (Fluka), 1,5-pentanodiol (Fluka), 1,6-heksanodiol (Fluka), jod (Merck), akrylonitryl (Loba) były używane bez oczyszczania. Etanol (POCH) był osuszony wg standardowej metody¹⁴⁸ i przechowywany nad sitami molekularnymi 3\AA . *n*-Butyloamina (Fluka) osuszana była za pomocą KOH, następnie destylowana i przechowywana nad sitami molekularnymi 3\AA . H-Fosfonian 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-yłowy **121**¹⁴⁹, H-fosfonian etylowo – 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-yłowy **146**¹²⁰, H-fosfonian 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-yłowo – 3'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-5'-yłowy **147**¹⁵⁰, H-fosfonian 2-cyjanoetylowo – 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-yłowy **148**¹²⁰, H-fosfonian *p*-chlorofenyłowo – 5'-O-(4,4'-dimetoksytry-

tylo)tymidyn-3'-ylowy **173**¹⁴⁹ i 2-chloro-5,5-dimetylo-2-okso-1,3,2-dioksafosfinan (NEP-Cl) **133**¹²² były przygotowane wg opublikowanych procedur.

Związki **134**, **142**, **143a**, **163-165**, **174** były nietrwałe, co uniemożliwiało ich oczyszczenie za pomocą chromatografii kolumnowej. Ich strukturę chemiczną wywnioskowałem z danych ³¹P NMR oraz przez porównanie ze związkami **134**, **163**, **164** i **174** zsyntetyzowanymi *in situ* poprzez kondensację odpowiedniego monoestru z butyloaminą lub aminoalkoholami **124a** – **c** i **e** wobec NEP-Cl¹³⁴. H-Fosfonodiestry były utleniane i izolowane jako stabilne fosforanodiestry. Związki referencyjne typu **165** otrzymane były poprzez transestryfikację¹⁵¹ H-fosfonianu difenylowego odpowiednimi aminoalkoholami.

Odparowywanie rozpuszczalników przed i po reakcjach przeprowadzane było zawsze pod zmniejszonym ciśnieniem.

Przesunięcia chemiczne i stałe sprzężeń ³¹P NMR produktów pośrednich i końcowych zestawiono w Tabeli 13 (str. 127).

Otrzymywanie kwasu pirofosfonowego 120. Kwas fosforawy (4 mM) odparowano z pirydyną, rozpuszczono w tym samym rozpuszczalniku (10 ml) i dodano NEP-Cl lub chlorek piwaloilu (0,55 ekw.). Produkt **120** używano w postaci roztworu pirydynowego, w którym związek ten był trwały co najmniej trzy miesiące.

Ogólna procedura syntezy fosforodiestrów nukleozydowo – N-piwaloiloaminoalkilowych typu 126. H-Fosfonian 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylowy **121** (sól trietyloamoniowa) i odpowiedni aminoalkohol (1 ekw.) wysuszono przez odparowanie z nadmiarem pirydyny i rozpuszczono w tym samym rozpuszczalniku (1 mmol / 5 ml) a następnie dodano chlorek piwaloilu (2,5 ekw.). Po ok. 10' (TLC, faza A) dodano wodę (5%) i jod (1,05 ekw.). Utlenianie prowadzono przez 20'. Nadmiar jodu rozłożono etanotiolem i odparowano rozpuszczalniki. Pozostały olej rozpuszczono w chlorku metylenu, przemyto NaHCO₃ aq. sat., fazę organiczną osuszono nad bezwodnym Na₂SO₄ i odparowano do sucha. Związki typu **126** izolowano za pomocą chromatografii krótkokolumnowej stosując liniowy gradient metanolu w chlorku metylenu zawierającym 5% Et₃N. Frakcje zawierające czyste produkty odparowano, pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu i strącono nadmiarem heksanu – eteru dietylowego 1:1, po czym odsączono i wysuszono w próżni.

Fosforan 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylowo – 2-(piwaloiloamino)etylowy 126a □ Et₃NH⁺. Wydajność 87%. A. E.: C: 62,1%, H: 7,1%, N: 6,1%, P: 3,6%; C₄₄H₆₁N₄O₁₁P zawiera C: 62,0%, H: 7,2%, N: 6,6%, P: 3,6%. R_f: 0,47 (faza C), 0,59 (faza D). ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 1,17 [9H, s, C(CH₃)₃], 1,31 [9H, t, J 7,3, N(CH₂CH₃)₃], 1,35 (3H, s, 5-CH₃), 2,33 i 2,62 (2H, 2 m, 2'-H₂), 3,03 [6H, q, J 7,3, N(CH₂CH₃)₃], 3,38 (2H, m, CH₂CH₂NH), 3,49 (2H, m, 5'-H₂), 3,78 (6H, s, OCH₃), 3,89 (2H, m, POCH₂), 4,31 (1H, m, 4'-H), 4,98 (1H, m, 3'-H), 6,43 (1H, m, 1'-H), 6,82 (4H, d, J 8,9, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,24–7,37 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,61 (1H, s, 6-H) i 8,84 (1H, br s, N³H, wymiana z D₂O).

Fosforan 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylovo – 3-(piwaloiloamino)propylowy 126b □ Et_3NH^+ . Wydajność 84%. S. M.: MH^+ : 867, $(MH^+ - Et_3NH^+)Na^+$: 788, $(M - Et_3NH^+)2Na^+$: 810; $C_{45}H_{63}N_4O_{11}P$ ma MH^+ : 867. R_f : 0,52 (faza C), 0,59 (faza D). 1H NMR, δ_H ($CDCl_3$): 1,17 [9H, s, $C(CH_3)_3$], 1,32 (3H, s, 5- CH_3), 1,32 [9H, t, J 7,3, $N(CH_2CH_3)_3$], 1,70 (2H, dt, J 5,8, $CH_2CH_2CH_2$), 2,35 i 2,66 (2H, 2 m, 2'- H_2), 3,05 [6H, q, J 7,3, $N(CH_2CH_3)_3$], 3,37 (2H, m, CH_2CH_2NH), 3,49 (2H, m, 5'- H_2), 3,78 (6H, s, OCH_3), 3,86 (2H, m, $POCH_2$), 4,31 (1H, m, 4'-H), 4,97 (1H, m, 3'-H), 6,43 (1H, m, 1'-H), 6,88 (4H, d, J 8,7, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,25–7,39 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,62 (1H, s, 6-H) i 8,86 (1H, br s, N^3H , wymiana z D_2O).

Fosforan 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylovo – 6-(piwaloiloamino)heksylowy 126e □ Et_3NH^+ . Wydajność 72%. A. E.: C: 63,0%, H: 7,5%, N: 6,0%, P: 3,4%; $C_{48}H_{69}N_4O_{11}P$ zawiera C: 63,4%, H: 7,6%, N: 6,2%, P: 3,4%. R_f : 0,52 (faza C), 0,59 (faza D). 1H NMR, δ_H ($CDCl_3$): 1,18 [9H, s, $C(CH_3)_3$], 1,32 (3H, s, 5- CH_3), 1,32 [9H, t, J 7,2, $N(CH_2CH_3)_3$], 1,32 (4H, m, $OCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2NH$), 1,45 (2H, dt, J 6,9, $CH_2CH_2CH_2NH$), 1,57 (2H, dt, J 6,9, $POCH_2CH_2CH_2$), 2,35 i 2,66 (2H, 2 m, 2'- H_2), 3,04 [6H, q, J 7,3, $N(CH_2CH_3)_3$], 3,19 (2H, dt, J 6,6 i 6,9, CH_2CH_2NH), 3,37 (2H, m, CH_2CH_2NH), 3,40 (2H, m, 5'- H_2), 3,78 (6H, s, OCH_3), 3,80 (2H, m, $POCH_2$), 4,32 (1H, m, 4'-H), 5,78 (1H, m, 3'-H), 6,45 (1H, m, 1'-H), 6,82 (4H, d, J 8,9, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,24–7,40 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,61 (1H, s, 6-H) i 8,91 (1H, br s, N^3H , wymiana z D_2O).

Synteza 2-[5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-yloksy]-2-okso-1,3,2-oksazaperhydrofosforinu 129b.

A. Metoda z praktywacją H-fosfonianu nukleozydu 121.

Roztwór H-fosfonianu 121 w pirydynie (1 mmol/5 ml) aktywowano chlorkiem piwaloilu (2,5 ekw.). Następnie dodano 3-aminopropan-1-ol 124b (1,1 ekw.) i po 5' dodano jodu (1,05 ekw.). Po 15' nadmiar jodu rozłożono etanotiolem, odparowano rozpuszczalnik a pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu i przemyto $NaHCO_3$ aq. sat.. Fazę organiczną osuszono nad bezwodnym Na_2SO_4 i odparowano do sucha. Związek 130 oczyszczono za pomocą chromatografii krótkokolumnowej stosując liniowy gradient metanolu w chlorku metylenu. Frakcje zawierające czyste produkty odparowano, pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu i strącono nadmiarem heksanu – eteru dietylowego 1:1. Osad odsączono i wysuszono w próżni. Wydajność 69%. S. M.: MH^+ : 664, $(MNa)^+$: 686, $(M - H^+)2Na^+$: 708; $C_{34}H_{38}N_3O_9P$ ma MH^+ : 664. R_f (dwa diastereoizomery): 0,58 i 0,62 (faza A), 0,58 i 0,66 (faza B₂). 1H NMR, δ_H ($CDCl_3$): 1,73 (3H, s, 5- CH_3), 1,65 i 2,00 (2H, 2m, $CH_2CH_2CH_2$), 2,43 i 2,65 (2H, 2 m, 2'- H_2), 3,18 i 3,25 (2H, 2m, $PNHCH_2$), 3,41 i 3,51 (2H, 2m, 5'- H_2), 3,79 (6H, s, OCH_3), 4,18 i 4,29 (2H, 2m, $POCH_2$), 4,29 (1H, m, 4'-H), 5,12 (1H, m, 3'-H), 6,47 (1H, m, 1'-H), 6,83 (4H, d, J 8,7, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,24–7,39 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,57 (1H, br s, 6-H) i 8,81 (1H, br s, N^3H , wymiana z D_2O).

B. Kondensacja wobec NEP-Cl.

H-Fosfonian **121** i 3-aminopropan-1-ol **124b** (1,05 ekw.) w pirydynie (1 mmol/5 ml) traktowano chlorofosforanem **136** (2,5 ekw.) przez 10'. Następnie do roztworu dodano wody do stężenia 5% i mieszaninę utleniało jodem (1,05 ekw.) przez 15'. Dalszy przerób j.w. w metodzie A. Wydajność 66%. S. M.: MH^+ : 769, $(MH^+ - Et_3NH^+)Na^+$: 690, $(M - Et_3NH^+)2Na^+$: 712; $C_{39}H_{53}N_4O_{10}P$ ma MH^+ : 769. R_f : 0,22 (faza C), 0,37 (faza D). 1H NMR, δ_H ($CDCl_3$): 1,30 [9H, t, J 7,3, $N(CH_2CH_3)_3$] 1,34 (3H, s, 5- CH_3), 2,35 i 2,66 (2H, 2 m, 2'- H_2), 2,85 (2H, m, $PNHCH_2$), 3,04 [6H, q, J 7,3, $N(CH_2CH_3)_3$], 3,49 (2H, m, 5'- H_2), 3,53 (2H, m, CH_2OH), 3,77 (6H, s, OCH_3), 4,24 (1H, m, 4'-H), 4,91 (1H, m, 3'-H), 6,36 (1H, m, 1'-H), 6,82 (4H, d, J 8,7, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,25–7,41 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,62 (1H, s, 6-H).

Synteza 2-[5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-yloksy]-2-okso-1,3,2-oksazaperhydrofosfepinu 129c. Reakcję przeprowadzano analogicznie do opisanej wyżej syntezy związku **129b** (podejście B), z tą różnicą, że użyto 4-aminobutan-1-ol **124c** zamiast 3-aminopropan-1-olu **124b**. Wydajność 53%. S. M.: MH^+ : 678, $(MNa)^+$: 700, $(M - H^+)2Na^+$: 722; $C_{35}H_{40}N_3O_9P$ ma MH^+ : 678. R_f (dwa diastereoizomery): 0,53 i 0,58 (faza A), 0,58 i 0,66 (faza B₂). 1H NMR, δ_H ($CDCl_3$): 1,65 (3H, s, 5- CH_3), 1,66 i 1,82 (4H, 2m, $CH_2CH_2CH_2CH_2$), 2,40 i 2,63 (2H, 2m, 2'- H_2), 2,91 i 3,00 (2H, 2m, $PNHCH_2$), 3,40 i 3,51 (2H, 2m, 5'- H_2), 3,79 (6H, s, OCH_3), 4,10 (1H, m, 4'-H), 4,08 i 4,20 (2H, 2m, $POCH_2$), 5,17 (1H, m, 3'-H), 6,45 (1H, dt, J 5,6, 1'-H), 6,83 (4H, d, J 8,7, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,23–7,39 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,58 (1H, br s, 6-H) i 8,50 (1H, br s, N^3H , wymiana z D_2O).

Synteza amidofosforanu 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo – N-(2-hydroksyetylowego) 130 □ Et_3NH^+ .

A. Metoda z preaktywacją związku 121.

Reakcję przeprowadzano analogicznie do opisanej wyżej syntezy perhydrofosforinu **129b** (metoda A), z tą różnicą, że użyto 2-aminoetanol **124a** zamiast 3-aminopropan-1-olu **124b**, a utlenianie prowadzono w obecności wody (0,5%). Produkt **130** oczyszczono za pomocą chromatografii krótkokolumnowej stosując liniowy gradient metanolu w chlorku metylenu zawierającym 5% Et_3N . Wydajność 57%.

B. Kondensacja wobec NEP-Cl.

Reakcję przeprowadzano analogicznie do opisanej wyżej syntezy perhydrofosforinu **129b** (metoda B), z tą różnicą, że użyto 2-aminoetanol **124a** zamiast 3-aminopropan-1-olu **124b**. Oczyszczanie j.w. Wydajność 69%. S. M.: MH^+ : 769, $(MH^+ - Et_3NH^+)Na^+$: 690, $(M - Et_3NH^+)2Na^+$: 712; $C_{39}H_{53}N_4O_{10}P$ ma MH^+ : 769. R_f : 0,22 (faza C), 0,37 (faza D). 1H NMR, δ_H ($CDCl_3$): 1,30 [9H, t, J 7,3, $N(CH_2CH_3)_3$] 1,34 (3H, s, 5- CH_3), 2,35 i 2,66 (2H, 2 m, 2'- H_2), 2,85 (2H, m, $PNHCH_2$), 3,04 [6H, q, J 7,3, $N(CH_2CH_3)_3$], 3,49 (2H, m, 5'- H_2), 3,53 (2H, m, CH_2OH), 3,77 (6H, s, OCH_3), 4,24 (1H, m, 4'-H), 4,91 (1H, m, 3'-H), 6,36 (1H, m, 1'-H), 6,82

(4H, d, J 8,7, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,25–7,41 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,62 (1H, s, 6-H).

Ogólna procedura syntezy fosforodiestrów nukleozydowo – aminoalkilowych 132b-e (metoda z wolnymi aminoalkoholami). Odpowiednie diestry 134b-e otrzymano analogicznie do opisanej wyżej syntezy związku 130 (metoda B). Po utlenieniu i rozłożeniu nadmiaru jodu etanotiolem, do mieszaniny reakcyjnej dodano NaHCO_3 aq. sat. aby zneutralizować kwaśne składniki powstałe w toku reakcji. Rozpuszczalnik odparowano do gęstego oleju i rozpuszczono w minimalnej objętości chlorku metylenu zawierającego 5% Et_3N . Nerozpuszczone sole nieorganiczne odsączono, a roztwór naniesiono na kolumnę zawierającą żel krzemionkowy. Rozdział przeprowadzono analogicznie jak dla związków typu 126.

Fosforan 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylovo – 3-aminopropylowy 132b Et_3NH^+ . Wydajność 73%. S. M.: MH^+ : 682, (MNa^+ : 704, ($\text{M} - \text{H}^+$) 2Na^+ : 726; $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$ ma MH^+ : 682. R_f : 0,02 (faza C), 0,18 (faza D). $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3): 1,32 (3H, s, 5- CH_3), 1,88 (2H, m, POCH_2CH_2), 2,27 i 2,62 (2H, 2 m, 2'- H_2), 3,02 (2H, m, CH_2NH_3^+), 3,33 (2H, m, 5'- H_2), 3,72 (6H, s, OCH_3), 3,89 (2H, 2m, POCH_2), 4,20 (1H, m, 4'-H), 4,88 (1H, m, 3'-H), 6,27 (1H, m, 1'-H), 6,78 (4H, d, J 9,0, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,18–7,35 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,53 (1H, br s, 6-H).

Fosforan 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylovo – 4-aminobutylowy 132c Et_3NH^+ . Wydajność 62%. S. M.: MH^+ : 696, (MNa^+ : 718, ($\text{M} - \text{H}^+$) 2Na^+ : 740; $\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$ ma MH^+ : 696. R_f : 0,03 (faza C), 0,15 (faza D). $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3): 1,35 (3H, s, 5- CH_3), 1,62 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 1,79 (2H, m, POCH_2CH_2), 2,25 i 2,66 (2H, 2 m, 2'- H_2), 2,90 (2H, m, CH_2NH_3^+), 3,30 (2H, m, 5'- H_2), 3,72 (6H, s, OCH_3), 3,79 (2H, 2m, POCH_2), 4,23 (1H, m, 4'-H), 4,89 (1H, m, 3'-H), 6,29 (1H, m, 1'-H), 6,79 (4H, d, J 8,7, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,20–7,36 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,55 (1H, br s, 6-H) i 8,30 (1H, br s, N^3H , wymiana z D_2O).

Fosforan 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylovo – 5-aminopentylowy 132d Et_3NH^+ . Wydajność 78%. S. M.: MH^+ : 710, (MNa^+ : 732, ($\text{M} - \text{H}^+$) 2Na^+ : 754; $\text{C}_{36}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$ ma MH^+ : 710. R_f : 0,02 (faza C), 0,16 (faza D). $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3): 1,40 (3H, s, 5- CH_3), 1,51 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,59 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 1,71 (2H, m, POCH_2CH_2), 2,20 i 2,62 (2H, 2 m, 2'- H_2), 2,98 (2H, m, CH_2NH_3^+), 3,34 (2H, m, 5'- H_2), 3,75 (6H, s, OCH_3), 3,79 (2H, 2m, POCH_2), 4,25 (1H, m, 4'-H), 4,93 (1H, m, 3'-H), 6,29 (1H, m, 1'-H), 6,81 (4H, d, J 8,8, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,23–7,37 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,51 (1H, br s, 6-H) i 8,38 (1H, br s, N^3H , wymiana z D_2O).

Fosforan 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylovo – 6-aminoheksylowy 132e Et_3NH^+ . Wydajność 69%. S. M.: MH^+ : 724, (MNa^+ : 746, ($\text{M} - \text{H}^+$) 2Na^+ : 768; $\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P}$ ma MH^+ : 724. R_f : 0,05 (faza C), 0,19 (faza D). $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3): 1,32 (4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,33 (3H, s, 5- CH_3), 1,54 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 1,67 (2H, m, POCH_2CH_2), 2,23 i 2,63 (2H, 2 m, 2'- H_2), 2,86 (2H, m, CH_2NH_3^+), 3,30 (2H, m, 5'- H_2), 3,70

(2H, 2m, POCH₂), 3,73 (6H, s, OCH₃), 4,24 (1H, m, 4'-H), 4,93 (1H, m, 3'-H), 6,34 (1H, m, 1'-H), 6,80 (4H, d, *J* 8,7, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,24–7,35 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,57 (1H, br s, 6-H) i 8,33 (1H, br s, N³H, wymiana z D₂O).

Ogólna procedura syntezy fosforodiestrów nukleozydowo – aminoalkilowych 132a-e (metoda z preacylacją aminoalkoholi). Odpowiedni aminoalkohol 124a-e (1,1 ekw.) potraktowano TFAA (1,1 ekw.) w pirydynie (aminoalkoholu). Do mieszaniny reakcyjnej dodano roztwór H-fosfonianu 121 w minimalnej ilości pirydyny, a następnie chlorek piwaloilu (3,0 ekw.). Po 10' dodano roztwór jodu (1,05 ekw.) w 20% wodnej pirydynie (5 ml/1 mmol H-fosfonianu 121). Po 15' rozłożono nadmiar jodu etanotiolem i zatężono roztwór do oleju, który następnie rozpuszczono w pirydynie (5ml/1 mmol H-fosfonianu 121) i dodano równą objętość 25% wodnego amoniaku. Reakcję pozostawiono na noc w temp. pok. Izolację fosforodiestrów 132a-e przeprowadzono tak, jak opisano powyżej dla 132b-e.

Fosforan 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylowo – 2-aminoetylowy 132a □ *Et*₃NH⁺. Wydajność 88%. S. M.: MH⁺: 668, (MNa⁺: 690, (M - H⁺)₂Na⁺: 712; C₃₄H₄₀N₃O₁₀P ma MH⁺: 668. *R*_f: 0,07 (faza C), 0,29 (faza D). ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 1,31 (3H, s, 5-CH₃), 2,25 i 2,67 (2H, 2 m, 2'-H₂), 3,11 (2H, m, CH₂NH₃⁺), 3,31 (2H, m, 5'-H₂), 3,69 (6H, s, OCH₃), 4,03 (2H, 2m, POCH₂), 4,20 (1H, m, 4'-H), 4,85 (1H, m, 3'-H), 6,20 (1H, m, 1'-H), 6,76 (4H, d, *J* 8,1, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,20–7,33 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,51 (1H, s, 6-H) i 8,06 (1H, br s, N³H, wymiana z D₂O).

Fosforan 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylowo – 3-aminopropylowy 132b □ *Et*₃NH⁺. Wydajność 82%. Dane spektralne i analityczne jw.

Fosforan 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylowo – 4-aminobutylowy 132c □ *Et*₃NH⁺. Wydajność 73%. Dane spektralne i analityczne jw.

Fosforan 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylowo – 5-aminopentylowy 132d □ *Et*₃NH⁺. Wydajność 81%. Dane spektralne i analityczne jw.

Fosforan 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylowo – 6-aminoheksylowy 132e □ *Et*₃NH⁺. Wydajność 80%. Dane spektralne i analityczne jw.

Synteza fosforanu 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-5'-ylowo – 6-aminoheksylowego 132e □ *Et*₃NH⁺ (metoda z kondensacją oksydacyjną). Mieszaninę diestru H-fosfonianowego 152 i tetrazolu (4 ekw.) oraz chlorowodorek 6-aminoheksan-1-olu 153e (10 ekw.) osuszono osobno przez odparowanie z pirydyną. H-Fosfonian z tetrazolem rozpuszczono następnie w pirydynie (2 mmol 152 / ml) i dodano równocześnie chlorowodorek aminoalkoholu 153e w pirydynie (20 mmoli / ml) i jod (1,05 ekw.). Po zakończeniu reakcji syntezy triestru 155 (10') nadmiar jodu rozłożono etanotiolem, odparowano pirydynę, pozostały olej rozpuszczono w chlorku metylenu, przemyto NaHCO₃ aq. sat. i osuszono nad Na₂SO₄ bzw.. Rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozpuszczono w pirydynie. Do roztworu dodano równą objętość 25% NH₃ aq. i pozostawiono na noc w temp. pok. Roztwór

następnie odparowano, a izolację fosforodiestru **132e** przeprowadzono tak, jak opisano na str. 114. Wydajność 46%. Dane spektralne jak na str. 114.

Synteza 2-[5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-tymidyn-3'-yloksy]-1,3,2-dioksafosfolanu 137a. Roztwór H-fosfonianu **121** w pirydynie (1 mmol/5 ml) potraktowano chlorkiem piwalolu (2,5 ekw.). Następnie dodano etanodiol **136a** (1,1 ekw.), po 5' odparowano rozpuszczalnik, a pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu i przemyto krótko NaHCO_3 aq. sat. Fazę organiczną osuszono nad bezwodnym Na_2SO_4 i odparowano do sucha. Związek **137a** oczyszczono za pomocą chromatografii krótkokolumnowej stosując 0,5% metanolu w chlorku metylenu. Frakcje zawierające czyste produkty odparowano, pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu i strącono w układzie heksan – eter dietylowy 1:1. Precypitat odfiltrowano i wysuszono w próżni. Wydajność 43%. R_f : 1,45 (faza B₁). $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3): 1,71 (3H, s, 5-CH₃), 2,47 i 2,66 (2H, 2 m, 2'-H₂), 3,40 i 3,47 (2H, 2m, 5'-H₂), 3,81 (6H, s, OCH₃), 4,22 (2H, m, POCH₂), 4,31 (1H, m, 4'-H), 5,08 (1H, m, 3'-H), 6,50 (1H, m, 1'-H), 6,82 (4H, d, J 8,7, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,20–7,37 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,58 (1H, br s, 6-H) i 8,70 (1H, br s, N³H, wymiana z D₂O).

Ogólna procedura otrzymywania cyklicznych fosforanów typu 139.

A. Metoda z preaktywacją związku 121.

B. Kondensacja wobec NEP-Cl.

Reakcje przeprowadzano analogicznie do opisanej wyżej syntezy związku **129b** (podejścia A i B), z tą różnicą, że używano dioli **136b** – **136d** zamiast 3-aminopropan-1-olu **124b**.

2-[5'-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-tymidyn-3'-yloksy]-2-okso-1,3,2-dioksafosfinan 139b. Wydajność 63% (metoda A); 58% (metoda B). S. M.: MH⁺: 665, M⁺: 664; C₃₄H₃₇N₂O₁₀P ma MH⁺: 665. R_f : 1,33 (faza A), 1,38 (faza B₂). $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3): 1,46 (3H, s, 5-CH₃), 1,70 i 2,20 (2H, 2m, CH₂CH₂CH₂), 2,50 i 2,66 (2H, 2 m, 2'-H₂), 3,49 (2H, m, 5'-H₂), 3,75 (6H, s, OCH₃), 4,29 (2H, m, POCH₂), 4,33 (1H, m, 4'-H), 5,26 (1H, m, 3'-H), 6,56 (1H, m, 1'-H), 6,85 (4H, d, J 8,7, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,23–7,44 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,57 (1H, br s, 6-H) i 8,60 (1H, br s, N³H, wymiana z D₂O).

2-[5'-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-tymidyn-3'-yloksy]-2-okso-1,3,2-dioksafosfepan 139c. Wydajność 61% (metoda A); 68% (metoda B). S. M.: MH⁺: 680, M⁺: 679; C₃₅H₃₉N₂O₁₀P ma MH⁺: 680. R_f : 1,34 (faza A), 1,39 (faza B₂). $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3): 1,41 (3H, s, 5-CH₃), 1,89 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂), 2,43 i 2,62 (2H, 2m, 2'-H₂), 3,47 (2H, m, 5'-H₂), 3,76 (6H, s, OCH₃), 4,13 (4H, m, POCH₂), 4,30 (1H, m, 4'-H), 5,30 (1H, m, 3'-H), 6,54 (1H, m, 1'-H), 6,84 (4H, d, J 8,1, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,27–7,42 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,57 (1H, br s, 6-H) i 8,61 (1H, br s, N³H, wymiana z D₂O).

2-[5'-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-tymidyn-3'-yloksy]-2-okso-1,3,2-dioksafosfokan 139d. Wydajność 52% (metoda A); 45% (metoda B). S. M.: MH⁺: 694, M⁺: 693; C₃₆H₄₁N₂O₁₀P ma MH⁺: 694. R_f : 1,34 (faza A), 1,38 (faza B₂). $^1\text{H NMR}$, δ_{H} (CDCl_3): 1,41 (3H, s, 5-CH₃), 1,73

(4H, m, POCH₂CH₂), 1,90 (2H, m, POCH₂CH₂CH₂), 2,40 i 2,65 (2H, 2m, 2'-H₂), 3,46 (2H, m, 5'-H₂), 3,78 (6H, s, OCH₃), 4,06 (4H, m, POCH₂), 4,29 (1H, m, 4'-H), 5,22 (1H, m, 3'-H), 6,51 (1H, m, 1'-H), 6,84 (4H, d, *J* 9,0, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,26–7,41 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,56 (1H, br s, 6-H) i 8,61 (1H, br s, N³H, wymiana z D₂O).

Synteza fosforanu 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo – 2-hydroksyetylowego 141a □ Et₃NH⁺. Reakcję przeprowadzono analogicznie do opisanej wyżej syntezy amidofosforanu **130** (metoda A), z tą różnicą, że użyto glikolu etylenowego **136a** zamiast 2-aminoetanolu **124a**, a utlenianie prowadzono wobec 1,5 ekw. wody, a po zakończeniu utleniania ilość wody zwiększono do 10% v/v. Wydajność 41%. S. M.: MH⁺: 770, (MH⁺ - Et₃N): 668; C₃₉H₅₂N₃O₁₁P ma MH⁺: 770. R_f: 0,31 (faza C), 0,41 (faza D). ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 1,31 [9H, t, *J* 7,5, N(CH₂CH₃)₃] 1,35 (3H, s, 5-CH₃), 2,36 i 2,67 (2H, 2 m, 2'-H₂), 3,06 [6H, q, *J* 7,2, N(CH₂CH₃)₃], 3,42 (2H, m, 5'-H₂), 3,70 (2H, t, *J* 4,2 CH₂OH), 3,78 (6H, s, OCH₃), 3,94 (2H, m, POCH₂), 4,30 (1H, m, 4'-H), 5,04 (1H, m, 3'-H), 6,41 (1H, m, 1'-H), 6,83 (4H, d, *J* 9,0, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,25–7,40 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,60 (1H, br s, 6-H).

Ogólna procedura syntezy fosforanów typu 141. Reakcję i oczyszczanie prowadzono analogicznie do opisanej wyżej syntezy fosforodiestrów nukleozydowo – aminoalkilowych typu **132** (metoda z wolnymi aminoalkoholami), z tą różnicą, że zamiast aminoalkoholi typu **124** użyto dioli typu **136**, a utlenianie prowadzono wobec 10% v/v wody.

Fosforan 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo – 4-hydroksybutyloowy 141c □ Et₃NH⁺. Wydajność 71%. R_f: 0,33 (faza C), 0,45 (faza D). ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 1,29 [9H, t, *J* 7,5, N(CH₂CH₃)₃] 1,34 (3H, s, 5-CH₃), 1,48 (2H, m, CH₂CH₂OH), 1,80 (2H, m, POCH₂CH₂), 2,39 i 2,49 (2H, 2 m, 2'-H₂), 3,11 [6H, q, *J* 7,2, N(CH₂CH₃)₃], 3,34 i 3,45 (2H, m, 5'-H₂), 3,57 (2H, t, *J* 4,1 CH₂OH), 3,82 (6H, s, OCH₃), 4,03 (2H, m, POCH₂), 4,20 (1H, m, 4'-H), 5,01 (1H, m, 3'-H), 6,52 (1H, m, 1'-H), 6,78 (4H, d, *J* 9,0, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,22–7,41 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,65 (1H, br s, 6-H).

Fosforan 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo – 5-hydroksypentylowy 141d □ Et₃NH⁺. Wydajność 75%. R_f: 0,38 (faza C), 0,50 (faza D). ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 1,29 [9H, t, *J* 7,5, N(CH₂CH₃)₃], 1,39 (2H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 1,44 (3H, s, 5-CH₃), 1,53 (2H, m, CH₂CH₂OH), 1,78 (2H, m, POCH₂CH₂), 2,38 i 2,46 (2H, 2 m, 2'-H₂), 3,21 [6H, q, *J* 7,2, N(CH₂CH₃)₃], 3,33 i 3,48 (2H, m, 5'-H₂), 3,61 (2H, t, *J* 4,1 CH₂OH), 3,78 (6H, s, OCH₃), 4,10 (2H, m, POCH₂), 4,22 (1H, m, 4'-H), 5,12 (1H, m, 3'-H), 6,49 (1H, m, 1'-H), 6,73 (4H, d, *J* 9,0, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,20–7,39 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,66 (1H, br s, 6-H).

Ogólna metoda syntezy nukleozydowych pochodnych N-(2-cyjanocytylo)aminoalkilowych (147 i 149). Do roztworu fosforanu 6-aminoheksylo – tymidyn-3'-yloowego **146** lub N⁴-(6-aminoheksylo)-5-metylocytydyny **148** (0,5mmola) w 10 ml wodnego

roztworu amoniaku (25%) dodano 10 ekw. akrylonitrylu (5,0 mmola, 0,33 ml). Po zakończeniu reakcji (TLC, 15 min.) rozpuszczalnik i nadmiar akrylonitrylu zostały odparowane pod zmniejszonym ciśnieniem. Fosfodiester **147** wyizolowano w postaci stałej poprzez rozpuszczenie pozostałości w metanolu i strącenie do eteru dietylowego, a nukleozyd **149** oczyszczono za pomocą krótkokolumnowej chromatografii na żelu krzemionkowym stosując liniowy gradient metanolu (0-20% w chlorku metylenu zawierającym 1% Et₃N).

Fosforan tymidyn-3'-ylo – *N*-(2-cyanoetylo)-6-aminoheksylowy **147** □ NH₄⁺. Wydajność 85%. R_f: 0,74 (faza D). ¹H NMR, δ_H (CD₃OD): 1,45 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 1,65 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 1,88 (3H, s, 5-CH₃), 2,27 i 2,46 (2H, 2 m, 2'-H₂), 2,81 (2H, t, *J* 6,9, CH₂CN), 2,85 (2H, t, *J* 7,2, CH₂CH₂CH₂NH), 3,12 (2H, t, *J* 6,0, CH₂CH₂CN), 3,30 (2H, m, 5'-H₂), 3,89 (2H, dt, *J*_{HH} 6,0, *J*_{HP} 6,5, POCH₂), 4,15 (1H, m, 4'-H), 4,82 (1H, m, 3'-H), 6,30 (1H, m, 1'-H), 7,86 (1H, br s, 6-H).

*N*⁴-[*N*-(2-cyanoetylo)-6-aminoheksylo]-5-metylocytydyna **149**. Wydajność 86%. R_f: 0,43 (faza C). ¹H NMR, δ_H (CD₃OD): 1,51 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 1,60 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 1,96 (3H, s, 5-CH₃), 2,15 i 2,26 (2H, 2 m, 2'-H₂), 2,59 (2H, t, *J* 6,9, CH₂CN), 2,63 (2H, t, *J* 6,9, CH₂CH₂CH₂NHCH₂), 2,86 (2H, t, *J* 7,5, CH₂CH₂CN), 3,36 (2H, t, *J* 7,5, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂NHCH₂), 3,76 (2H, m, 5'-H₂), 3,92 (1H, m, 4'-H), 4,39 (1H, m, 3'-H), 6,30 (1H, m, 1'-H), 7,75 (1H, br s, 6-H).

Synteza amidofosforanu 3'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo – *etylo* – *N*-(6-hydroksyheksylowego) **154**. Diester H-fosfonianowy **150** i 6-aminoheksan-1-ol **124e** osuszono osobno przez odparowanie z pirydyną. H-Fosfonian **150** rozpuszczono następnie w pirydynie (2 mmol / ml) i dodano równocześnie aminoalkohol **124e** (10 ekw.) w pirydynie (20 mmoli / ml) i jod (1,05 ekw.). Nadmiar jodu rozłożono etanotiolem, odparowano rozpuszczalnik a pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu, przemyto NaHCO₃ aq. sat.. Fazę organiczną osuszono nad Na₂SO₄ bzw. i odparowano. Produkt **154** oczyszczono na kolumnie z żelazem krzemionkowym (0-10% CH₃OH w chlorku metylenu), frakcje zawierające czysty produkt zatężono, rozpuszczono w minimalnej ilości chlorku metylenu i strącono w układzie heksan–eter dietylowy 1:1. Osad odsączono i wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność 80%. A. E.: C: 62,0%, H: 6,7%, N: 5,8%. C₃₉H₅₀N₃O₁₀P zawiera C: 62,3%, H: 6,7%, N: 5,6%. M. S.: MH⁺: 753, M⁺: 752. C₃₉H₅₀N₃O₁₀P ma MH⁺: 753. R_f (dwa diastereoizomery): 0,70 i 0,79 (faza A); 0,71 i 0,81 (faza B₂). ¹H NMR, δ_H (CDCl₃): 1,20 i 1,32 (3H, 2dt, ³*J*_{HH} 6,9, ⁴*J*_{PH} 0,6, CH₂CH₃), 1,36 (4H, m, PNHCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂OH), 1,38 (3H, s, CH₃), 1,44 (2H, m, NHCH₂CH₂), 1,54 (2H, m, CH₂CH₂OH), 2,41 i 2,63 (2H, 2m, 2'-H₂), 2,86 (2H, m, NHCH₂), 3,42 (2H, m, 5'-H₂), 3,52 (2H, m, CH₂OH), 3,78 (6H, s, OCH₃), 3,97 i 4,06 (2H, q i dq, ³*J*_{HH} 7,2 i 7,3, ³*J*_{PH} 1,2, POCH₂), 4,26 i 4,30 (1H, 2m, 4'-H), 5,11 (1H, m, 3'-H), 6,34 (1H, m, 1'-H), 6,84 (4H, d, *J* 9,2, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,23 – 7,40 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,59 i 7,61 (1H, 2s, 6-H).

Synteza amidofosforanu 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-5'-ylowo – 3'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylowo – N-(6-hydroksyheksylowego) 155. Syntezę i oczyszczanie przeprowadzono analogicznie jak dla amidu 154, z tym, że wyjściowym związkiem był H-fosfonian 151. Wydajność 53%. A. E.: C: 68,2%, H: 6,1%, N: 6,0%. $C_{64}H_{68}N_5O_{12}P$ zawiera C: 68,0%, H: 6,1%, N: 6,2%. R_f (dwa diastereoizomery): 0,83 i 0,91 (faza A); 0,80 i 0,89 (faza B₂). 1H NMR, δ_H ($CDCl_3$): 1,22 (4H, m, $PNHCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2OH$), 1,29 i 1,41 (2H, 2m, $PNHCH_2CH_2$), 1,35 i 1,38 (3H, 2s, $CH_3(3'T)$), 1,48 (2H, m, CH_2CH_2OH), 1,65 i 1,90 (2H, 2m, $2'(5'T)-H_2$), 1,83 (3H, s, $CH_3(5'T)$), 2,39 i 2,49 (2H, 2m, $2'(3'T)-H_2$), 2,65 i 2,78 (2H, 2m, $PNHCH_2$), 3,40 (2H, m, $5'(3'T)-H_2$), 3,56 (2H, m, CH_2OH), 3,65 (2H, m, $5'(5'T)-H_2$), 3,73 (6H, 2s, $OCH_3(5'T)$), 3,73 – 3,76 (6H, 4s, $OCH_3(3'T)$), 3,92 i 3,97 (1H, 2m, $4'(5'T)-H$), 4,13 i 4,18 (1H, 2m, $4'(3'T)-H$), 4,26 (1H, m, $3'(5'T)-H$), 5,07 (1H, m, $3'(3'T)-H$), 6,33 (1H, m, $1'(5'T)-H$), 6,41 (1H, m, $1'(3'T)-H$), 6,82 (8H, m, 3, 3', 5, 5'-H z grup DMTr), 7,17 – 7,37 (18H, m, ArH z grup DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,22 i 7,30 (1H, 2s, $6(5'T)-H$), 7,52 i 7,60 (1H, 2s, $6(3'T)-H$).

Synteza fosforanu 3'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylowo – 6-aminoheksylowo – etylowego 157. Diester H-fosfonianowy 150 i chlorowodorek 6-aminoheksan-1-olu 153e (10 ekw.) osuszono osobno przez odparowanie z pirydyną. H-Fosfonian 150 rozpuszczono następnie w pirydynie (2 mmol / ml) i dodano równocześnie chlorowodorek aminoalkoholu 153e w pirydynie (20 mmoli / ml) i jod (1,05 ekw.). Po zakończeniu reakcji (10') nadmiar jodu rozłożono etanotiolem, odparowano pirydynę, pozostały olej rozpuszczono w chlorku metylenu, przemyto $NaHCO_3$ aq. sat. i osuszono nad Na_2SO_4 bzw. Produkt 157 oczyszczono na kolumnie z żelazem krzemionkowym (5% v/v NH_3 aq. 25% w *n*-propanolu), frakcje zawierające czysty produkt zateżono i zliofilizowano z zestalonego benzenu. Wydajność 64%. A. E.: C: 61,9%, H: 6,8%, N: 5,4%. $C_{39}H_{50}N_3O_{10}P$ zawiera C: 61,3%, H: 6,7%, N: 5,6%. R_f (dwa diastereoizomery): 1,12 i 0,97 (faza A); 1,10 i 0,95 (faza B₂). 1H NMR, δ_H ($CDCl_3$): 1,27 i 1,32 (3H, 2dt, $^3J_{HH}$ 7,2, $^4J_{PH}$ 1,2, CH_2CH_3), 1,36 (4H, m, $POCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$), 1,39 (3H, s, CH_3), 1,49 (2H, m, $CH_2CH_2NH_2$), 1,66 (2H, m, $POCH_2CH_2$), 2,40 (2H, m, CH_2NH_2), 2,62 i 2,72 (2H, 2m, $2'-H_2$), 3,45 (2H, m, $5'-H_2$), 3,79 (6H, s, OCH_3), 4,00 (2H, m, $POCH_2CH_2$), 4,10 (2H, m, $POCH_2CH_3$), 4,27 i 4,29 (1H, 2m, $4'-H$), 5,12 (1H, m, $3'-H$), 6,45 (1H, m, $1'-H$), 6,84 (4H, d, J 8,7, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,25 – 7,39 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,57 (1H, s, 6-H).

Synteza fosforanu 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-5'-ylowo – 3'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylowo – 6-aminoheksylowego 158. Syntezę i oczyszczanie przeprowadzono analogicznie jak dla fosforanu 157, z tym, że wyjściowym związkiem był H-fosfonian 151. Wydajność 53%. A. E.: C: 68,3%, H: 6,1%, N: 6,1%. $C_{64}H_{68}N_5O_{12}P$ zawiera C: 68,0%, H: 6,1%, N: 6,2%. R_f (dwa diastereoizomery): 1,28 i 1,20 (faza A); 1,30 i 1,22 (faza B₂). 1H NMR, δ_H ($CDCl_3$): 1,27 (4H, m, $POCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$), 1,36 i 1,37 (3H, 2s, $CH_3(3'T)$), 1,53 (2H, m, $CH_2CH_2NH_2$), 1,55 (2H, m, $POCH_2CH_2$), 1,68 i 1,92 (2H, 2m, $2'(5'T)-H_2$), 1,82 i 1,85 (3H, 2s, $CH_3(5'T)$), 2,39 i 2,57 (2H, 2m, $2'(3'T)-H_2$), 2,76 (2H, m,

CH_2NH_2), 3,35 i 3,47 (2H, 2m, $5'_{(3T)}-H_2$), 3,65 (2H, m, $5'_{(5T)}-H_2$), 3,73 (6H, 2s, $OCH_3(5T)$), 3,74, 3,76 i 3,77 (6H, 3s, $OCH_3(3T)$), 3,83 (2H, m, $POCH_2$), 3,95 (1H, m, $4'_{(5T)}-H$), 4,09 i 4,19 (1H, 2m, $4'_{(3T)}-H$), 4,25 (1H, m, $3'_{(5T)}-H$), 5,10 (1H, m, $3'_{(3T)}-H$), 6,37 (1H, m, $1'_{(5T)}-H$), 6,46 (1H, m, $1'_{(3T)}-H$), 6,83 (8H, m, 3, 3', 5, 5'-H z grup DMTr), 7,22 – 7,34 (18H, m, ArH z grup DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,22 (1H, 2s, $6_{(5T)}-H$), 7,51 i 7,56 (1H, 2s, $6_{(3T)}-H$).

Synteza amidofosforanu 3'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylowo – N-(6-hydroksyheksylowego) 160 $\square Et_3NH^+$. Syntezę przeprowadzono analogicznie jak dla amidu 154, z tym, że wyjściowym związkiem był H-fosfonian 152, a utlenianie prowadzono w acetonitrylu. Po zakończeniu reakcji odparowano acetonitryl, pozostały olej rozpuszczono w chlorku metylenu, przemyto $NaHCO_3$ aq. sat. i osuszono nad Na_2SO_4 bzw.. Rozpuszczalnik odparowano, a pozostałość rozpuszczono w pirydynie. Do roztworu dodano równą objętość 25% NH_3 aq. i pozostawiono na noc w temp. pok. Roztwór następnie odparowano i związek 160 oczyszczono na kolumnie z żelazem krzemionkowym (0-15% CH_3OH w chlorku metylenu zawierającym 1% Et_3N). Frakcje zawierające czysty produkt zateżono, rozpuszczono w minimalnej ilości chlorku metylenu i strącono w układzie heksan–eter dietylowy 1:1. Osad odsączono i wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność 54%. A. E.: 64,6%, H: 7,4%, N: 7,2%. $C_{41}H_{57}N_4O_8P$ zawiera C: C: 64,4%, H: 7,5%, N: 7,3%. R_f : 0,32 (faza C), 0,47 (faza D). 1H NMR, δ_H ($CDCl_3$): 1,30 (6H, m, $PNHCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2OH$), 1,34 (3H, s, CH_3), 1,36 [9H, t, J 7,5, $N(CH_2CH_3)_3$], 1,50 (2H, m, CH_2CH_2OH), 2,35 i 2,64 (2H, 2m, $2'-H_2$), 2,77 (2H, m, $NHCH_2$), 3,09 [6H, q, J 7,5, $N(CH_2CH_3)_3$], 3,44 (2H, m, $5'-H_2$), 3,56 (2H, t, J 6,3, CH_2OH), 3,77 (6H, s, OCH_3), 4,26 (1H, m, $4'-H$), 4,94 (1H, m, $3'-H$), 6,39 (1H, m, $1'-H$), 6,82 (4H, d, J 9,0, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,18–7,40 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,60 (1H, s, 6-H).

Synteza amidofosfonianu 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-tymidyn-3'-ylowo – N-butylowego 162. H-Fosfonian nukleozydowo – aryłowy 177 (0,5 mmola) traktowany był butyloaminą (0,25 ml, 2,5 mmola) w pirydynie (5 ml) przez 5'. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono chlorkiem metylenu (10x) i przemyto $NaCl$ aq. sat. Faza organiczna została osuszona nad bezwodnym Na_2SO_4 i odparowana do gęstego oleju. Zanieczyszczenia polarne oddzielono od produktu 162 poprzez szybkie sączenie na kolumnie z żelazem krzemionkowym (związek 162 jest częściowo nietrwały podczas chromatografii co jest przyczyną jego niskiej wydajności po oczyszczeniu). Jako fazę wymywającą stosowano chlorek metylenu z metanolem (10%). Odpowiednie frakcje połączono, odparowano, rozpuszczono w chlorku metylenu. Produkt 162 wydzielono przez wytrącenie do heksanu i po odsączeniu wysuszono w próżni. Wydajność 25%. A. E.: C: 63,2%, H: 6,2%, N: 6,3%; $C_{35}H_{42}N_3O_8P$ zawiera C: 63,3%, H: 6,4%, N: 6,3%. R_f : 1,16 (faza A), 1,34 (faza B₂). 1H NMR, δ_H ($CDCl_3$): 0,88 i 0,92 (3H, 2t, J 7,2 i 7,5, $CH_2CH_3CH_3$) 1,24–1,51 (4H, m, $CH_2CH_2CH_2CH_3$), 1,39 i 1,41 (3H, 2s, 5 - CH_3), 2,43 i 2,57 (2H, m, $2'-H_2$), 2,80 i 2,89 (2H, m, $NHCH_2CH_2$), 3,38 i 3,52 (2H, m, $5'-H_2$), 3,79 (6H, s, OCH_3), 4,24 (1H, m, $4'-H$), 5,16 (1H, m, $3'-H$), 5,83 i 7,99 (1H, 2d, J 646,8 i 648,6,

PH), 6,46 (1H, m, 1'-H), 6,84 (4H, d, J 9,0, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,24 – 7,39 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,56 i 7,58 (1H, 2s, 6-H), 8,6 (1H, br m, NH, wymiana z D₂O);

Ogólna procedura syntezy H-fosfonianów bis(aminoalkilowych) (chlorowodorków) typu 165. Fosforyn difenyłowy rozpuszczony w acetonitrylu (1 mmol / ml) traktowany był aminoalkoholem (2 ekw.) w ciągu 5'. Przez roztwór przepuszczano następnie gazowy bezwodny chlorowódor i produkt typu 165 (monochlorowodorek, jak stwierdzono na podstawie ilości strąconego AgCl po dodaniu wodnego roztworu AgNO₃) wytrącał się w postaci gęstego oleju. Roztwór zdekantowano, pozostały olej przemyto acetonitrylem, rozpuszczono w minimalnej ilości DMSO i strącono w acetonitrylu (nadmiar 10x) uzyskując czysty produkt typu 165, ponownie jako gęsty olej. Po zdekantowaniu rozpuszczalnika pozostały olej przemyto acetonitrylem i wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem.

H-fosfonian bis(2-aminoetyłowy) (chlorowodorek) 165a. Wydajność 33%. S. M.: MH⁺: 169. C₄H₁₄N₂O₃PCl ma (M⁺ - Cl): 169; ¹H NMR, δ_H [(CD₃)₂SO]: 3,11 (4H, bm, CH₂NH₃⁺), 4,31 (4H, m, POCH₂), 5,81 i 8,23 (1H, d, J 720,6, HP).

H-fosfonian bis(2-aminopropylowy) (chlorowodorek) 165b. Wydajność 43%. S. M.: MH⁺: 197. C₆H₁₈N₂O₃PCl ma (M⁺ - Cl): 197; ¹H NMR, δ_H [(CD₃)₂SO]: 1,96 (4H, m, CH₂CH₂CH₂), 2,87 (4H, t, J 7,2, CH₂NH₃⁺), 4,12 (4H, m, POCH₂), 5,73 i 8,08 (1H, d, J 705,3, HP).

H-fosfonian bis(2-aminobutyłowy) (chlorowodorek) 165c. Wydajność 45%. S. M.: MH⁺: 225. C₈H₂₂N₂O₃PCl ma (M⁺ - Cl): 225; ¹H NMR, δ_H [(CD₃)₂SO]: 1,45 (4H, m, CH₂CH₂NH₃⁺), 1,60 (4H, m, POCH₂CH₂), 2,79 (4H, m, CH₂NH₃⁺), 4,02 (4H, m, POCH₂), 5,71 i 8,04 (1H, d, J 697,2, HP).

H-fosfonian bis(2-aminoheksyłowy) (chlorowodorek) 165e. Wydajność 32%. S. M.: MH⁺: 281. C₁₀H₂₆O₃N₂PCl ma (M⁺ - Cl): 281; ¹H NMR, δ_H [(CD₃)₂SO]: 1,33 (8H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 1,59 (8H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 2,74 (4H, t, J 7,5, CH₂NH₃⁺), 4,00 (4H, m, 5,67 i 7,99 (1H, d, J 694,5, HP).

Ogólna procedura syntezy H-fosfonianów aminoalkilowych typu 173. Do roztworu fosforynu difenyłowego (4,2 ml, 20 mmoli) w acetonitrylu (250 ml) dodano aminoalkohol typu 124 (40 mmoli). Po 15' dodano wody (1 ml, 55,5 mmola) i mieszaninę pozostawiono w temp. pok. na 5 dni. Wytrącone białe kryształy produktu 173 zebrano, przemyto dwukrotnie eterem i wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem.

H-Fosfonian 5-aminopentylowy 173d. Wydajność 79%. ¹H NMR, δ_H (D₂O): 1,49 (2H, m, CH₂CH₂CH₂), 1,67 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 3,03 (2H, t, J 7,2, CH₂NH₃⁺), 3,80 (2H, dt, J_{HH} 6,8, J_{HP} 8,3, POCH₂), 6,74 (1H, d, J 631,9, HP).

H-Fosfonian 6-aminoheksyłowy 173e. Wydajność 71%. ¹H NMR, δ_H (D₂O): 1,41 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 1,64 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 2,99 (2H, t, J 7,3, CH₂NH₃⁺), 3,86 (2H, dt, J_{HH} 6,6, J_{HP} 8,4, POCH₂), 6,70 (1H, d, J 632,6, HP).

H-Fosfonian 2-(2-aminoetoksy)etylowy 173f. Wydajność 83%. ^1H NMR, δ_{H} (D_2O): 3,21 (2H, t, J 4,9 CH_2NH_3^+), 3,74 (2H, t, J 4,5, POCH_2CH_2), 3,79 (2H, t, J 5,1, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 4,01 (2H, m, POCH_2), 6,74 (1H, d, J 639,2, HP).

Synteza fosforanu 3'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo-tymidyn-5'-ylo - 2-aminoetylowego 176a \square Et_3NH^+ . Syntezę i oczyszczanie przeprowadzono wg opisanej powyżej procedury otrzymywania fosforodiestrów nukleozydowo – aminoalkilowych **139a-e** (metoda z preacylacją aminoalkoholi, str. 115). Wydajność 0,15 g (45%). A. E.: C: 57,2%; H: 6,0%; N: 6,1%. $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P} \times 1,5 \text{H}_2\text{O}$ zawiera C: 57,0%; H: 6,0%; N: 6,1%); R_f : 0,23 (faza C), 0,56 (faza D); ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 1,71 (3H, s, CH_3), 1,73 (2H, m, 2'- H_2), 2,98 (2H, m, CH_2NH_3^+), 3,53 (2H, m, POCH_2), 3,70 (6H, s, OCH_3), 3,83 (2H, m, 4'-H), 4,31 (1H, m, 3'-H), 6,18 (1H, m, 1'-H), 6,79 (4H, d J 7,2, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,18 – 7,42 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,44 (1H, s, 6-H), 8,26 (1H, br s, N^3H , wymiana z D_2O).

Ogólna procedura syntezy fosforanowych diestrów nukleozydowo – aminoalkilowych 176b, c, e. Syntezę przeprowadzono wg opisanej procedury otrzymywania fosforodiestrów nukleozydowo – aminoalkilowych **139b-e** (metoda z wolnymi aminoalkoholami, str. 114).

Fosforan 3'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-5'-ylo - 3-aminopropylowy 176b \square Et_3NH^+ . Wydajność 78%. A. E.: C: 57,6%; H: 6,0%; N: 6,0%. $\text{C}_{34}\text{H}_{40}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P} \times 1,5 \text{H}_2\text{O}$ zawiera C: 57,6%; H: 6,1%; N: 5,9%); R_f : 0,13 (faza C), 0,34 (faza D); ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3): 1,78 (3H, s, CH_3), 1,88 (2H, m, 2'- CH_2), 1,98 (2H, m, POCH_2CH_2), 2,98 (2H, m, CH_2NH_3^+), 3,54 (2H, m, POCH_2), 3,73 (6H, s, OCH_3), 3,78 (2H, m, 5'- H_2), 3,85 (1H, m, 4'-H), 6,30 (1H, m, 1'-H), 6,79 (4H, d, J 8,2, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,18 – 7,42 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,44 (1H, s, 6-H), 8,26 (1H, br s, N^3H , wymiana z D_2O).

Fosforan 3'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-5'-ylo - 4-aminobutyłowy 176c \square Et_3NH^+ . Wydajność 85%. A. E.: C: 58,3%; H: 6,2%; N: 5,7%. $\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P} \times 1,5 \text{H}_2\text{O}$ zawiera C: 58,2; H: 6,3%; N: 5,8%); R_f 0,18 (faza C), 0,30 (faza D); ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3) 1,61 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 1,75 (2H, m, POCH_2CH_2), 1,80 (2H, m, 2'- H_2), 1,81 (3H, s, CH_3), 2,86 (2H, m, CH_2NH_3^+), 3,51 (2H, m, POCH_2), 3,74 (6H, s, OCH_3), 3,78 (2H, m, 5'- H_2), 3,93 (1H, m, 4'-H), 4,32 (1H, m, 3'-H), 6,30 (1H, m, 1'-H), 6,80 (4H, d, J 8,2, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,17 – 7,46 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,48 (1H, s, 6-H), 8,21 (1H, br s, N^3H , wymiana z D_2O).

Fosforan 3'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-5'-ylo - 6-aminoheksylowy 176e \square Et_3NH^+ . Wydajność 51%. A. E.: C: 58,9%; H: 6,6%; N: 5,7%. $\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{P} \times 1,5 \text{H}_2\text{O}$ zawiera C: 59,2%; H: 6,6%; N: 5,6%); R_f : 0,17 (faza C), 0,41 (faza D); ^1H NMR, δ_{H} (CDCl_3) 1,36 (4H, m, $\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 1,48 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$), 1,61 (2H, m, POCH_2CH_2), 1,75 (2H, m, 2'- H_2), 1,82 (3H, s, CH_3), 2,81 (2H, m, CH_2NH_3^+), 3,52 (2H, m, POCH_2), 3,65 (2H, m, 5'- H_2), 3,78 (6H, s, OCH_3), 3,88 (1H, m, 4'-H), 4,31 (1H, m, 3'-H), 6,34 (1H, m, 1'-H), 6,80 (4H, d, J 8,1, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,15 – 7,41 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H), 7,53 (1H, s, 6-H).

Synteza H-fosfonianu 2-cyjanoetylowego 180. Do roztworu 2-cyjanoetanolu (20 mmoli, 1,36 ml) w pirydynie (5 ml) dodano fosforyn difenyłowy (10 mmoli, 2,1 ml). Po 10' dodano 25% wodny roztwór amoniaku (15 ml), wymieszano do uzyskania homogeniczności i pozostawiono na 10'. Mieszaninę rozpuszczalników odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a resztę wody usunięto przez odparowanie dodanego toluenu. Pozostałość roz tarto z Et₂O (3 x 20 ml) dla usunięcia fenolu i nadmiaru alkoholu. Powstały biały krystaliczny osad produktu 179 odfiltrowano, przemyto Et₂O i wysuszono pod zmniejszonym ciśnieniem. Wydajność 82%. ¹H NMR, δ_H (D₂O): 2,68 (2H, t, *J* 6,2, CH₂CN), 3,90 (2H, dt, *J*_{HH} 6,2, *J*_{HP} 8,4, POCH₂), 6,61 (1H, d, *J* 640,8, PH).

Ogólna procedura syntezy N-dimetoksytrytylowanych H-fosfonianów aminoalkilowych typu 182. Odpowiedni H-fosfonian aminoalkilowy 173 (5 mmoli) i DBU (10 mmoli, 1,50 ml) odparowano dwukrotnie z pirydyną i pozostałość rozpuszczono w tym samym rozpuszczalniku. Następnie dodano DMTr-Cl (6 mmoli, 2,03 g) i mieszaninę pozostawiono na noc. Po standardowym przerobieniu z wodnym roztworem NaHCO₃ i chromatografii na żelu krzemionkowym (0-10% metanolu w CH₂Cl₂-Et₃N 99 : 1 v/v), produkt 182 został wyizolowany i zliofilizowany z zestalonego benzenu.

H-Fosfonian N-(4,4'-dimetoksytrytylo)-5-aminopentylowy 182d·Et₃NH⁺. Wydajność 81%. ¹H NMR, δ_H (CD₃Cl): 1,25 (2H, m, CH₂CH₂CH₂), 1,31 [9H, t, *J* 7,5, N(CH₂CH₃)₃], 1,56 (2H, m, POCH₂CH₂), 1,75 (2H, m, NHCH₂CH₂), 2,38 (2H, m, NHCH₂), 3,00 [6H, q, *J* 7,5, N(CH₂CH₃)₃], 3,72 (2H, dt, *J* 8,1, POCH₂), 6,55 (1H, d, *J* 626,1, HP), 6,83 (4H, d, *J* 9,0, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,16–7,40 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H).

H-Fosfonian N-(4,4'-dimetoksytrytylo)-6-aminoheksylowy 182e·Et₃NH⁺. Wydajność 74%. ¹H NMR, δ_H (CD₃Cl): 1,23 (4H, m, CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂), 1,30 [9H, t, *J* 7,5, N(CH₂CH₃)₃], 1,54 (2H, m, POCH₂CH₂), 1,72 (2H, m, NHCH₂CH₂), 2,40 (2H, m, NHCH₂), 3,04 [6H, q, *J* 7,5, N(CH₂CH₃)₃], 3,71 (2H, dt, *J* 8,1, POCH₂), 6,58 (1H, d, *J* 628,1, HP), 6,82 (4H, d, *J* 9,0, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,18–7,40 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H).

H-Fosfonian N-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2-(2-aminoetoksy)etylowy 182f·Et₃NH⁺. Wydajność 89%. ¹H NMR, δ_H (CD₃Cl): 1,27 [9H, t, *J* 7,5, N(CH₂CH₃)₃], 2,37 (2H, bs, NHCH₂), 2,99 [6H, q, *J* 7,5, N(CH₂CH₃)₃], 3,43 (2H, bs, POCH₂CH₂), 3,54 (2H, bs, NHCH₂CH₂), 3,79 (2H, bs, POCH₂), 6,61 (1H, d, *J* 625,1, HP), 6,75 (4H, d, *J* 9,0, 3, 3', 5, 5'-H z grupy DMTr), 7,10–7,42 (9H, m, ArH z grupy DMTr oprócz 3, 3', 5, 5'-H).

Protokół fosforylacji oligonukleotydów typu I do 5'-H-fosfonianów oligonukleotydów typu II.

A. Metoda z użyciem kwasu pirofosfonowego.

Lp.	Funkcja	Objętość [μl]	Czas [min]
1.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
2.	Kondensacja: 0,2M H ₄ P ₂ O ₅ w Py	4x100	120
3.	Przemycie CH ₃ CN ^a	8x100	1
4.	Utlenienie: 3% I ₂ w Py-H ₂ O 9:1 ^a	2x100	10
5.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
6.	Suszenie		3

^a Tylko dla oligomeru otrzymanego metodą H-fosfonianową

B. Metoda z użyciem fosforynu difenylowego.

Lp.	Funkcja	Objętość [μl]	Czas [min]
1.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
2.	Transestryfikacja: 0,5M (PhO) ₂ P(O)H w Py	100	5
3.	Przemycie CH ₃ CN	2x100	0,25
4.	Hydroliza: 10% H ₂ O w Py	2x100	30
5.	Przemycie CH ₃ CN ^a	8x100	1
6.	Utlenienie: 3% I ₂ w Py-H ₂ O 9:1 ^a	2x100	10
7.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
8.	Suszenie		3

^a Tylko dla oligomeru otrzymanego metodą H-fosfonianową

Protokół funkcjonalizacji oligonukleotydów typu I do 5'-aminoalkilofosforanów oligonukleotydów typu VI.

A. Podejście z kondensacją wobec NEP-Cl.

Lp.	Funkcja	Objętość [μl]	Czas [min]
1.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
2.	Kondensacja: 0,2M H ₄ P ₂ O ₅ w Py	4x100	120
3.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
4.	Kondensacja: 0,2M chlorowodorek aminoalkoholu w Py (40 μl), następnie 0,3M NEP-Cl w Py (80μl)	2x120	4
5.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
6.	Utlenienie: 3% I ₂ w Py-H ₂ O 9:1	2x100	10
7.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
8.	Suszenie		3

B. Podejście z fosforynem difenylowym

Lp.	Funkcja	Objętość [μl]	Czas [min]
1.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
2.	Transestryfikacja: 0,5M (PhO) ₂ P(O)H w Py	100	5
3.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
4.	Transestryfikacja: 0,2M chlorowodorek aminoalkoholu w Py	2x100	60
5.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
6.	Utlenienie: 3% I ₂ w Py-H ₂ O 9:1	2x100	10
7.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
8.	Suszenie		3

C. Podejście z kondensacją oksydacyjną (wersja z H-fosfonianem 2-cyanoetylowym)

Lp.	Funkcja	Objętość [μl]	Czas [min]
1.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
2.	Kondensacja: 0,2M H-fosfonian 2-cyanoetylowy w Py (40 μl), następnie 0,3M Piv-Cl w Py (80μl)	2x120	10
3.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
4.	Utlenienie: 3% I ₂ , 0,2M chlorowodorek aminoalkoholu, 0,5M tetrazol w Py	2x100	10
5.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
6.	Suszenie		3

D. Podejście z kondensacją oksydacyjną (wersja z fosforynem difenylowym)

Lp.	Funkcja	Objętość [μl]	Czas [min]
1.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
2.	Transestryfikacja: 0,5M (PhO) ₂ P(O)H w Py	100	5
3.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
4.	Transestryfikacja: 0,2M 2-cyanoetanol w Py	2x100	60
5.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
6.	Utlenienie: 3% I ₂ , 0,2M chlorowodorek aminoalkoholu, 0,5M tetrazol w Py	2x100	10
7.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
8.	Suszenie		3

E. Podejście z syntonem nienukleotydowym

Lp.	Funkcja	Objętość [μl]	Czas [min]
1.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
2.	Kondensacja: 0,2M H-fosfonian DMTr-aminoalkilowy w Py (40 μl), następnie 0,3M Piv-Cl w Py (80μl)	2x120	1,5
3.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
4.	Przemycie chlorkiem etylenu	2x100	0,25
5.	Odtrytylowanie: 3% DCA w chlorku etylenu	12x100	3
6.	Przemycie chlorkiem etylenu	8x100	1
7.	Suszenie		3

Protokół przyłączania grup reporterowych do sfunkcjonalizowanych oligonukleotydów typu VI na podłożu stałym.

Lp.	Funkcja	Objętość [μl]	Czas [min]
1.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
2.	Przemycie 10% DBU w Py	2x100	5
3.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
4.	Przyłączenie znacznika: 0,03M roztwór w Py (w reakcjach uwalniających produkty kwasowe – w obecności 3% DBU)	2x100	30
5.	Przemycie CH ₃ CN	8x100	1
6.	Suszenie		3

TABELA 13. PRZESUNIĘCIA CHEMICZNE I STAŁE SPRZEŻEŃ ^{31}P NMR PRODUKTÓW PRZEJŚCIOWYCH I KOŃCOWYCH

Związek	Przesunięcie chemiczne ^a δ_{P} [ppm]	$^1J_{\text{PH}}$ [Hz]	$^3J_{\text{PH}}$ [Hz]
<u>120</u>	-6,80 ^b	652,6	–
<u>121</u>	2,89 ^c	628,5	9,3
<u>122</u>	1,15 ^d	736,1	–
<u>123</u>	4,90; 6,31 ^c	724,8; 723,9	8,3; 9,3
<u>125a</u>	8,36; 8,47 ^f	706,8	11,0; 9,7
<u>125b</u>	8,26; 8,30 ^f	706,3	9,3; 7,4
<u>125e</u>	7,67; 7,75 ^f	701,9	9,7; 8,5
<u>126a</u>	0,22 ^g	–	8,6; 7,3
<u>126b</u>	0,72 ^g	–	9,5; 8,3
<u>126e</u>	-0,31 ^g	–	7,3; 6,1
<u>127</u>	123,29 ^d	–	9,2
<u>128a</u>	138,02; 138,07 ^h	–	?
<u>128b</u>	134,04; 134,75 ^h	–	?
<u>129a</u>	26,20 ^b	–	?
<u>129b</u>	3,70; 3,73 ^h	–	?
<u>129c</u>	14,87; 14,98 ^h	–	?
<u>130</u>	8,18 ^h	–	?
<u>132a</u>	0,87 ^g	–	6,5
<u>132b</u>	0,41 ^g	–	5,4
<u>132c</u>	-0,50 ^g	–	7,4
<u>132d</u>	-0,47 ^g	–	5,5; 7,4
<u>132e</u>	-0,46 ^g	–	7,4
<u>133</u>	3,34 ⁱ	–	27,8
<u>134a</u>	8,47; 8,81 ^f	719,2; 738,9	7,4
<u>134b</u>	8,20; 8,40 ^f	710,0; 711,8	7,4; 9,4
<u>134c</u>	7,88; 8,00 ^f	704,4; 706,3	9,3
<u>134d</u>	7,82; 7,96 ^f	702,6; 704,4	7,4
<u>134e</u>	7,77; 7,91 ^f	704,4	9,3
<u>135b</u>	-13,10; -13,25; -13,45; -13,60 ^h	–	?
<u>135c</u>	-13,09; -13,25; -13,34; -13,45 ^h	–	?
<u>135d</u>	-13,07; -13,18; -13,31; -13,42 ^h	–	?
<u>135e</u>	-13,09; -13,25; -13,34; -13,45 ^h	–	?
<u>137a</u>	134,40 ^j	–	8,7
<u>137b</u>	129,52 ^j	–	9,2
<u>137c</u>	132,10 ^k	–	9,3
<u>137d</u>	131,95 ^l	–	8,3
<u>138c</u>	138,85 ^h	–	?
<u>138d</u>	138,95 ^l	–	7,4
<u>139a</u>	16,78 ^k	–	8,6
<u>139b</u>	-8,37 ^h	–	?
<u>139c</u>	2,16 ^m	–	4,7; 17,6
<u>139d</u>	1,79 ^l	–	6,4; 5,6; 5,5; 6,6; 4,6; 6,6
<u>140c</u>	1,43 ^h	–	?

Związek	Przesunięcie chemiczne ^a δ_P [ppm]	$^1J_{PH}$ [Hz]	$^3J_{PH}$ [Hz]
<u>140d</u>	1,50 ^l	–	7,4
<u>141a</u>	1,71 ^h	–	?
<u>141c</u>	0,44 ^j	–	7,4
<u>141d</u>	0,44 ^j	–	5,6
<u>142a</u>	8,56 ⁿ	714,7	7,6
<u>142b</u>	7,97; 8,02 ^m	703,5	8,4
<u>142c</u>	7,72 ^m	701,7	5,5; 7,4
<u>142d</u>	7,70; 7,75 ^m	701,1	6,0; 7,7
<u>143a</u>	23,10 ^m	715,6	10,4
<u>144a</u>	6,12 ^o	628,4	9,7
<u>145</u>	8,81 ^m	694,3	9,2
<u>147</u>	0,15 ^{i-p}	–	6,8
<u>150</u>	7,44; 7,50 ^r	704,5	8,3
<u>151</u>	8,11; 9,47 ^r	714,7; 715,5	8,4
<u>152</u>	7,72; 7,74 ^r	718,4	2,8
<u>154</u>	10,16; 10,27 ^l	–	8,4
<u>155</u>	10,08; 10,20 ^l	–	8,3
<u>156</u>	10,41; 10,86 ^h	–	?
<u>157</u>	-1,90; -2,08 ^l	–	7,4
<u>158</u>	-1,62; -1,81 ^h	–	?
<u>159</u>	-1,17; -1,31 ^h	–	?
<u>160</u>	7,73 ^j (6,89 ^s)	–	7,4
<u>161</u>	7,54 ^m	685,9	9,3
<u>162</u>	13,21; 13,34 ^m	638,6; 640,5	11,2
<u>163</u>	12,96 ^m	618,8	10,2
<u>164a</u>	8,44 ^m	692,4	9,3
<u>164b</u>	8,02 ^m	687,7	9,2
<u>164c</u>	7,83 ^m	687,7	9,2
<u>164e</u>	7,86 ^m	686,8	9,2
<u>165a</u>	9,21 ^m	698,9	8,8
<u>165b</u>	8,44 ^m	688,7	8,4
<u>165c</u>	8,10 ^m	686,8	8,3
<u>165e</u>	8,13 ^m	686,9	8,3
<u>168</u>	7,94 ^m	693,4	9,3
<u>171</u>	2,57 ^o	606,1	8,4
<u>172a</u>	8,29 ^m	698,9	8,3
<u>172b</u>	8,37 ^t	705,8	?
<u>172c</u>	8,15 ^t	?	?
<u>172e</u>	8,16 ^t	?	?
<u>173a</u>	6,70 ^{o, u}	643,7	8,7
<u>173b</u>	6,46 ^{o, u}	637,8	8,0
<u>173c</u>	6,42 ^{o, u}	634,0	8,3
<u>173d</u>	6,43 ^{o, u}	633,2	8,0
<u>173e</u>	6,42 ^{o, u}	633,2	8,6
<u>173f</u>	6,60 ^{o, u}	640,1	8,6

Związek	Przesunięcie chemiczne ^a δ_P [ppm]	¹ J _{PH} [Hz]	³ J _{PH} [Hz]
<u>174a</u>	9,13; 10,04 ^r	707,1; 706,3	8,4
<u>174b</u>	8,71; 9,64 ^r	688,7; 699,7	8,4
<u>174c</u>	8,47; 9,43 ^r	699,8; 691,5	8,3
<u>174e</u>	8,47; 9,44 ^r	699,2; 698,9	8,3
<u>176a</u>	1,43 ^h	–	?
<u>176b</u>	1,25 ^h	–	?
<u>176c</u>	-0,57 ^h	–	?
<u>176e</u>	-0,40 ^h	–	?
<u>177</u>	4,58 ^c	734,1	8,4
<u>178</u>	11,01 ^r	556,15	?
<u>179</u>	8,23 ^m	718,4	8,8
<u>180</u>	3,60 ^o	607,1	8,3
<u>182e</u>	2,80 ^o	604,3	7,4
<u>182f</u>	3,44 ^o	604,3	8,3

^aWidma w pirydynie z rozprężeniem heterojądrowym. Wzorzec zewnętrzny: 2% H₃PO₄ w D₂O. ^bDublet niesymetrycznych trypletów. ^cDublet dubletów. ^dDublet. ^eDwa dublety trypletów. ^fDwa częściowo pokrywające się dublety trypletów. ^gCzęściowo pokrywający się dublet trypletów. ^hNierozdzielony multiplik. ⁱTryplet. ^jKwartet. ^kSekstet. ^lMultiplik. ^mDublet kwintetów. ⁿDublet kwartetów. ^oDublet trypletów. ^pWidmo w metanolu. ^rDublet nierozdzielonych multiplik. ^sKwintet, widmo w chlorku metylenu. ^tStałe sprzężeń nie wyznaczone ze względu na pokrywanie się sygnałów. ^uWidmo w wodzie.

VIII. LITERATURA

1. R.A. Gibbs, P.N. Nguyen, C.T. Caskey, *Nucl. Acids Res.* **1989**, *17*(7), 2437.
2. M.J. Wolcott, *Clin. Microbiol. Rev.* **1992**, *5*(4), 370.
3. W. King, S. Raposa, J. Warshaw, A. Johnson, D. Halbert, J.D. Klinger, *Int. J. Food Microbiol.* **1989**, *8*, 225.
4. G. Parsons, *J. Clin. Immunoassays* **1995**, *11*(4), 152.
5. C. Kim, B. Swaminathan, P.K. Cassady, L.W. Mayer, B.P. Holloway, *App. Environmental Microbiol.* **1991**, *57*(6), 1609.
6. U. Landegren, R. Kaiser, C.T. Caskey, L. Hood, *Science* **1988**, *242*, 229.
7. R.W. Adamiak i E. Krzymańska-Olejnik, *Biotechnologia* **1989**, *2*(4), 48.
8. E. Krzymańska-Olejnik i R.W. Adamiak, *Biotechnologia* **1989**, *3-4*(5-6), 50.
9. R. Téoule, *Nucleosides & Nucleotides* **1991**, *10*(1-3), 129.
10. *Oligonucleotides and Analogues. A Practical Approach*, pod red. F. Ecksteina, (Oxford University Press, Oxford, 1991).
11. R.B. Wallace, J. Shaffer, R.F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose, K. Itakura, *Nucl. Acids Res.* **1979**, *6*(11), 3543.
12. H.J. Holtke i C. Kessler, *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*(19), 5843.
13. H.J. Holtke, G. Sagner, C. Kessler, G. Schmitz, *Biotechniques* **1992**, *12*(1), 104.
14. I. Bronstein, J.C. Voyta, K.G. Lazzari, O. Murphy, B. Edwards, L.J. Kricka, *Biotechniques* **1990**, *8*(3), 310.
15. R. Tizard, R.L. Cate, K.L. Ramachandran, M. Wysk, J.C. Voyta, O.J. Murphy, I. Bronstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 4514.
16. I. Bronstein i P. Dimond, *Diagnostics & Clinical Testing* **1990**, *28*, 36.
17. N. Arnold, R. Seibl, C. Kessler, J. Wienberg, *Biotechnic Histochem.* **1992**, *67*(2), 59.
18. M.S. Urdea, B.D. Warner, J.A. Running, M. Stempien, J. Clyne, T. Horn, *Nucl. Acids Res.* **1988**, *16*(11), 4937.
19. M.J. De Vos, A. van Elsen, A. Bollen, *Nucleosides & Nucleotides* **1994**, *13*(10), 2245.
20. R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, H.A. Erlich, *Science* **1988**, *239*, 487.
21. R.K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, N. Arnheim, *Science* **1985**, *230*, 1350.
22. *Protocols for Oligonucleotide Conjugates. Synthesis and Analytical Techniques*, pod red. S. Agrawala, (Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 1994).
23. R. Zuckerman, D. Corey, P. Schultz, *Nucl. Acids Res.* **1987**, *15*(13), 5305.
24. K.C. Gupta, P. Sharma, P. Kumar, S. Sathyanarayana, *Nucl. Acids Res.* **1991**, *19*(11), 3019.
25. A. Kumar, *Nucleosides & Nucleotides* **1993**, *12*(7), 729.
26. A. Kumar, S. Advani, H. Dawar, G.P. Talwar, *Nucl. Acids Res.* **1991**, *19*(16), 4561.
27. U. Asseline, E. Bonfils, R. Kurfurst, M. Chassignol, V. Roig, N.T. Thuong, *Tetrahedron* **1992**, *48*(7), 1233.
28. E. Bonfils i N.T. Thuong, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*(26), 3053.
29. A. Kumar, *Nucleosides & Nucleotides* **1993**, *12*(10), 1047.
30. C.R. Petrie, M.W. Reed, A.D. Adams, R.B. Meyer, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*(1), 85.
31. P.S. Nelson, R.A. Frye, E. Liu, *Nucl. Acids Res.* **1989**, *17*(18), 7187.
32. J. Thaden i P.S. Miller, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 395.
33. J. Haralambidis, L. Duncan, K. Angus, G.W. Tregear, *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*(3), 493.
34. J. Haralambidis, K. Angus, S. Pownall, L. Duncan, M. Chai, G.W. Tregear, *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*(3), 501.
35. J. Haralambidis, L. Violaris, G.W. Tregear, *Nucleosides & Nucleotides* **1991**, *10*(1-3), 333.
36. J. Haralambidis, L. Lagniton, G.W. Tregear, *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* **1994**, *4*(8), 1005.
37. G.B. Dreyer i P.B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 968.
38. J. Hovinen, A.P. Gouzaev, A.V. Azhaye, H. Lönnberg, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*(32), 5163.
39. J. Hovinen, A. Guzaev, A. Azhaye, H. Lönnberg, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*(50), 8169.
40. J. Hovinen, A. Guzaev, A. Azhaye, H. Lönnberg, *Tetrahedron* **1994**, *50*(24), 7203.
41. P. Theisen, C. McCollum, A. Andrus, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*(35), 5033.

42. K. Yamana, K. Nunota, H. Nakano, O. Sangen, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*(16), 2555.
43. U. Maskos i E.M. Southern, *Nucl. Acids Res.* **1992**, *20*(7), 1679.
44. A. Kumar, *Nucleosides & Nucleotides* **1994**, *13*(10), 2125.
45. T. Kempe, W.I. Sundquist, F. Chow, S.L. Hu, *Nucl. Acids Res.* **1985**, *13*(1), 45.
46. O.S. Bashuk, V.F. Zarytova, A.S. Levina, *Bioorg. Khim.* **1988**, *14*(5), 606.
47. A. Kumar i S. Advani, *Nucleosides & Nucleotides* **1992**, *11*(5), 999.
48. C. Pierlot i C. Sergheraert, *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* **1992**, *2*(3), 267.
49. A. Guzaev, H. Salo, A. Azhaye, H. Lönnberg, *Bioconjugate. Chemistry.* **1996**, *7*(2), 240.
50. J.R. Fino, P.G. Mattingly, K.A. Ray, *Bioconjugate. Chemistry.* **1996**, *7*(2), 274.
51. L.M. Smith, S. Fung, M.W. Hunkapiller, T.J. Hunkapiller, L.E. Hood, *Nucl. Acids Res.* **1985**, *13*(7), 2399.
52. B.S. Sproat, B. Beijer, P. Rider, *Nucl. Acids Res.* **1987**(161), 6181.
53. B.S. Sproat, B. Beijer, P. Rider, P. Neuner, *Nucl. Acids Res.* **1987**, *15*(12), 4837.
54. N.D. Sinha i R.M. Cook, *Nucl. Acids Res.* **1988**, *16*(6), 2659.
55. B.A. Connolly i P. Rider, *Nucl. Acids Res.* **1985**, *13*(12), 4485.
56. B.G. de la Torre, A.M. Avino, M. Escarceller, M. Royo, F. Albericio, R. Eritja, *Nucleosides & Nucleotides* **1993**, *12*(9), 993.
57. J.M. Coull, H.L. Weith, R. Bischoff, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*(34), 3991.
58. B.A. Connolly, *Nucl. Acids Res.* **1987**, *15*(8), 3131.
59. R.K. Gaur, *Nucleosides & Nucleotides* **1991**, *10*(4), 895.
60. S. Agrawal, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*(50), 7025.
61. J. Hovinen, A. Guzaev, A. Azhaye, H. Lönnberg, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, *19*, 2745.
62. H. Bazin, A. Roget, R. Téoule, *Nucleosides & Nucleotides* **1991**, *10*(1-3), 363.
63. Y.A. Berlin, V.A. Korshun, Y.G. Boreskov, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* **1991**, *21*, 85.
64. P.S. Nelson, R. Sherman-Gold, R. Leon, *Nucl. Acids Res.* **1989**, *17*(18), 7179.
65. A.J. Cocuzza, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*(46), 6287.
66. A.J. Cocuzza i R.J. Zagursky, *Nucleosides & Nucleotides* **1991**, *10*(1-3), 413.
67. R.T. Pon, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*(14), 1715.
68. P. Kumar, D. Bhatia, B.S. Garg, K.C. Gupta, *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* **1994**, *4*(14), 1761.
69. F. Schubert, K. Ahlert, D. Cech, A. Rosenthal, *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*(11), 3427.
70. P. Theisen, C. McCollum, A. Andrus, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* **1992**, 99.
71. N.T. Thuong i M. Chassignol, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*(46), 5905.
72. U. Moller, D. Cech, F. Schubert, *Liebigs Ann. Chem.* **1990**, *16*(12), 1221.
73. J.S. Mann, Y. Shibata, T. Meehan, *Bioconjugate Chem.* **1992**, *3*(6), 554.
74. S. Mielewczyk, D. Więckowska, E. Krzymańska-Olejnik, Z. Gdaniec, R.W. Adamiak, *Acta Biochim. Pol.* **1989**, *36*(3-4), 225.
75. W. Bannwarth i D. Schmidt, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*(12), 1513.
76. V.A. Korshun, E.V. Nozhevnikova, Y.A. Berlin, *Bioorg. Khim.* **1993**, *19*(1), 139.
77. K. Misiura, I. Durrant, M.R. Evans, M.J. Gait, *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*(15), 4345.
78. A. Roget, H. Bazin, R. Téoule, *Nucl. Acids Res.* **1989**, *17*(19), 7643.
79. J. Grzybowski, D.W. Will, R.E. Randall, C.A. Smith, T. Brown, *Nucl. Acids Res.* **1993**, *21*(8), 1705.
80. E. Uhlman i J. Engels, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*(9), 1023.
81. T. Horn i M.S. Urdea, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*(39), 4705.
82. J.E. Celebuski i C. Chan, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5535.
83. A. Guzaev, H. Salo, A. Azhaye, H. Lönnberg, *Tetrahedron* **1995**, *51*(34), 9375.
84. S.A. Filipov, D.S. Esipov, S.W. Kalinichenko, V.N. Dorynin, *Bioorg. Khim.* **1989**, *15*(4), 527.
85. A.G. Venyaminova, A.S. Levina, M.N. Repkova, N.A. Chentsova, *Bioorg. Khim.* **1989**, *15*(6), 844.
86. A. Kers, I. Kers, J. Stawiński, M. Sobkowski, A. Kraszewski, *Synthesis-Stuttgart* **1995**, *4*, 427.
87. J.C. Marsters, P. Ng, P. Jhurani, M. Vasser, N. Bischoberger, *Nucleosides & Nucleotides* **1990**, *9*(8), 1079.
88. A. Ono, A. Dan, A. Matsuda, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*(6), 499.
89. H. Maag, B. Schmidt, S.J. Rose, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*(35), 6449.
90. M.E. Douglas, B. Beijer, B.S. Sproat, *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* **1994**, *4*(8), 995.
91. M. Manoharan, L.K. Johnson, K.L. Tivel, R.H. Springer, P.D. Cook, *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* **1993**, *3*(12), 2765.
92. P. Kumar, A.K. Sharma, P. Sharma, B.S. Garg, K.C. Gupta, *Nucleos. Nucleot.* **1996**, *15*(4), 879.
93. T.H. Keller i R. Haner, *Nucl. Acids Res.* **1993**, *21*(19), 4499.

94. P. LI, P.P. Medon, D.C. Skingle, J.A. Lanser, R.H. Symons, *Nucl. Acids Res.* **1987**, *15*(13), 5275.
95. R. Kierzek i W.T. Markiewicz, *Nucleosides & Nucleotides* **1987**, *6*(1&2), 403.
96. B.S. Sproat, A.I. Lamond, B. Beijer, P. Neuner, U. Ryder, *Nucl. Acids Res.* **1989**, *17*(10), 3373.
97. J. Telser, K.A. Cruickshank, L.E. Morrison, T.L. Netzel, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6966.
98. A.F. Cook, E. Vuocolo, C.L. Brakel, *Nucl. Acids Res.* **1988**, *16*(9), 4077.
99. S. Sauvaigo, B. Fouqué, A. Roget, T. Livache, H. Bazin, C. Chypre, R. Téoule, *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*(11), 3175.
100. G.T. Horn i M.S. Urdea, *Nucl. Acids Res.* **1998**, *17*, 6959.
101. W.T. Markiewicz, G. Groger, R. Rosch, A. Żebrowska, H. Seliger, *Nucleosides & Nucleotides* **1992**, *11*(10), 1703.
102. A. Ono, N. Haginoya, M. Kiyokawa, N. Minakawa, A. Matsuda, *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* **1994**, *4*(2), 361.
103. C. Chang, T. Horn, D. Ahle, M.S. Urdea, *Nucleosides & Nucleotides* **1991**, *10*(1-3), 389.
104. N. Dolinnaya, S. Gryaznov, D. Ahle, C.A. Chang, Z.A. Shabarova, M.S. Urdea, T. Horn, *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* **1994**, *4*(8), 1011.
105. S. Mielewczyk, G. Dominiak, Z. Gdaniec, E. Krzymańska-Olejnik, R.W. Adamiak, *Nucleosides & Nucleotides* **1991**, *10*(1-3), 263.
106. W.H. Gmeiner, W. Luo, R.T. Pon, J.W. Lown, *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* **1991**, *19*(9), 487.
107. U. Pieleś, B.S. Sproat, G.M. Lamm, *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*(15), 4355.
108. G. Tong, J.M. Lawlor, G.W. Tregear, J. Haralambidis, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*(8), 2223.
109. T. Holletz, U. Moller, A. Knaf, R. Reinhardt, D. Cech, *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, *10*, 1051.
110. M. Kwiatkowski, M. Samiotaki, U. Lamminmaki, V.M. Mukkala, U. Landegren, *Nucl. Acids Res.* **1994**, *22*(13), 2604.
111. V.P. Veiko, K.I. Ratmanova, A.S. Osipov, N.N. Veiko, A.V. Karpuhin, V.G. Debarov, *Doklady Akad. Nauk CCCP* **1990**, *313*(1), 214.
112. S. Agrawal i J.Y. Tang, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*(11), 1543.
113. S. Agrawal i P.C. Zamecnik, *Nucl. Acids Res.* **1990**, *18*(18), 5419.
114. V.P. Veiko, K.I. Ratmanova, A.S. Osipov, M.T. Bulenkov, V.V. Pugachev, *Bioorg. Khim.* **1991**, *17*(5), 685.
115. Y. Iso, F. Yoneda, H. Ikeda, K. Tanaka, K. Fuji, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*(4), 503.
116. M.J. Odonnell, N. Hebert, L.W. McLaughlin, *Bioorg. Medicinal Chem. Lett.* **1994**, *4*(8), 1001.
117. J.M. Dalla Riva Toma, D.E. Bergstrom, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2418.
118. A. Kumar i S. Malhotra, *Nucleosides & Nucleotides* **1992**, *11*(5), 1003.
119. J. Stawiński i M. Thelin, *Nucleosides & Nucleotides* **1990**, *9*(1), 129.
120. P.J. Garegg, T. Regberg, J. Stawiński, R. Strömberg, *Nucleosides & Nucleotides* **1987**, *6*(3), 655.
121. C. Brown, J.A. Boudreau, B. Hewitson, R.F. Hudson, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1975**, 504.
122. R.L. McConnell i J.R. Coover, *J. Org. Chem.* **1959**, *24*, 630.
123. R. Strömberg i J. Stawiński, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* **1987**, *18*, 185.
124. S. Huss, G. Gosselin, J. Stawiński, R. Strömberg, J.L. Imbach, *Nucleosides & Nucleotides* **1988**, *7*(3), 321.
125. M.P. Reddy, F. Farooqui, N.B. Hanna, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*(49), 8929.
126. F. Atherton, A. Openshaw, A. Todd, *J. Chem. Soc.* **1945**, 660.
127. A. Murakami, M. Nakaura, Y. Nakatsuji, S. Nagahara, Q. Tran-Cong, K. Makino, *Nucl. Acids Res.* **1991**, *19*(15), 4097.
128. H. Takaku, S. Yamakage, O. Sakatsume, M. Ohtsuki, *Chem. Lett.* **1988**, 1675.
129. E. Muller, *Methoden der Organischen Chemie*, Houben-Weyl, (George Thieme Verlag, Stuttgart, 1964).
130. K. Troev i G. Borisov, *Phos. Sulf.* **1987**, *29*, 129.
131. E. Tashev, S. Shenkov, K. Troev, G. Borisov, *Phos. Sulf. Sil.* **1991**, *56*, 225.
132. A. Sobkowska, M. Sobkowski, J. Stawiński, A. Kraszewski, *Nucleosides & Nucleotides* **1995**, *14*(3-5), 703.
133. D. D. Perrin, *Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution*, (Butterworth, London, 1965).
134. A. Kraszewski, M. Sobkowski, J. Stawiński, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1993**, 1699.
135. T. Wada, K. Ishikawa, T. Hata, *Tetrahedron* **1993**, *49*(10), 2043.
136. J. Jankowska, M. Sobkowski, J. Stawiński, A. Kraszewski, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*(20), 3355.

137. M. Sobkowski, J. Stawiński, A. Sobkowska, A. Kraszewski, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, **13**, 1803.
138. M. Sobkowski, J. Stawiński, A. Sobkowska, A. Kraszewski, *Nucleosides & Nucleotides* **1995**, **14**(3-5), 839.
139. J. Stawiński, A. Kraszewski, M. Sobkowski, *Phos. Sulf. Sil.* **1996**, **109-110**, 261.
140. A. Kers, I. Kers, A. Kraszewski, M. Sobkowski, T. Szabo, M. Thelin, R. Zain, J. Stawiński, *Nucleos. Nucleot.* **1996**, **15**(1-3), 361.
141. J. Cieślak, M. Sobkowski, A. Kraszewski, J. Stawiński, *Tetrahedron Lett.* **1996**, **37**(26), 4561.
142. A. Kers, I. Kers, J. Stawiński, M. Sobkowski, A. Kraszewski, *Tetrahedron* **1996**, **52**(29), 9931.
143. J. Cieślak, J. Jankowska, A. Kers, I. Kers, A. Sobkowska, M. Sobkowski, J. Stawiński, A. Kraszewski, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* **1996**, **61**, S242.
144. P.R. Hammond, *J. Chem. Soc.* **1962**, 2521.
145. M. Sobkowski, J. Stawiński, A. Kraszewski, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* **1996**, **61**, S238.
146. M. Sobkowski, J. Stawiński, A. Kraszewski, *Tetrahedron Lett.* **1995**, **36**(13), 2295.
147. M. Sobkowski, A. Kraszewski, J. Stawiński, *Nucleosides & Nucleotides* **1997**, przyjęte do druku.
148. A. I. Vogel, *Preparatyka organiczna*, (Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa, 1984).
149. P.J. Garegg, T. Regberg, J. Stawiński, R. Strömberg, *Chem. Scr.* **1986**, **26**, 59.
150. F. Seela i U. Kretschmer, *J. Org. Chem.* **1991**, **56**, 3861.
151. F. Himmelsbach i W. Pflleiderer, *Tetrahedron Lett.* **1982**, **23**(46), 4793.
152. S.L. Beaucage i R.P. Iyer, *Tetrahedron* **1993**, **49**(10), 1925.
153. S.L. Beaucage i R.P. Iyer, *Tetrahedron* **1993**, **49**(28), 6123.
154. V.A. Korshun i Y.A. Berlin, *Bioorg. Khim.* **1994**, **20**(6), 565.
155. *Protocols for Oligonucleotides and Analogs. Synthesis and Properties*, pod red. S. Agrawala, (Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, 1993).