

Anna Orłowska

Rozprawa doktorska

**Synteza chemiczna i właściwości
poliamino-2'-deoksyoligonukleotydów
i poliamino-2'-O-metylorybooligonukleotydów**

Przedstawiona

Radzie Naukowej Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
celem uzyskania tytułu doktora nauk chemicznych

Promotor: **Prof. dr hab. Wojciech T. MARKIEWICZ**

Poznań 2004

*Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi,
Profesorowi dr hab. Wojciechowi T. Markiewiczowi,
za wskazanie interesującego i aktualnego tematu rozprawy,
za wnikliwe konsultacje naukowe w trakcie prowadzenia prac eksperymentalnych
oraz za życzliwość i wyrozumiałość okazywaną w ciągu kilkuletniej współpracy*

*Serdecznie dziękuję mojemu **Mężowi, Rodzicom**
za pomoc i okazane wsparcie
oraz moim **Dzieciom** za to, że są*

Spis treści

Wykaz publikacji i komunikatów.....	i
Skróty stosowane w pracy.....	ii
1. CZĘŚĆ LITERATUROWA	1
1.1. SYNTEZA CHEMICZNA 2'-O-METYLORYBONUKLEOZYDÓW	1
1.1.1. Synteza z prekursorów węglowodanowych	2
1.1.2. Bezpośrednie metylowanie rybonukleozydów	6
1.1.3. Metylowanie z udziałem związku metalu uaktywniającego układ cis-diolowy.....	11
1.1.4. Metylowanie 3',5'-O-TIPDSi-blokowanych rybonukleozydów.....	14
1.1.5. Pozostałe metody otrzymywania 2'-O-metylorybonukleozydów	15
1.2. MODYFIKACJE CHEMICZNE KWASÓW NUKLEINOWYCH ZA POMOCĄ POLIAMIN.....	18
1.2.1. Modyfikacje pochodnych adeniny	19
1.2.2. Modyfikacje pochodnych cytozyny.....	23
1.2.3. Modyfikacje pochodnych guaniny.....	26
1.2.4. Modyfikacje pochodnych tyminy.....	30
1.2.5. Modyfikacje pochodnych uracylu	32
1.3. WPLYW MODYFIKACJI POLIAMINOWYCH I GRUPY 2'-O-METYLOWEJ NA TRWAŁOŚĆ KOMPLEKSÓW KWASÓW NUKLEINOWYCH.....	35
1.3.1. Struktury trypleksowe niemodyfikowanych oligonukleotydów.....	35
1.3.1.1. Siły elektrostatyczne	38
1.3.1.2. Oddziaływania warstwowe i hydrofobowe	39
1.3.1.3. Oddziaływania wodorowe Hoogsteena	39
1.3.1.4. Schemat hydratacji	40
1.3.2. Wpływ poliaminooligonukleotydów na trwałość struktur dwu- i trójniciowych.....	40
1.3.3. Wpływ grupy 2'-O-metylowej na trwałość struktur dwu- i trójniciowych	41
2. CEL PRACY	42
3. BADANIA WŁASNE	44
3.1. SYNTEZA 3'-AMIDOFOSFORYNÓW POLIAMINO-2'-O-METYLORYBONUKLEOZYDÓW I POLIAMINO- 2'-DEOKSYRYBONUKLEOZYDÓW	44
3.1.1. Prekursory poliamino-2'-O-metylorybonukleozydów A,C.....	44
3.1.1.1. Synteza prekursora poliamino-2'-O-metyloadenozyny	44
3.1.1.2. Synteza prekursora poliamino-2'-O-metylocytydyny	49
3.1.2. Prekursory poliamino-2'-deoksynukleozydów A,C,G,T	54
3.1.2.1. Synteza prekursora poliamino-2'-deoksyadenozyny.....	54
3.1.2.2. Synteza prekursora poliamino-2'-deoksycytydyny	55
3.1.2.3. Synteza prekursora poliamino-2'-deoksyguanozyny.....	57
3.1.2.4. Synteza prekursora poliaminotymidyny	59
3.1.3. Wprowadzanie reszty poliaminowej do pierścienia zasady heterocyklicznej	62
3.1.4. Reakcje trifluoroacetylowania funkcji aminowych reszt poliaminowych.....	64
3.1.5. Reakcje fosfitylacji	65
3.2. SYNTEZA CHEMICZNA I OCZYSZCZANIE POLIAMINOOOLIGONUKLEOTYDÓW.....	66
3.2.1. Synteza chemiczna i oczyszczanie poliamino-2'-deoksyoligonukleotydów.....	66
3.2.2. Synteza chemiczna i oczyszczanie poliamino-2'-O-metylorybooligo-nukleotydów	69
3.3. WPLYW MODYFIKACJI POLIAMINOWEJ OLIGONUKLEOTYDÓW NA ICH HYDROLIZĘ ENZYMATYCZNĄ	70
3.4. WPLYW ILOŚCI MODYFIKACJI POLIAMINOWYCH NA TRWAŁOŚĆ STRUKTURY DUPEKSOWEJ DNA	72
3.5. ANALIZA TRWAŁOŚCI STRUKTURY TRYPLEKSOWEJ DNA Z WYKORZYSTANIEM OLIGONUKLEOTYDÓW I POLIAMINOOOLIGONUKLEOTYDÓW	79
3.5.1. Dalsze perspektywy badania kompleksu HER2.....	90
4. PODSUMOWANIE.....	91
5. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	95
5.1. ODCZYNNIKI CHEMICZNE	95
5.1.1. Rozpuszczalniki	95
5.1.2. Reagenty.....	96
5.2. APARATURA	97
5.3. TECHNIKI OGÓLNE	98

5.3.1.	Chromatografia cienkowarstwowa – TLC (ang. Thin Layer Chromatography).....	98
5.3.2.	Kolumnowa chromatografia cieczowa.....	99
5.3.3.	Odczynniki do elektroforezy metodą PAGE (ang. Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	99
5.3.4.	Synteza i oczyszczanie oligodeoksynukleotydów.....	100
5.3.5.	Powtarzalne procedury laboratoryjne	101
5.3.6.	N-metylo-N-nitrozomocznik	101
5.3.7.	Roztwór diazometanu w 1,2-dimetoksyetanie (CH ₂ N ₂ / DME)	101
5.3.8.	1,2-bis[(dimetyloamino)metyleno]hydrazyna	102
5.3.9.	Azotyn tert-butyłowy (TBN)	102
5.3.10.	Siarczan (VI) tetrabutylamonu.....	103
5.4.	SYNTEZA POCHODNEJ POLIAMINO-2'-O-METYLOADENOZYNY	103
5.4.1.	9-(β-D-erythro-pentofuranozylo)-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)puryna (132).....	103
5.4.2.	9-[5'-(4,4'-dimetoksytrytylo)-β-D-erythro-pentofuranozylo]-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)puryna (133).....	103
5.4.3.	9-[3',5'-O-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-2'-O-metylo-β-D-erythro-pentofurano-zylo]-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)puryna (138) i 9-[5'-O-(tetraizo-propylodisiloksano-3-ol-1-ylo)-3'-O-metylo-β-D-erythro-pentofuranozylo]-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)puryna (139).....	104
5.4.4.	6-N-benzoiloadenozyna (140a)	105
5.4.5.	6-N-benzoilo-5'-(4,4'-dimetoksytrytylo)adenozyna (140)	106
5.4.6.	6-N-benzoilo-3',5'-O-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-2'-O-metylo-adenozyna (145) i 6-N-benzoilo-5'-O-(tetraizopropylodisiloksano-3-ol-1-ylo)-3'-O-metyloadenozyna (146)	106
5.4.7.	2'-O-metylo-3',5'-O-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)adenozyna (147)	107
5.4.8.	9-(2'-O-metylo-β-D-erythro-pentofuranozylo)-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)puryna (150)	108
5.4.9.	9-[5'-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-2'-O-metylo-β-D-erythro-pentofuranozylo]-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)puryna (134).....	109
5.4.10.	6-N-(4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-O-metyloadenozyna (186)	109
5.4.11.	6-N-[Tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-O-metyloadenozyna (192).....	110
5.5.	SYNTEZA POCHODNEJ POLIAMINO-2'-O-METYLOCYTYDINY	110
5.5.1.	4-N-p-Toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyna (154).....	110
5.5.2.	Metylowanie 4-N-p-Toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydiny	111
5.5.3.	4-N-[(N-trifluoroacetylo)-5-azapentano-1-ylo]-5'-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-O-metylocytydyna (160)	112
5.5.4.	6-N-benzoilocytydyna (160a).....	113
5.5.5.	6-N-benzoilo-5'-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyna (160b)	113
5.5.6.	Metylowanie 6-N-benzoilo-5'-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydiny.....	113
5.5.7.	3',5'-O-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-2'-O-metylocytydyna (161)	113
5.5.8.	4-N-p-Toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-O-metylocytydyna (155)	114
5.5.9.	4-N-(4,9,13-Triazatridekano-1-ylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-O-metylocytydyna (187)	115
5.5.10.	4-N-[Tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-O-metylocytydyna (194).....	116
5.6.	SYNTEZA POCHODNEJ POLIAMINO-2'-DEOKSYADENOZYNY	117
5.6.1.	9-(2'-Deoksy-β-D-erythro-pentofuranozylo)-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)puryna (167)	117
5.6.2.	9-[5-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-2'-deoksy-β-D-erythro-pentofuranozylo]-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)-puryna (87).....	117
5.6.3.	6-N-[Tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyadenozyna (193).....	118
5.7.	SYNTEZA POCHODNEJ POLIAMINO-2'-DEOKSYCYTYDINY	119
5.7.1.	4-N-p-Toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksytydyna (172)	119
5.7.2.	4-N-(4,9,13-Triazatridekano-1-ylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksytydyna (189)	120
5.7.3.	4-N-[Tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksytydyna (195).....	120
5.8.	SYNTEZA POCHODNEJ POLIAMINO-2'-DEOKSYGUANOZYNY	121
5.8.1.	6-O-2-(4-Nitrofenylo)etylo-2'-deoksyguanozyna (176).....	121
5.8.2.	6-O-2-(4-Nitrofenylo)etylo-3',5'-O-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-2'-deoksyguanozyna (177).....	122
5.8.3.	2-Fluoro-6-O-2-(4-nitrofenylo)etylo-2'-deoksyinozyna (179).....	122
5.8.4.	2-Fluoro-6-O-2-(4-nitrofenylo)etylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyinozyna (180).....	123
5.8.5.	2-N-[Tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-6-O-2-(4-nitrofenylo)etylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyguanozyna (198).....	123

5.9.	SYNTEZA POCHODNEJ POLIAMINOTYMIDYNY	124
5.9.1.	3',5'-Di-O-acetylotymidyna (182)	124
5.9.2.	5-Formylo-3',5'-di-O-acetylo-2'-deoksyurydyna (109).....	125
5.9.3.	Próby utleniania 3',5'-di-O-acetylotymidyny	126
5.9.4.	Utlennianie 5-hydroksymetylo-3',5'-di-O-acetylo-2'-deoksyurydyny (185).....	126
5.9.5.	5-Formylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydyna (184)	127
5.9.6.	5-(2,6,11,15-Tetraazapentadekano-1-ylo)-2'-deoksyurydyna (119).....	127
5.9.7.	5-[Tetrakis(N,N',N'',N'''-trifluoroacetylo)-2,6,11,15-tetraazapentadekano-1-ylo]- 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydyna (196).....	128
5.10.	SYNTEZA 3'-AMIDOFOSFORYNÓW POLIAMINO-2'-O-METYLONUKLEOZYDÓW I POLIAMINO- 2'-DEOKSYNUKLEOZYDÓW.....	129
5.10.1.	3'-Amidofosforyn 6-N-[tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]- 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-O-metyloadenozyny (199).....	129
5.10.2.	3'-Amidofosforyn 4-N-[tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]- 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-O-metylocytydyny (200).....	129
5.10.3.	3'-Amidofosforyn 6-N-[tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]- 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyadenozyny (201).....	130
5.10.4.	3'-Amidofosforyn 4-N-[tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]- 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksytydyny (101).....	130
5.10.5.	3'-Amidofosforyny 2-N-[tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]- 6-O-2-(4-nitrofenylo)etylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyguanozyny (103).....	130
5.10.6.	3'-Amidofosforyn 5-[tetrakis(N,N',N'',N'''-trifluoroacetylo)-2,6,11,15-tetraazapentadekano- 1-ylo]-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydyny (202).....	131
5.11.	SYNTEZA I OCZYSZCZANIE POLIAMOOLIGONUKLEOTYDÓW	131
5.12.	HYDROLIZA ENZYMATYCZNA POLIAMOOLIGONUKLEOTYDÓW	132
5.13.	POMIAR TEMPERATUR TOPNIENIA STRUKTUR DUPEKSOwych	132
5.14.	POMIAR TEMPERATUR TOPNIENIA STRUKTUR TRYPLEKSOwych	134
6.	LITERATURA.....	135

PUBLIKACJE I KOMUNIKATY

Niniejsza praca obejmuje wyniki uzyskane przez autorkę w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu w latach 1999 – 2004.

Prezentowane w tejże rozprawie wyniki zostały częściowo zawarte w następujących publikacjach i komunikatach.

Publikacje:

- A. Szmanda, M. Markiewicz, P. Godzina and W. T. Markiewicz; Polyaminoooligonucleotides and their combinatorial libraries – *Collection Symposium Series*, 5, **2002**; Chemistry of Nucleic Acid Components XIIth Symposium, Spindleruv Mlyn, Czech Republic, September 3-8, 2002.
- A. Orłowska, M. Markiewicz, W. T. Markiewicz; Synthesis of poliamino-2'-O-methylribooligonucleotides; *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, przygotowano do druku.

Komunikaty konferencyjne:

- P. Godzina, A. Szmanda, M. Markiewicz, W. T. Markiewicz; Studies in polyaminoooligonucleotides; Polish – American Conference: Phisico-Chemical Methods in Biotechnology and Material Science ; Poznań, June 5-7, **2000**.
- A. Szmanda, M. Markiewicz, W. T. Markiewicz; Synteza i analiza poliaminoooligonukleotydów i ich bibliotek kombinatorycznych; Doroczny XLV zjazd PTChem, Kraków, **2002**.

SKRÓTY STOSOWANE W PRACY

Ac – acetyl

Am^{SP} – pochodna 2'-O-metyloadenozyny z przyłączoną resztą sperminy w pozycji N-6

ap – orientacja przeciwna

API – 3-aminopropylimidazol

APS – nadsiarczan amonu

Ar – aryl

BB – błękit bromofenolowy

BEMP – 2-tert-butyloimino-2-dietylamino-1,3-dimetyloperhydro-1,3,2-diazafosforin

BIAcore – analiza biospecyficznego oddziaływania (ang. *Biospecific Interaction Analysis*)

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

Bn – benzyl

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

Bz – benzoil

Cm^{SP} – pochodna 2'-O-metylocytozyny z przyłączoną resztą sperminy w pozycji N-4

CPG – szkło o kontrolowanej porowatości

DABCO – 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan

dA^{SP} – pochodna 2'-deoksyadenozyny z przyłączoną resztą sperminy w pozycji N-6

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

dC^{SP} – pochodna 2'-deoksycytozyny z przyłączoną resztą sperminy w pozycji N-4

DEAD – azodikarboksylan dietylu

dG^{SP} – pochodna 2'-deoksyguanozyny z przyłączoną resztą sperminy w pozycji N-2

DME – 1,2-dimetoksyetan

DMF – N,N'-dimetyloformamid

DMPA – 4-dimetyloaminopirydyna

DMSO – sulfotlenek dimetylu

DMT – 4,4'-dimetoksytrytyl

DMTCl – chlorek 4,4'-dimetoksytrytylu

EDTA – sól dwusodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego

ES – elektrorozpraszanie (ang. *Electrospray*)

Et – etyl

FAB – bombardowanie szybkimi atomami (ang. *Fast Atom Bombardment*)

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

HMDS – heksametylodisilazan

HMPA – heksametyloamidofosforin

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

iBu – izobutyryl

i-Pr – izopropyl

MALDI – jonizacja przez desorpcję laserową w matrycy (ang. *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*)

Me – metyl

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

NPE – 2-(4-nitrofenylo)etyl

NPEOC – 2-(4-nitrofenylo)etoksykarbonyl

O.D. – jednostka optyczna (ang. *optical density*)

p – orientacja zgodna

PAGE – elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (ang. *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

PDE – fosfodiesteraza

Ph – fenyl

PIPES – 1,4-piperazynobis(etanosulfonian) sodu

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

Pu – puryna

Put – putrescyna

PVPHF – polifluorowodorek poliwinylpirydyny

Py – pirymidyna

R_f – współczynnik retencji

RP-HPLC – wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa w fazie odwróconej (ang. *Reverse Phase - High Pressure Liquid Chromatography*)

RU – jednostka rezonansu (ang. *resonance units*)
SOCL – syntetyczna kombinatoryczna biblioteka oligonukleotydomowa (ang. *Synthetic Oligonucleotide Combinatorial Library*)
Spd – spermidyna
Spm – spermina
SPR - zjawisko optycznego rezonansu powierzchniowego plazmowego (ang. *optical phenomenon of surface plasmon resonance*)
TBAF – fluorek tetrabutylamoniowy
TBDMS – *tert*-butylodimetylosilil
TBDPS – *tert*-butylodifenylosilil
TBE – bufor do elektroforezy zawierający TRIS, kwas borny i EDTA
TBN – azotyn *tert*-butylu
t-BuBzCl – chlorek *tert*-butylbenzoilowy
TEA – trietyloamina
TFA – trifluoroacetyl
THF – tetrahydrofuran
TIPDSi – grupa 1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksano-1,3-diolowa
TIPDSiCl₂ – 1,3-dichloro-1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksan
TLC – chromatografia cienkowarstwowa (ang. *Thin Layer Chromatography*)
T_m – temperatura topnienia kompleksu DNA (ang. *Melting Temperature*)
TMEDA – *N,N,N',N'*-tetrametyloetylenodiamina
TMS – trimetylosilil
TMSCl – chlorek trimetylosililu
Tr – trytyl
TRIS – tris(hydroksymetylo)aminometan
T^{SP} – pochodna tymidyny z przyłączoną resztą sperminy w pozycji C-5
U – jednostka (ang. *unit*)
XC – błękit ksilenocyjanolowy
δ – przesunięcie chemiczne

1. CZĘŚĆ LITERATUROWA

1.1. Synteza chemiczna 2'-O-metylorybonukleozydów

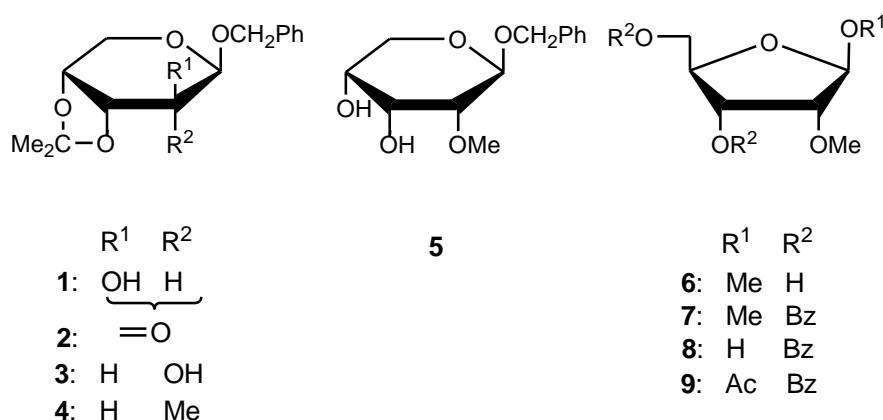
Chemiczna synteza fragmentów kwasów nukleinowych i ich analogów zajmuje bardzo ważną pozycję pośród metod wykorzystywanych przez biologię molekularną, ale ma także duże znaczenie praktyczne m.in. w diagnostyce medycznej i nowoczesnych metodach terapii takich, jak terapia antysensowa [1–3] czy terapia antygenowa [4–6].

Modyfikowane oligonukleotydy występują w naturalnych kwasach nukleinowych i spełniają w nich ważne funkcje biologiczne. Występują zarówno w DNA jak i w RNA przy czym największą ich liczbę znaleziono w tRNA [7]. W DNA modyfikacje ograniczają się najczęściej do występowania metylowanych zasad (przede wszystkim cytozyny i adeniny), ale takie wyliczenie modyfikacji jest bardzo pobieżne. Z kolei w RNA, innych niż tRNA, bardzo częstą modyfikacją jest metylowanie grupy 2'-hydroksylowej, a więc występowanie jednostek 2'-O-metylorybonukleozydowych. Nie dziwi, zatem że 2'-O-metylo-oligorybonukleotydy były wśród pierwszych syntetycznych fragmentów kwasów nukleinowych, tym bardziej, że zablokowanie funkcji 2'-OH poprzez metylowanie powoduje, że wiązanie internukleotydo- we w tych 2'-O-metylo-RNA jest równie trwałe chemicznie jak w DNA.

2'-O-Metylorybooligonukleotydy znajdują zastosowanie w badaniach składania mRNA [8], „spliceosomów” [9] oraz w przygotowaniu odpornych na nukleazy rybozymów typu „głowy młotka” [10]. 2'-O-Metylorybooligonukleotydy i inne 2'-O-alkilorybooligonukleotydy badane są również pod kątem potencjalnego wykorzystania w terapii antysensowej i antygenowej.

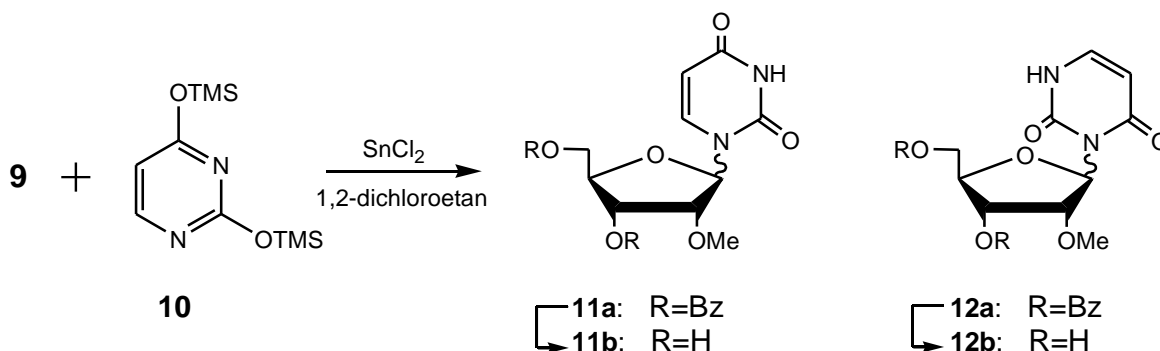
1.1.1. Synteza z prekursorów węglowodanowych

Otrzymywanie pochodnych 2'-*O*-metylonukleozydowych z prekursorów węglowodanowych było zapoczątkowane przez Hainesa [11] i Imbacha [12]. Haines wykorzystał drogę syntetyczną wcześniej opracowaną w jego laboratorium dla serii L-izomerów [13]. Wychodząc z 1-*O*-benzylo-3,4-*O*-izopropylideno- β -D-arabinopiranozy (**1**) (rys. 1) [11] przez produkty **2**, **3** i **4** otrzymał 1-*O*-benzylo-2-*O*-metylo- β -D-rybopiranozę (**5**). Reakcję metylowania **4** jodometanem prowadzono w obecności wodoru sodu. Reakcja hydrogenolizy dla L-izomeru produktu **5** w metanolu przebiegała równie dobrze, jak dla niemodyfikowanego cukru, dając 1,2-di-*O*-metylo-L-rybofuranozę. Po hydrogenolizie glikozydu **5** w metanolu, mieszanina reakcyjna została dodatkowo poddana działaniu kwasowej żywicy jonowymiennej dając formę furanozową (**6**) z wydajnością 60%. Tworzenie się glikozydu zostało przypisane kwasowej katalizie. Czystość otrzymanej pochodnej **6** była wystarczająca do następnych etapów syntezy. Reakcja benzoilowania glikozydu **6** dostarczyła pochodną dibenzoesanową (**7**). Związek **7** został poddany hydrolizie mieszaniną kwasu trifluorooctowego i wody dając 3,5-di-*O*-benzoilo-2-*O*-metylo-D-rybofuranozę (**8**). Acetylowanie związku **8** prowadziło do otrzymania prekursora węglowodanowego 2'-*O*-metylorybonukleozydów, czyli 1-*O*-acetylo-3,5-di-*O*-benzoilo-2-*O*-metylo-D-rybofuranozy (**9**). Widmo protonowe magnetycznego rezonansu jądrowego ($^1\text{H NMR}$) potwierdziło obecność tylko β -D-anomeru.



Rys. 1. Substrat i poszczególne produkty syntezy prekursora węglowodanowego 2'-*O*-metylonukleozydu zaproponowanego przez Hainesa

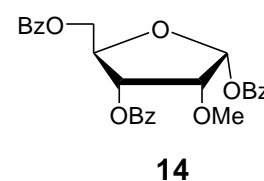
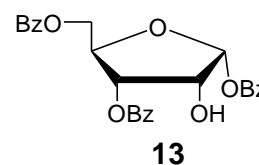
Otrzymany prekursor (**9**) został poddany reakcji z 2,4-bis(trimetylosililo)uracylem (**10**) w 1,2-dichloroetanie w obecności SnCl_4 (schemat 1). W wyniku powyższej reakcji powstały dwa główne produkty, dibenzoilowa pochodna 2'-*O*-metylourydyny (**11a**) i 2'-*O*-metyloizourydyny (**12a**) w stosunku 1,3 do 1. Po zdjęciu blokady z funkcji 3'- i 5'-hydroksylowych otrzymano 2'-*O*-metylourydynę (**11b**) i 2'-*O*-metyloizourydynę (**12b**).



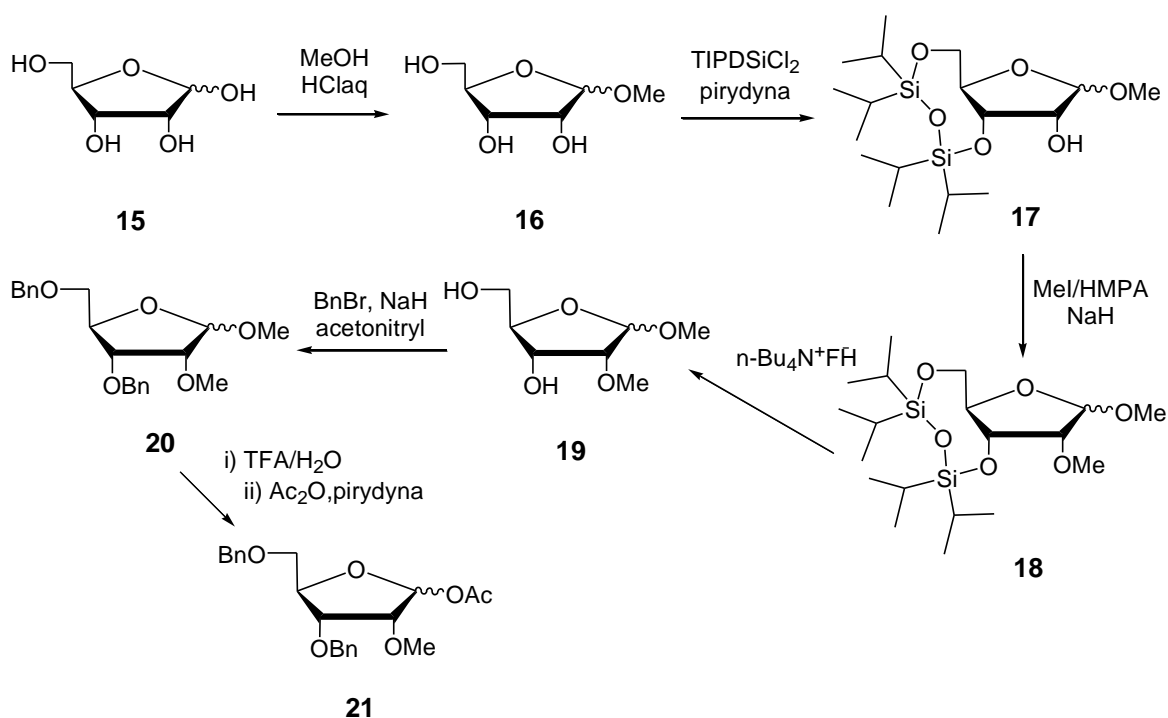
Schemat 1. Synteza 2'-*O*-metylourydyny z prekursora węglowodanowego

Imbach i współpracownicy [12] zaproponowali syntezę 2'-*O*-metylorybonukleozydów wychodząc z 1,3,5-tri-*O*-benzoilo- α -D-rybofuranozy (**13**) [14, 15]. Związek **13** poddano reakcji z diazometanem w obecności katalizatora BF_3 otrzymując 1,3,5-tri-*O*-benzoilo-2'-*O*-metylo- α -D-rybofuranozę (**14**) z wydajnością ok. 75%. Zastosowany BF_3 zapobiega migracji grupy benzoilowej, a tym samym unika się powstawania izomeru 3-*O*-metylowego. Przygotowany prekursor **14** został poddany reakcji glikozylacji z silylowanymi pochodnymi pirymidynowymi: uracylu i 4-*N*-benzoilocytozyny. Wydajność pożądanego β -izomeru była najwyższa, gdy reakcję prowadzono w obecności dwóch ekwiwalentów SnCl_4 w 1,2-dichloroetanie w temperaturze wrzenia.

Późniejsze ulepszenia metody zaproponowanej przez Imbacha pociągnęły za sobą optymalizację syntezy na dużą skalę prekursora 2'-*O*-metylorybofuranozowego [16]. Ze względu na niebezpieczeństwo związane z pracą z diazometanem autorzy zastanawiali się nad zmianą czynnika metylującego. Początkowo w reakcji metylowania **13** wykorzystali trifluorometanosulfonian metylu w obecności 2,6-di-*tert*-bytylopirydyny [17], otrzymali **14** z niską wydajnością, a zarazem z dużymi kosztami.



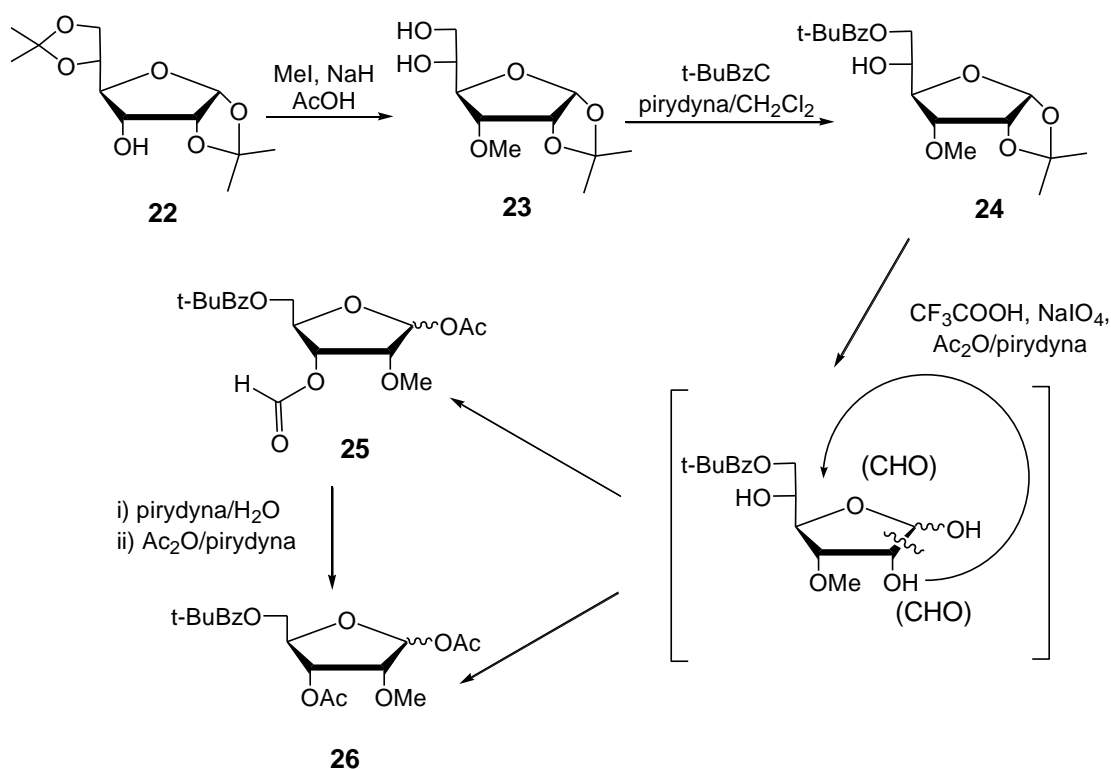
Trimetylosililodiazometan (TMSCHN_2) [18] okazał się również nieekonomiczny na dużą skalę. Ostatecznie pozostali przy diazometanie. W celu wyeliminowania zbyt dużego efektu egzotermicznego, mogącego wywołać eksplozję, autorzy zaprojektowali mechaniczne urządzenie dostarczające roztwór diazometanu pod zmniejszonym ciśnieniem argonu. Proces był kontrolowany automatycznie. Przez powolne i ciągłe podawanie roztworu diazometanu oraz kontrolowanej temperaturze udało się zmniejszyć o połowę ilość dodawanego diazometanu uzyskując podobne wydajności reakcji. Powyższą metodą autorzy otrzymali kilkaset gramów kluczowego substratu **14** do reakcji glikozytacji. Równie istotne było dobranie łagodnych warunków reakcji glikozytacji. Postępując zgodnie z opisem Vorbrüggena [19] zamiast SnCl_4 wykorzystano trimetylosililotrifluorometanosulfonian ($(\text{CH}_3)_3\text{SiOSO}_2\text{CF}_3$) w acetonitrylu. Reakcje prowadzone w temperaturze pokojowej przebiegały wydajnie dla wszystkich badanych zasad pirymidynowych w czasie od 15 do 60 minut.



Schemat 2. Synteza prekursora węglowodanowego 2'-*O*-metylonukleozydów wychodząca z D-rybozy.

Interesująca wydaje się też metoda otrzymywania prekursora węglowodanowego 2'-*O*-metylonukleozydów wykorzystująca jako substrat D-rybozę (**15**) (schemat 2) [20]. Po wydajnym otrzymaniu 1-*O*-metylorybozy (**16**), produkt funkcjonalizowano grupą 1,1,3,3-

tetraizopropylodisiloksano-1,3-dyłową (TIPDSi) [21] otrzymując **17** z wydajnością 27%. Przygotowany reagent poddano reakcji metylowania jodometanem i HMPA w stosunku 9:1 w obecności NaH. Otrzymano produkt **18** po oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej z wydajnością 33%. Następnie zdjęto blokadę TIPDSi otrzymując **19** i benzylowano funkcje 3- i 5-hydroksylowe. Związek **20** poddano hydrolizie, a później acetylowaniu funkcji 1-hydroksylowej. Tak otrzymana 1-*O*-acetylo-3,5-di-*O*-benzylo-2-*O*-metylorybofuranaza **21** została poddana reakcji glikozylacji metodą Vorbrüggena [19]. Etapami decydującymi o wydajności syntezy prekursora okazały się: wprowadzanie grupy TIPDSi oraz metylowanie.



Schemat 3. Synteza prekursora węglowodanowego 2'-*O*-metylonukleozydów wychodząca z pochodnej D-allozy.

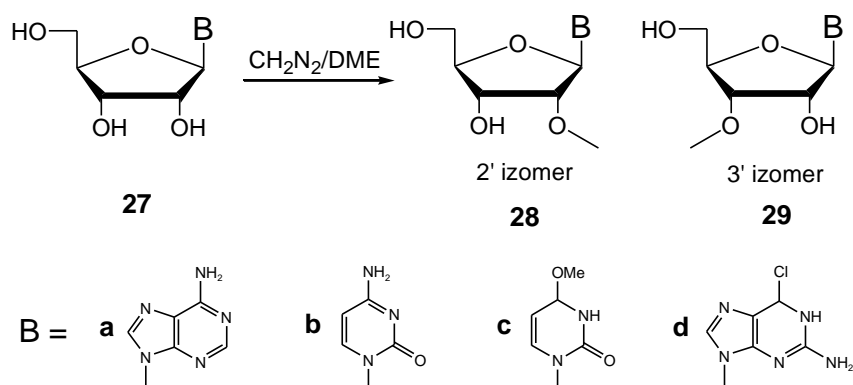
Usman i współpracownicy [22] do syntezy prekursora węglowodanowego wykorzystali pochodną D-allozy **22** (schemat 3). Analiza retrosyntetyczna pokazała, iż 3-*O*-alkilowa pochodna 1,2:5,6-di-*O*-izopropylideno- α -D-allofuranozy **24** może być przekształcona w 2-*O*-alkilorybofuranozę **26** [23]. Powyższa transformacja jest wynikiem selektywnej degradacji wiązania między atomami węgla C-1 i C-2. Powstała grupa formylowa na atomie węgla C-2 tworzy hemiacetal z funkcją hydroksylową przy atomie węgla C-5. Handlowo dostępną 1,2:5,6-di-*O*-izopropylideno- α -D-allofuranozę (**22**) metylowano jodometanem w obecności wodoru sodu. Następnie selektywnie odblokowano

funkcje 5- i 6-hydroksylowe 80%-owym kwasem octowym. Funkcję 6-hydroksylową układu diolowego **23** acylowano regioselektywnie chlorkiem tert-butylobenzoilowym (*t*-BuBzCl) w temperaturze $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Usunięcie blokady izopropylidenowej z pozycji 1, 2 **24**, utlenianie NaIO_4 i acetylowanie prowadzi do mieszaniny produktów **25** i **26**. Ostrożne traktowanie 3-*O*-formylowej pochodnej **25** katalityczną ilością metanolanu sodu (NaOMe) w metanolu i późniejsze acetylowanie prowadzi do otrzymania wyłącznie **26**. Otrzymany związek **26** został wykorzystany do reakcji glikozylacji z silylowanymi pochodnymi uracylu i odpowiednio funkcjonalizowanej cytozyny, adeniny i guaniny. 2'-*O*-Metyloribonukleotydy otrzymano z wydajnością 55-70%.

Przedstawione podejścia syntezy 2'-*O*-metyloribonukleotydów z prekursorów węglowodanowych wymagają wieloetapowej syntezy 2-*O*-metylowej pochodnej cukrowej przed reakcją glikozylacji. Reakcja glikozylacji jest etapem krytycznym, prowadzi do mieszaniny α i β anomerów i jest szczególnie problematyczna dla nukleozydów purynowych.

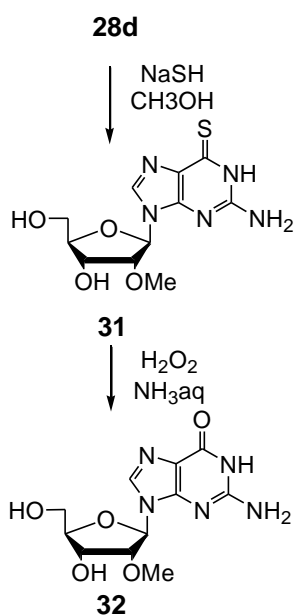
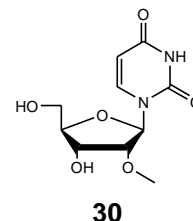
1.1.2. Bezpośrednie metylowanie rybonukleozydów

W 1965 roku Broom i Robins spostrzegli, że roztwór diazometanu w 1,2-dimetoksyetanie (DME) umożliwia metylowanie układu *cis*-diolowego adenozy [24]. Doprowadziło to do opracowania pierwszych praktycznych syntez 2'-*O*-metyloadenozy [24, 25], 2'-*O*-metylocytydyny [26], 2'-*O*-metylourydyny [26] i 2'-*O*-guanozy [27]. Głównymi produktami metylowania były 2' i 3'-*O*-metylowe pochodne nukleozydów **28** i **29** (schemat 4).



Schemat 4. Reakcja metylowania nieblokowanych pochodnych rybonukleozydowych roztworem diazometanu w 1,2-dimetoksyetanie.

2'-*O*-metyloadenozynę (**28a**) i 2'-*O*-metylocytydynę (**28b**) zsyntetyzowano wychodząc z macierzystych rybonukleozydów **27a** i **27b**. 2'-*O*-metylourydynę (**30**) otrzymano przez deaminację 2'-*O*-metylocytydyny (**28b**). Deaminację prowadzono azotanem (III) potasu w kwasie octowym. Alternatywnym reagentem do syntezy 2'-*O*-metylocytydyny i 2'-*O*-metylourydyny był 4-metoksy-1-(β -D-rybofuranozyl)pirymidyn-2(1*H*)-on (**27c**). Grupa metoksylova związku **28c** została następnie przekształcona w grupę aminową lub karbonylową dając odpowiednio **28b** i **30** [28]. Natomiast w przypadku 2'-*O*-metyloguanozyny (**32**), reakcji metylowania poddano 2-amino-6-chloro-9- β -D-rybofuranozylpurynę (**27d**) (schemat 4). Otrzymana pochodna 2'-*O*-metylo-2-amino-



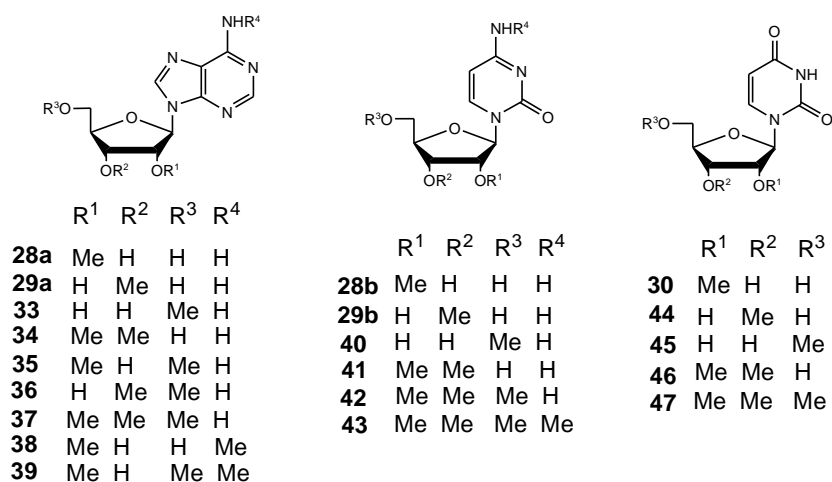
Schemat 5. Synteza 2'-*O*-metyloguanozyny

6-chloro-9- β -D-rybofuranozylpuryna (**28d**) uległa transformacji do pochodnej tiolowej **31** pod wpływem wodorosiarczku sodu w metanolu. Przez utlenienie **31** H_2O_2 w wodnym roztworze amoniaku otrzymano 2'-*O*-metyloguanozynę (schemat 5). Powyższe reakcje metylowania były prowadzone w roztworach wodnych odpowiednich nukleozydów, do których dodawano diazometan w DME. Powstała mieszanina izomerów wymagała oczyszczenia na jonowymiennej kolumnie chromatograficznej (Dowex OH^-).

Zastosowanie warunków reakcji metylowania zaproponowanych przez Brooma i Robinsa [24] nie wymagało funkcjonalizowania zasady heterocyklicznej, ani funkcji 5' hydroksylowej. Próbę analizy tej reakcji podjęli Gin i Dekker na przykładzie adenozyny [25]. Za

wartość $\text{pK}_a=12,5$ adenozyny odpowiada układ 2',3'-*cis*-diolowy. Ze względu na stosunkowo wysoką i porównywalną kwasowość obie grupy reagują z diazometanem w opisanych warunkach. W wyniku działania efektu indukcyjnego aglikonu na funkcję 2'-hydroksylową, funkcja ta ma charakter bardziej kwasowy niż funkcja 3'-hydroksylowa. Raczej wyższa wydajność pochodnej 2'-*O*-metyloadenozyny (**28a**) (38%) niż 3'-*O*-metyloadenozyny (**29a**) (11%) (3:1) potwierdza, że funkcja 2'-hydroksylowa jest bardziej kwasowa i ma największy wpływ na wartość stałej pK_a . Niska wydajność 5'-*O*-metyloadenozyny (**33**) (1,5%) wskazuje, że funkcja 5'-hydroksylowa jest zdecydowanie słabszym kwasem niż funkcje 2'- i 3'-

hydroksylowe. Biorąc pod uwagę molowy stosunek wody i adenozyiny (600:1) w reakcji z diazometanem i wydajność otrzymanej 5'-*O*-metyloadenozyiny można stwierdzić, że funkcja 5'-hydroksylowa ma charakter bardziej kwasowy niż cząsteczka wody. Pozostająca po metylowaniu 2'- lub 3'-OH drugorzędowa funkcja hydroksylowa jest mocniejszym kwasem niż pierwszorzędowa funkcja 5'-hydroksylowa. Jest to zgodne z zaobserwowanymi wydajnościami: 3,5% dla 2',3'-di-*O*-metyloadenozyiny (**34**) i 1,5% dla 5'-*O*-metyloadenozyiny (**33**).



Rys. 2. Produkty metylowania cytydyny i adenozyiny

Shugar i współpracownicy opisali alkilowanie cytydyny [29] i adenozyiny [30] przy zastosowaniu dimetylosiarczanu lub dietylosiarczanu. W wyniku tej reakcji powstały wszystkie możliwe produkty alkilowania (rys. 2) (tabela 1). Otrzymano m. in. następujące produkty: 2'-*O*-metylo (**28a**, **28b**, **30**), 3'-*O*-metylo (**29a**, **29b**, **44**), 5'-*O*-metylo (**33**, **40**, **45**), 2',3'-di-*O*-metylo (**34**, **41**, **46**) oraz 2',3',5'-tri-*O*-metylo (**37**, **42**, **47**) pochodne nukleozydowe. Następowo również metylowanie atomów azotu N-4 cytydyny i N-6 adenozyiny. W przypadku metylowania cytydyny głównym produktem była 2',3',5'-tri-*O*-metylocytydyna (**42**) (wyd.: 80%). Powstała także 2',3',5'-tri-*O*-metylo-6-*N*-metylocytydyna (**43**) (wyd.: 15%) i jako wynik deaminacji w silnie zasadowym środowisku - 2',3',5'-tri-*O*-metylourydyna (**47**) (wyd.: 5%). Wśród produktów metylowania adenozyiny nie można wyszczególnić głównego produktu.

Yamauchi i współpracownicy prowadzili reakcje metylowania z wykorzystaniem następujących czynników metylujących: trimetylofosforanu [31,32], wodorotlenku fenylotrimetyloamoniowego [33] i wodorotlenku trimetylosulfoniowego [34].

Tabela 1. Produkty metylowania dimetylosiarczanem cytydyny i adenozyzny.

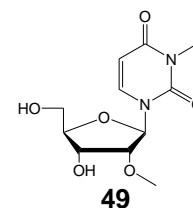
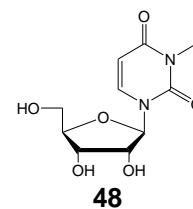
Produkty metylowania cytydyny		Produkty metylowania adenozyzny	
28b	2'- <i>O</i> -metylocytydyna	28a	2'- <i>O</i> -metyloadenozyzna
29b	3'- <i>O</i> -metylocytydyna	29a	3'- <i>O</i> -metyloadenozyzna
40	5'- <i>O</i> -metylocytydyna	33	5'- <i>O</i> -metyloadenozyzna
41	2',3'-di- <i>O</i> -metylocytydyna	34	2',3'-di- <i>O</i> -metyloadenozyzna
42	2',3',5'-tri- <i>O</i> -metylocytydyna	35	2',5'-di- <i>O</i> -metyloadenozyzna
43	2',3',5'-tri- <i>O</i> -metylo-4- <i>N</i> -metylocytydyna *	36	3',5'-di- <i>O</i> -metyloadenozyzna
30	2'- <i>O</i> -metylourydyna	37	2',3',5'-tri- <i>O</i> -metyloadenozyzna
44	3'- <i>O</i> -metylourydyna	38	2'-metylo-6- <i>N</i> -metyloadenozyzna
45	5'- <i>O</i> -metylourydyna	39	2',5'-di- <i>O</i> -metylo-6- <i>N</i> -metyloadenozyzna
46	2',3'-di- <i>O</i> -metylourydyna		
47	2',3',5'-tri- <i>O</i> -metylourydyna		

* - Nie umieszczono w tabeli pozostałych *N*-metylowanych pochodnych cytydyny.

Reakcja trimetylofosforanu była prowadzona z adenozyzną (A), cytozyną (C), guanozyzną (G) i urydyną (U) w środowisku wodnym w przedziale pH 7-12,5 [31]. Nukleozydy dały wiele produktów metylowania. Reaktywność poszczególnych grup funkcyjnych przedstawia się następująco; w pH 7: C (N-3) >> G (N-7) > A (N-1) > U (N-3), w pH 8,5-10: U (N-3) > G (N-1 > N-7 > O-6) > A [N-1 > 2'(3')-OH] > C (N-3), a w pH > 11 reakcje metylowania ulegały również funkcje hydroksylowe rybozy dając 2'-*O*- i 3'-*O*-metylorybonukleozydy. Środowisko zasadowe o pH=12,5 było optymalne do otrzymywania pochodnych 2'-*O*-metylowych. Otrzymano 2'-*O*-metylo- i 3'-*O*-metyloadenozyne (**28a**, **29a**) z wydajnościami odpowiednio 22% i 6% oraz mieszaninę izomerów 2'- i 3'-*O*-metylocytydyny (**28b**, **29b**) w proporcji 4:1 (wyd.: 28%).

Metylowanie cytydyny i adenozyzny wodorotlenkiem fenylotrimetyloamoniowym w DMF [33] prowadziło głównie do monometylowania układu 2',3'-*cis*-diolowego. Autorzy otrzymali mieszaninę pochodnych 2'- i 3'-*O*-metylowych w proporcji od 3:1 do 10:1. Nie zaobserwowali efektywnego metylowania funkcji egzoaminowej cytydyny. Tworzenie się 6-*N*-metyloadenozyzny tłumaczą przegrupowaniem Dimrotha 1-*N*-metyloadenozyzny. W przypadku urydyny i guanozyzny transformacja przebiegała w kierunku *N*-metylowych pochodnych nukleozydowych. Przy dużym nadmiarze czynnika metylującego otrzymano również pochodne metylowane w reszcie cukrowej.

Cytydyna i urydyna zostały poddane reakcji z wodorotlenkiem trimetylosulfoniowym w DMF [34]. Produktami metylowania urydyny były pochodne 3-*N*-metylowe i 3-*N*,2'-*O*-dimetylowe (**48**, **49**). W



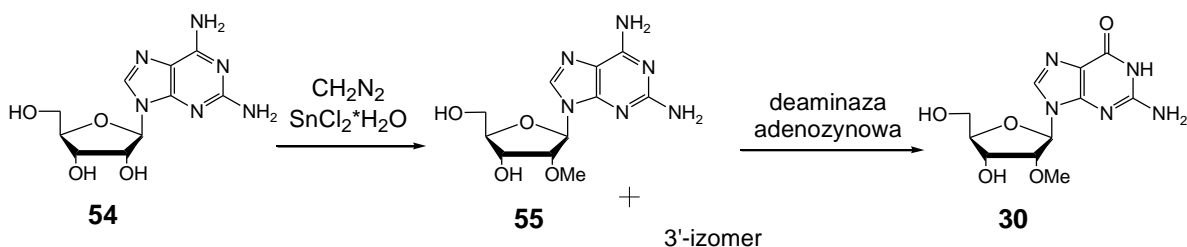
Reakcja 5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-4-*N*-*tert*-butylobenzoilocytydyny (**50**) lub 5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-4-*N*-benzoilocytydyny (**51**) z jodometanem w obecności tlenku srebra ze śladową ilością pirydyny prowadziła do otrzymania 2'-*O*-metylowanych produktów **52** i **53** z wydajnością 65-95% [38]. W temperaturze 0 °C metylowaniu ulega selektywnie grupa 2'-hydroksylowa. Mniej niż 10% stanowiły pochodne 2',3'-*O*-dimetylowe i 3'-*O*-metylowe. Z pochodnej 2'-*O*-metyloocytydyny przez deaminację wodorotlenkiem litu otrzymano 2'-*O*-metylourydynę (**30**) (schemat 6).

Wyżej opisana metoda wymaga praco- i czasochłonnego oczyszczania chromatograficznego izomerów 2'- i 3'-*O*-metylowanych.

1.1.3. Metylowanie z udziałem związku metalu uaktywniającego układ *cis*-diolowy

Robins i współpracownicy zauważyli, że $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ katalizuje reakcję monometylowania układu *cis*-diolowego przez diazometan [39]. Ze związkami nie posiadającymi kwasowych protonów w obrębie zasady heterocyklicznej, takimi jak adenozyne i cytydina, następuje szybko ilościowe monometylowanie. Purynowe nukleozydy dają mieszaninę izomerów 2'-*O*-metylowych i 3'-*O*-metylowych z przewagą 3'-*O*-metylorybonukleozydu. Nukleozydy pirymidynowe dają mieszaninę, w której znacząco przeważa izomer 2'-*O*-metylowy. Nieblokowane nukleozydy posiadające proton kwasowy w obrębie zasady heterocyklicznej mogą być monometylowane w reszcie cukrowej przy zwiększonym stężeniu katalizatora i przy stopniowym dodawaniu rozcieńczonego roztworu diazometanu.

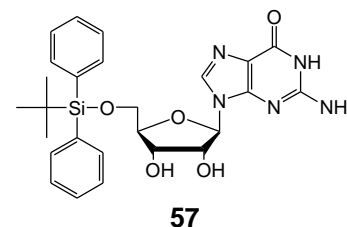
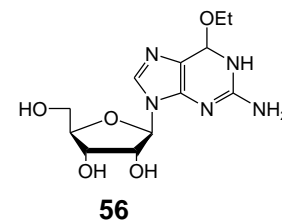
Metylowanie przy użyciu roztworu diazometanu w DME w obecności katalizatora, takiego jak $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ jest bardzo popularną metodą syntezy wszystkich czterech 2'-*O*-metylorybonukleozydów [39, 40]. Procedury te prowadzą w łagodnych warunkach reakcji do otrzymania mieszaniny izomerów 2'- i 3'-metylowych. Otrzymano pochodne 2'-*O*-metylowe z wydajnościami: 38% dla adenozyny, 74% i 67% dla cytydyny i 58% dla urydyny.



Schemat 7. Synteza 2'-*O*-metyloguanozyny z rybonukleozydu 2,6-diaminopurynowego

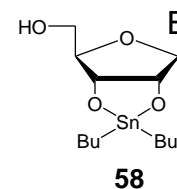
Metylowanie guanozyny wspomnianą metodą prowadzi do 2'-*O*-metyloguanozyny tylko z wydajnością 15%. Lepsze okazało się wykorzystanie jako substratu pośredniego w reakcji metylowania pochodnej 2,6-diaminopurynowej **54**. 2'-*O*-Metyloguanozynę (**32**) otrzymano w wyniku reakcji enzymatycznej deaminacji **55** z deaminazą adenozynową [41]. Wspomniany enzym powoduje selektywną transformację funkcji 6-aminowej do karbonylowej (schemat 7). Całkowita wydajność syntezy wynosiła 40%.

W celu otrzymania **32** wykorzystano również 6-*O*-etyloguanozynę (**56**) [42] i 5'-*O*-*t*-butylo-difenylosililoguanozynę (5'-*O*-TBDPSi-guanozynę) (**57**) [43] w reakcji metylowania diazometanem w obecności $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Całkowita wydajność, począwszy od funkcjonalizowania atomu tlenu O-6 guanozyny resztą etylową przez metylowanie **56** i hydrolizę na atomie tlenu O-6, wynosiła 7%. Podczas metylowania **57** otrzymano izomer 2'-*O*-metylowy z wydajnością 20%, natomiast całkowita wydajność syntezy wynosiła 13%.



Zastosowanie powyższej metody do metylowania pochodnych 5'-*O*-trytylowych rybonukleozydowych z benzoilowaną lub *t*-butylobenzoilowaną funkcją egzoaminową [44] oraz 5'-*O*-monometoksytrytylowych lub 5'-*O*-dimetoksytrytylowych z 2-(4-nitrofenylo)etylokarbonylowaną funkcją egzoaminową i w przypadku guanozyny 6-*O*-2-(4-nitrofenylo)etylowanych rybonukleozydów [45], prowadzi do uprzywilejowanego metylowania atomu tlenu O-2'. Jest to szczególnie korzystne w przypadku nukleozydów purynowych, w których przeważają 3'-*O*-metylowane izomery przy metylowaniu niefunkcjonalizowanych nukleozydów. Zaobserwowano również znaczny wzrost całkowitej wydajności reakcji.

W związku z dużą toksycznością diazometanu były prowadzone badania nad zastosowaniem innego reagenta o podobnych właściwościach metylujących. W wyniku tych prac diazometan został zastąpiony przez trimetylosililodiazometan (TMSiCHN_2) do reakcji metylowania guanozyny z blokadą na zasadzie heterocyklicznej [46].



B- reszta zasady pirymidynowej
lub purynowej

Rys. 3. Pochodna bibutylocynowa rybonukleozydu

W reakcji rybonukleozydów z tlenkiem dibutylocyny (IV) Bu_2SnO [47] otrzymano pochodną dibutylocynową (**58**) (rys. 3). Wprowadzona modyfikacja uaktywnia funkcje 2'- i 3'-hydroksylowe podczas acetylowania i alkiłowania. W wyniku tych reakcji otrzymuje się produkty 2'- i 3'-monoacetylowane i monoalkilowane.

Aktywowany układ *cis*-diolowy przez wprowadzenie modyfikacji dibutylocynowej, poddany następnie reakcji metylowania jodometanem [47] prowadzi do pochodnych 2'- i 3'-*O*-metylowych jedynie dla urydyny.

Reakcja **58** z diazometanem [48] pozwala na otrzymanie 2'-*O*-metyloadenozyny i 2'-*O*-metylourydyny, natomiast nie sprawdza się w przypadku cytydyny i guanozyny.

Yamauchi ze współpracownikami badali wpływ obecności acetyloacetonianów wybranych metali na reakcję metylowania wodorotlenkiem trimetylosulfoniowym rybo- i deoksyrybonukleozydów [49]. Z rybonukleozydami kompleks metalu promował metylowanie funkcji 2'- i 3'-hydroksylowych dając produkty monometylowane. Nie obserwowano podobnego wpływu acetyloacetonianów dla reakcji metylowania deoksyrybonukleozydów. Rezultat ten autorzy przypisują wzrostowi nukleofilowości funkcji 2'- i 3'-hydroksylowych reszt rybozy w utworzonym kompleksie z kationem metalu. Kompleks taki nie może powstać w przypadku pochodnych deoksyrybozy. Aktywność badanych metali w promowaniu *O*-metylowania wzrasta w następującej kolejności: $\text{Mn}^{2+} < \text{Co}^{2+} = \text{Zn}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} < \text{Fe}^{3+}$.

Acetyloacetoniany wspomnianych metali użyte razem z czynnikiem metylującym, takim jak wodorotlenek trimetylosulfoniowy, prowadzą do metylowania funkcji 2' i 3' hydroksylowych urydyny, adenozyny i cytydyny. Otrzymano izomery metylowane w stosunku od 1:1 do 2:1 dla adenozyny i 3:1 dla urydyny i cytydyny. Zaobserwowano również obniżenie wydajności *N*-metylowania pierścienia purynowego i pirymidynowego adenozyny i cytydyny. Natomiast w przypadku guanozyny reakcji metylowana ulega atom azotu N-1 zasady heterocyklicznej obok funkcji 2'- i 3'-hydroksylowych.

Acetyloacetoniany magnezu i wapnia prowadziły w większym stopniu do metylowania funkcji 2'-hydroksylowej w odróżnieniu od wcześniej badanych soli dla nukleozydów pirymidynowych [50]. Metylowany 3' izomer powstawał w śladowych ilościach. 2'-*O*-Metylocytydynę i 2'-*O*-metylourydnę autorzy otrzymali odpowiednio z wydajnością 66% i 35%. Funkcjonalizowanie atomu azotu N-3 urydyny grupą metylową lub benzyłową spowodowało w reakcji metylowania wzrost wydajności pochodnej 2'-*O*-metylourydyny do 70-83%.

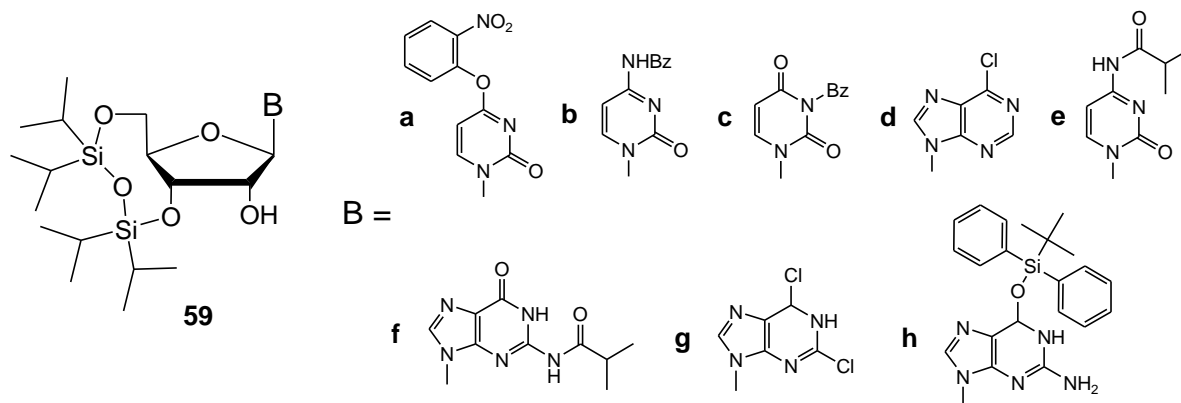
Późniejsze prace pokazały przydatność zastosowania acetyloacetonianów kationów Mg^{2+} , Sr^{2+} i Ag^+ w reakcji metylowania adenozyiny i 1-*N*-benzylguanozyiny [37]. Zostały otrzymane metylowane 2'- i 3'-izomery w stosunku 9:1 dla adenozyiny stosując związki kationów Mg^{2+} i Ag^+ oraz w stosunku 4:1 i 8:1 dla 1-*N*-benzylguanozyiny odpowiednio dla związków kationów Ag^+ i Sr^{2+} .

Powyższe podejście generalnie wymaga pracochłonnego oczyszczania chromatograficznego 2'- i 3'-*O*-metylowanych izomerów.

1.1.4. Metylowanie 3',5'-*O*-TIPDSi-blokowanych rybonukleozydów

Wprowadzenie grupy 1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylowej (TIPDSi) [21] na 3'- i 5'-funkcje hydroksylowe upraszcza selektywne alkirowanie funkcji 2' hydroksylowej. Przy tak funkcjonalizowanych rybonukleozydach **59** (rys. 4) alkirowanie przeprowadzano przeważnie z wykorzystaniem jodometanu w obecności tlenku srebra jako katalizatora.

Nyilas i Chattapadhyaya [51] przedstawili otrzymywanie 2'-*O*-metylourydyiny i 2'-*O*-metylocytydyiny wychodząc ze wspólnego prekursora, jakim był 1-[(3',5'-*O*-TIPDSi)- β -*D*-erythro-pentofuranozylo]-4-(2-nitrofenylo)-2-pyrimidon (**59a**). Reakcję metylowania prowadzono za pomocą jodometanu w obecności tlenku srebra.



Rys. 4. Substraty w reakcji metylowania jodometanem w obecności czynnika aktywującego

Pełne badania dotyczące metylowania rybonukleozydów blokowanych grupą TIPDSi jodometanem w obecności tlenku srebra zostały opisane przez Inoue'ę i innych [52]. Do otrzymania 2'-*O*-metylo pochodnej cytydyiny autorzy wykorzystali 3',5'-TIPDSi-4-*N*-benzoilocytydynę (**59b**). Metylowanie przebiegło z wydajnością 70%. W przypadku urydyiny i adenozyiny zastosowano odpowiednio 3-*N*-benzoilowaną pochodną urydyiny (**59c**) i 6-chloropurynową pochodną rybozy (**59d**). Próby metylowania 3',5'-*O*-TIPDSi-2-*N*-

izobutyryloguanozyny (**59e**) oraz innych N-funkcjonalizowanych pochodnych nie przyniosły sukcesu i dlatego pochodne guanozynowe otrzymywano przez metylowanie diazometanem w obecności katalizatora, jakim jest $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Zoptymalizowana synteza w dużej skali 4-*N*-izobutyrylo-2'-*O*-metylocytydyny z **59f** została opisana przez Vaghefiego i Hogrefe'ra [53].

Sproat i współpracownicy skoncentrowali się na opracowaniu dogodnej syntezy pochodnej guanozyny, wykorzystując 3',5'-*O*-TIPDSi blokowany rybonukleozyd purynowy [54, 55].

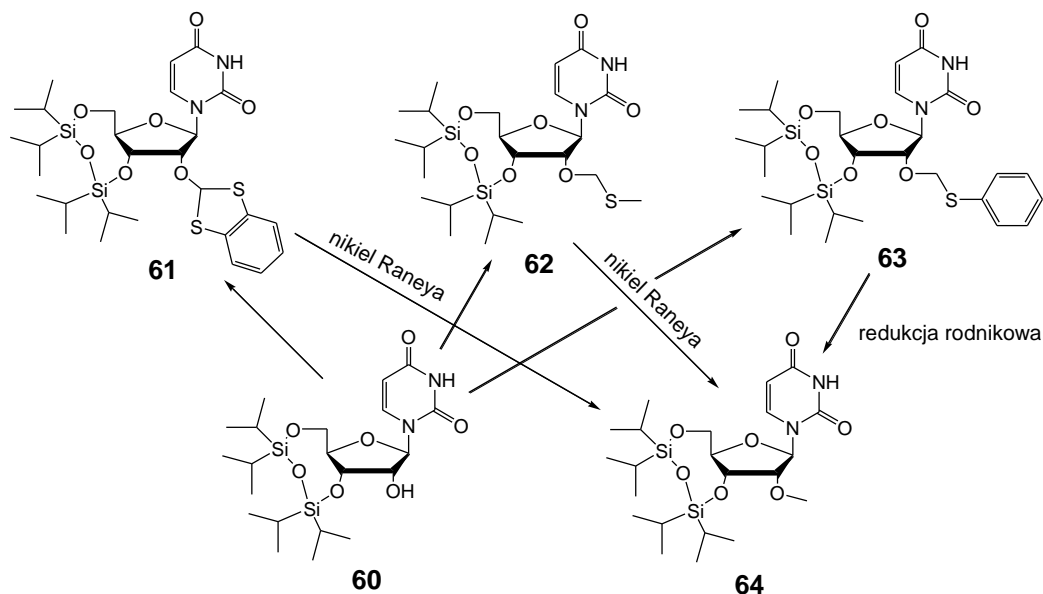
Najlepszą syntezą 2'-*O*-metyloguanozyny okazało się zastosowanie prekursora 3',5'-*O*-TIPDSi-2,6-dichloropurynowego (**59g**) oraz nowego układu metylującego: jodometanu w obecności 2-*tert*-butyloimino-2-dietyloamino-1,3-dimetyloperhydro-1,3,2-diazafosforinu (MeI/BEMP) [54]. Ta procedura została później wykorzystana do reakcji metylowania 3',5'-*O*-TIPDSi-6-*O*-TBDPSi-guanozyny (**59h**) [55]. Wysoki koszt BEMP, stosunkowo mała trwałość 3',5'-*O*-TIPDSi-6-*O*-TBDPSi-guanozyny i skromna całkowita wydajność (50%) skłaniają do poszukiwania kolejnych lepszych metod syntezy.

1.1.5. Pozostałe metody otrzymywania 2'-*O*-metylorybonukleozydów

Metylowanie urydyny i guanozyny jodometanem w obecności tlenku srebra albo wodoru sodu wymaga ochrony kwasowych atomów azotu 3-N i 1-N odpowiednio w pierścieniu pirymidynowym i purynowym. Dlatego zostały rozpoczęte prace nad opracowaniem nowych podejść wprowadzających grupę metylową bez ochrony kwasowych atomów zasady heterocyklicznej.

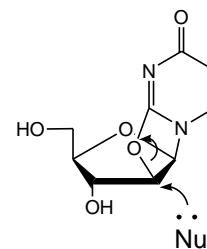
Sekine i Hata [56] opisali wprowadzenie grupy 1,3-benzoiloditiolo-2-ylowej do 3',5'-*O*-TIPDSi-urydyny (**60**) bez ochrony atomu azotu 3-N. Grupa 2'-*O*-metylowa była generowana z **61** po odblokowaniu niklem Raneya.

Etery metylotiometylowy [57] albo metylotiofenylowy [22] były poddane reakcji z 3',5'-*O*-TIPDSi-urydyną (**60**) bez blokowania zasady heterocyklicznej. Desulfuryzacja niklem Raneya w przypadku **62** albo redukcja rodnikowa **63** prowadziły do wytworzenia grupy metylowej (**64**) (schemat 8).



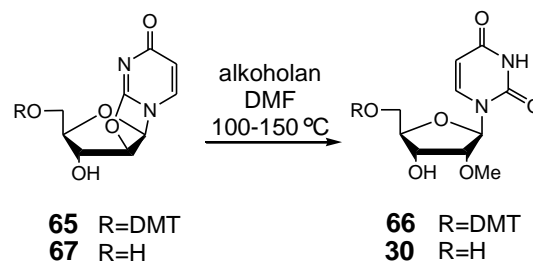
Schemat 8. Synteza pochodnej 2'-*O*-metylourydyny z prekursorów 2'-*O*-tiolowych

Atrakcyjnymi substratami do otrzymywania 2'-*O*-metylorybonukleozydów okazały się pirymidynowe 2,2'-anhydronukleozydy. Związki te są często stosowane w syntezach różnych pochodnych nukleozydowych ze względu na łatwość ich otrzymywania. Powstały, w wyniku dehydratacji, pierścień oksazolinowy jest bardzo reaktywny i ulega otwarciu w obecności wielu nukleofili (rys. 5.). Alkoholany magnezowe i wapniowe zostały wykorzystane do otwarcia pierścienia 2,2'-anhydro-1-(β -D-arabinofuranosylo)uracylu z blokową funkcją 5'-hydroksylową (**65**) dostarczając 2'-*O*-alkilowych pochodnych z wydajnością 50-90% [58].



Rys. 5. Atak nukleofilowy na atom C-2' 2,2'-anhydronukleozydu

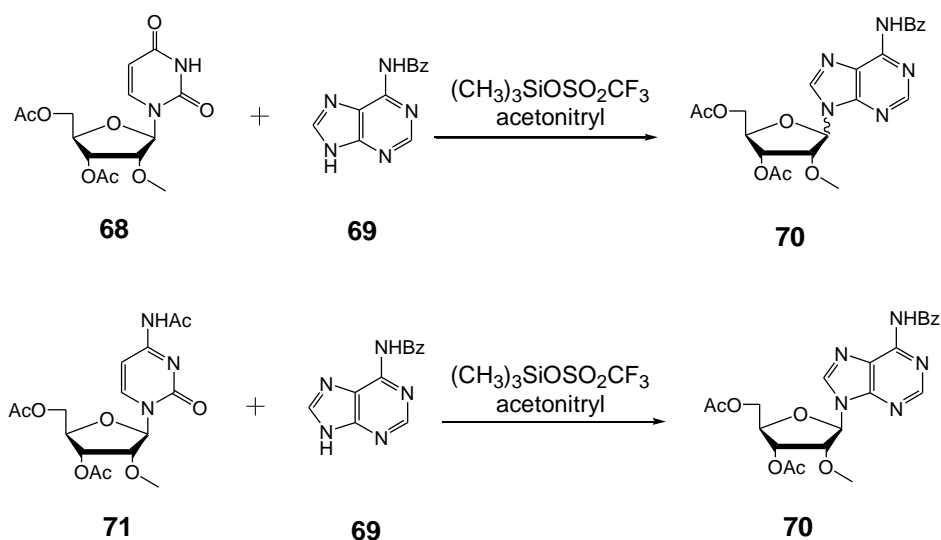
Dla pochodnych metylowych **66** wydajność wynosiła 90%. Pochodną 2'-*O*-metylourydyny (**66**) przekształcono według procedury opisanej w literaturze [59] w pochodną 2'-*O*-metylocytydyny z wydajnością 70%. Natomiast otwarcie pierścienia nieblokowanego 2,2'-anhydronukleozydu pirymidynowego **67**



Schemat 9. Synteza syntonów 2'-*O*-metylowych z 2,2'-anhydronukleozydów

przez reakcję z $B(OMe)_3$ w wysokiej temperaturze prowadzi do otrzymania 2'-*O*-metylourydy **30** z wydajnością przekraczającą 90% (schemat 9) [60]. Zastosowany w tej reakcji $Mg(OMe)_2$ również dawał produkt z dużą wydajnością [61].

Dzięki wydajnej syntezie pochodnych 2'-*O*-metylourydy i 2'-*O*-metylocytydyny w reakcji 2,2'-anhydronukleozydów pirymidynowych interesujące wydawały się studia nad reakcją transglikozylacji w celu otrzymania pochodnych 2'-*O*-metylonukleozydów purynowych (schemat 10). 3',5'-*Di-O*-acetylo-2'-*O*-metylourydyne (**68**) poddano reakcji z 6-*N*-benzoiloadeniną (**69**) w obecności trimetylosilotrifluorometanosulfonianu $(CH_3)_3SiOSO_2CF_3$ jako katalizatora. Reakcję prowadzono w acetonitrylu. W wyniku reakcji otrzymano mieszaninę α i β anomerów (1:1) 6-*N*-benzoilo-3',5'-*di-O*-acetylo-2'-*O*-metyloadenozyny (**70**) z całkowitą wydajnością 60%. Natomiast zastosowanie 4-*N*-acetylo-3',5'-*di-O*-acetylo-2'-*O*-metylocytydyny (**71**) jako donora węglowodanowego w tych samych warunkach reakcji transglikozylacji doprowadziło do wyizolowania β anomeru **70** z wydajnością 50%.

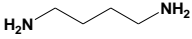
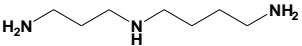
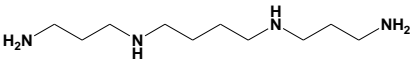


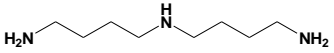

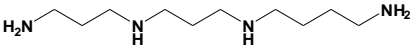
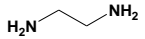
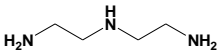
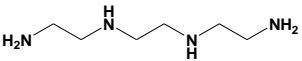
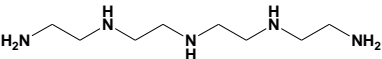


Schemat 10. Otrzymywanie 2'-*O*-metyloadenozynowych pochodnych w reakcji transglikozylacji

1.2. Modyfikacje chemiczne kwasów nukleinowych za pomocą poliamin

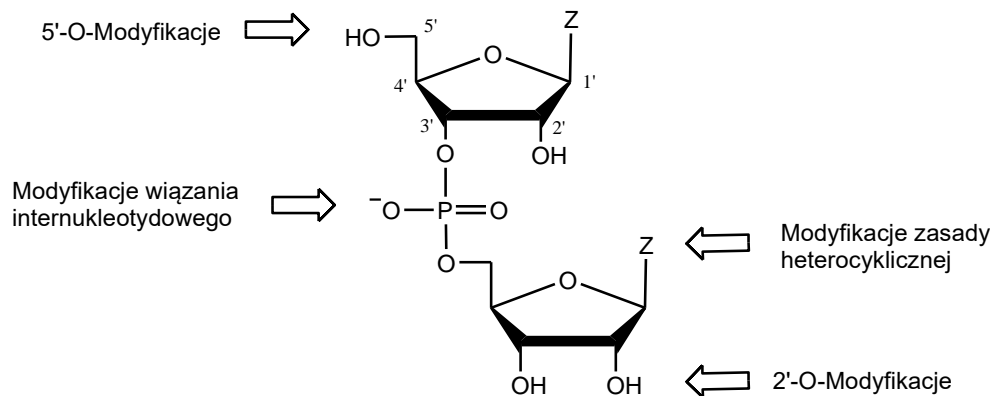
Poliaminy można podzielić na naturalne i syntetyczne. Putrescyna i spermidyna występują we wszystkich komórkach prokariotycznych i eukariotycznych, natomiast spermina tylko w komórkach eukariotycznych.

Tabela 2. Naturalne i syntetyczne poliaminy

Wzór strukturalny	Nazwa związku	
	Systematyczna	Zwyczajowa
Najważniejsze poliaminy biogenne		
	1,4-diaminobutan	putrescyna (Put)
	<i>N</i> -(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan	spermidyna (Spd)
	<i>N,N</i> -bis(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan	spermina (Spm)
Inne poliaminy występujące w przyrodzie		
	1,3-diaminopropan	–
	1,5-diaminobutan	kadaweryna
	<i>N</i> -(4-aminobutyl)-1,4-diaminobutan	homospermidyna
	<i>N,N</i> -bis(3-aminopropyl)-1,3-diaminopropan	norspermina
	<i>N,N</i> -(3-aminopropyl)(4-aminobutyl)-1,3-diaminopropan	termospermina
Przykładowe poliaminy syntetyczne		
	1,2-diaminoetan	etylenodiamina
	<i>N</i> -(2-aminoetylo)-1,2-diaminoetan	dietylenotriamina
	<i>N,N</i> -bis(2-aminoetylo)-1,2-diaminoetan	trietylenotetraamina
	<i>N,N</i> -(3,6-diazaheksano-1-yl)(2-aminoetylo)-1,2-diaminoetan	tetraetylenopentaamina

Cząsteczki poliaminowe obdarzone ładunkiem dodatnim w fizjologicznym pH oddziałują między innymi z ujemnie naładowanymi resztami fosforanowymi kwasów nukleinowych. Interesujące wydało się wprowadzenie reszt poliaminowych kowalencyjnie związanych z łańcuchem oligonukleotydowym, w celu zwiększenia charakteru polikationowego lub przyłączenia do reaktywnych funkcji aminowych innych związków chemicznych np. barwników fluorescencyjnych. Stało się to przedmiotem badań wielu

zespołów w ostatnich kilkunastu latach. I tak, otrzymano oligonukleotydy modyfikowane poliaminami poprzez funkcje 2'-hydroksylową [62, 63] i 5' hydroksylową [64–71]. Inna grupa oligonukleotydów zawiera modyfikacje w części zasadowej. Miejsce modyfikacji jest uzależnione od rodzaju zasady heterocyklicznej tak, aby nie przeszkadzało w oddziaływaniach Watsona-Cricka. Poliaminy biogenne i syntetyczne wykorzystano również jako modyfikacje wiązań internukleotydowych [72–77].



Rys. 6. Miejsca modyfikacji oligonukleotydów za pomocą poliamin

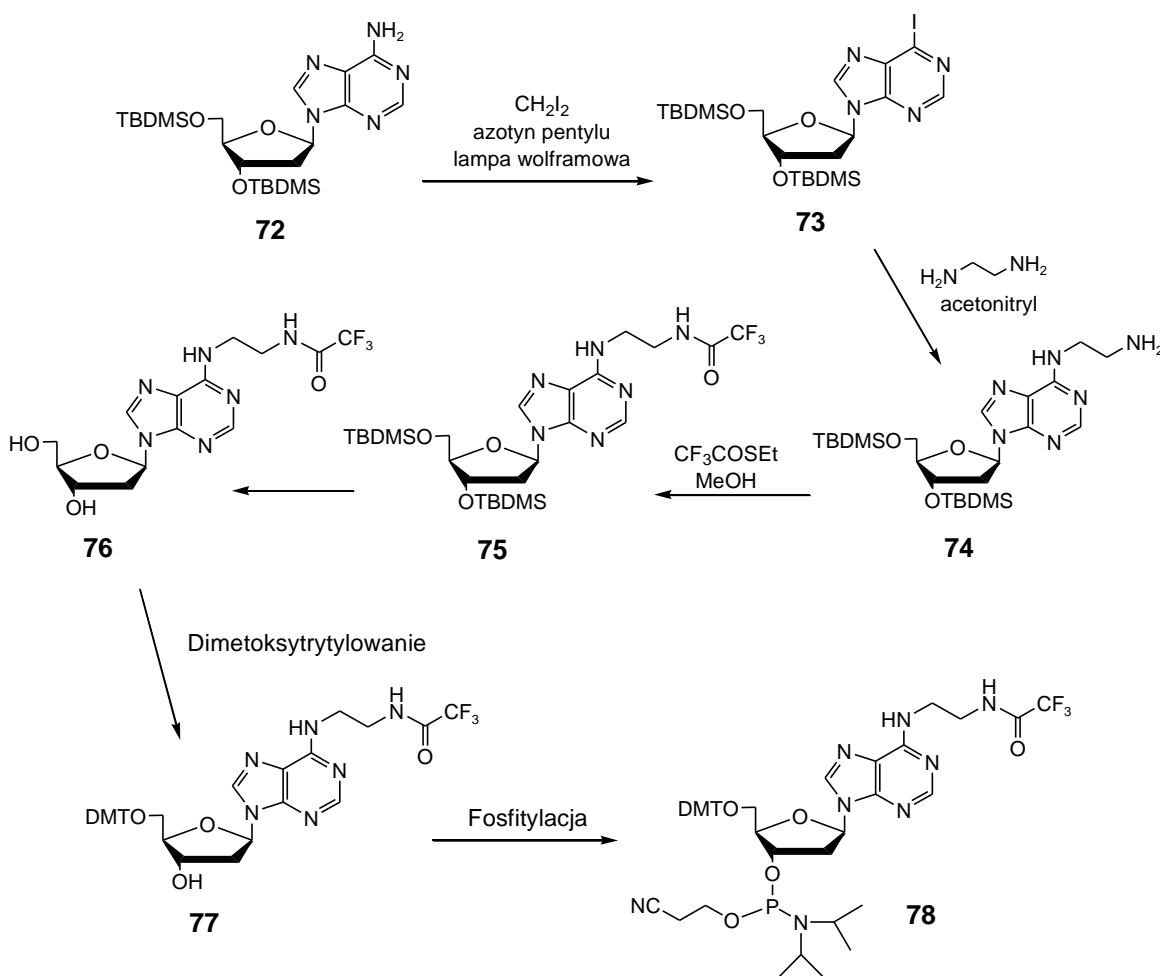
Reszty poliaminowe do łańcucha oligonukleotydowego można wprowadzać na dwa sposoby. W pierwszym przypadku reszta poliaminowa jest wprowadzana na poziomie nukleozydu, następnie przekształcana np. w odpowiedni 3'-amidofosforyn, który jest substratem w automatycznej syntezie DNA metodą amidofosforynową. Jest to tzw. synteza bezpośrednia. Drugie podejście w większości przypadków polega na reakcji poliaminy z odpowiednim prekursorem nukleotydowym posiadającym grupę opuszczającą w warunkach substytucji nukleofilowej i znajdującym się w wyznaczonych miejscach oligomeru.

1.2.1. Modyfikacje pochodnych adeniny

Cosstic i Douglas [78] opracowali syntezę 3'-amidofosforynu 6-N-aminoalkilowej pochodnej 2'-deoksyadenozyny oraz jego włączenie do dimeru w celu oszacowania możliwości tworzenia się specyficznego wiązania łączącego dwie naprzeciwległe zasady heterocykliczne w duplesie DNA.

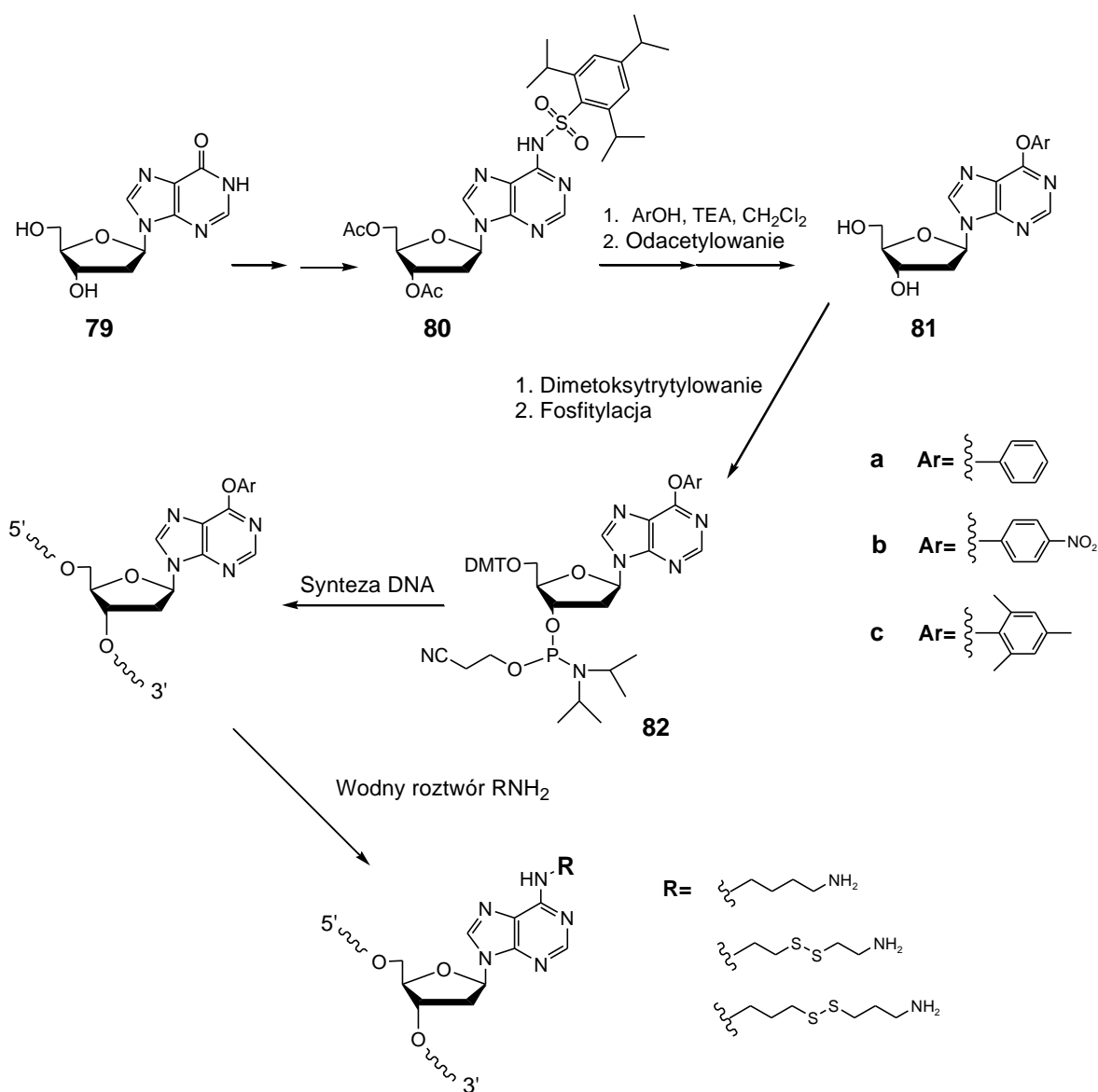
Deoksyadenozyna została przekształcona w 3',5'-di-O-tert-butyldimetylosililową pochodną **72** z wydajnością 80% według wcześniej opisanej procedury [79]. Pochodną **72** poddano fotoindukowanemu diazowaniu w obecności azotynu pentylu i diiodometanu uzyskując 6-jodopurynowy nukleozyd [80]. W wyniku substytucji nukleofilowej atom jodu

zastąpiono podstawnikiem aminoalkilowym w reakcji **73** z prawie dwudziestokrotnym nadmiarem etylenodiaminy. Reakcję prowadzono w temp. 60°C w acetonitrylu z wydajnością 80%. W kolejnym kroku autorzy zastanawiali się nad doбором odpowiedniej grupy ochronnej dla wprowadzonej funkcji aminowej. Jako pierwszą wykorzystali znaną z literatury grupę ftalimidową [81, 82]. Napotkali dwie przeszkody wykluczające jej użycie w toku syntezy. Podczas usuwania grupy TBDMS bezwodnym fluorkiem tetrabutylamoniowym (TBAF) w THF następowało całkowite usunięcie omawianej blokady ftalimidowej. Problem ten autorzy rozwiązali przez zastosowanie innego układu odblokowującego: TBAF w mieszaninie THF/pirydyna/woda (18:1:1) z wydajnością 51%. Z kolei pochodna ftalimidowa nie ulegała dimetoksytrytylowaniu w różnych warunkach reakcji. Za każdym razem odzyskiwano substrat. Autorzy tłumaczyli to częściowym przysłanianiem funkcji 5'-hydroksylowej grupą 2-ftalimidoetylową i w związku z tym utrudnionym dojściem rozbudowanego przestrzennie kationu dimetoksytrytylowego.



Schemat 11. Synteza 3'-amidofosforynu 6-N-aminoalkilowej pochodnej deoksyadenozyny - (metoda bezpośrednia)

Ostatecznie jako blokadę funkcji aminowej zastosowali mniejszą przestrzennie grupę trifluoroacetylową. Uznali, że 6-N-(2-trifluoroacetamidoetylo)nukleozyd powinien być znacznie mniej podatny na β -eliminację lub inne niepożądane reakcje z TBAF. W reakcji **74** z trifluorooctanem tioetylu (CF_3COSEt) w metanolu [83] otrzymano blokowaną 6-N-(2-trifluoroacetamidoetylo)pochodną deoksyadenozyny **75** z wydajnością 70%. Następnie przeprowadzono reakcje odsililowania, trytylowania i fosfitylacji z dobrymi wydajnościami (schemat 11).



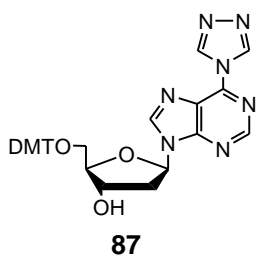
Schemat 12. Modyfikacja poliaminowa deoksyadenozyny otrzymana w metodzie postsyntetycznej

Verdine i współpracownicy [84, 85] zastosowali podejście postsyntetyczne oparte na syntezie tzw. „nukleozydów przekształcalnych” (ang. *convertible nucleosides*) [84–87]. W

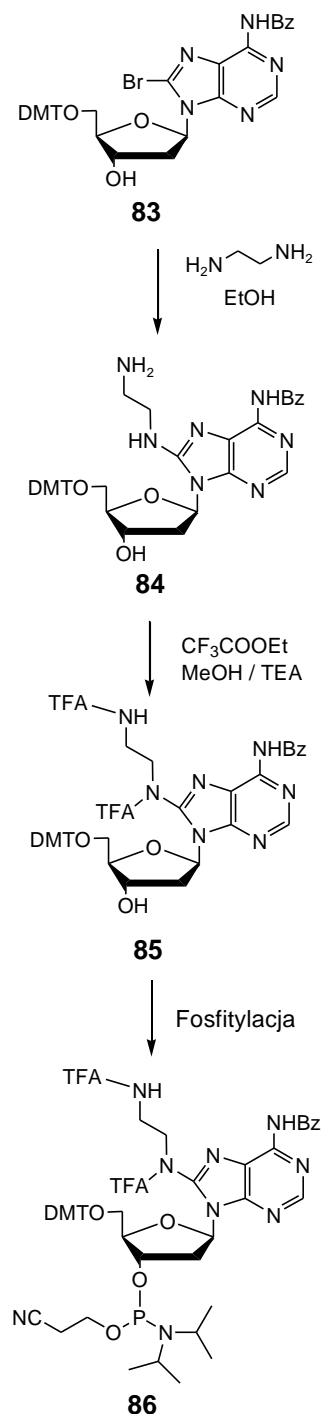
tym celu 2'-deoksyinozynę (**79**) przekształcono w pochodną 6-O-(2,4,6-triizopropylbenzenosulfonylową) **80** [88]. Związek **80** w reakcji z fenolami z udziałem trietyloaminy (TEA) dał pochodne 6-O-arylowe **81** z wydajnościami 75-97%. Po odacetylowaniu produkty **81** poddano reakcji z wodnymi roztworami poliamin w temp. 65 °C. W wyniku tych eksperymentów pochodną **82c** uznano jako nieprzydatną do syntezy funkcjonalizowanych postsyntetycznie oligonukleotydów, ponieważ pochodna ta nie ulega wystarczająco szybko aminolitycznej konwersji do 6-N podstawionych deoksyadenozyny. Fakt ten na poziomie oligonukleotydu mógłby częściowo doprowadzić do termicznej depurynacji lub zasadowej hydrolizy wiązania fosfodiesterowego.

Prakash i Ganesh jako miejsce modyfikacji 2'-deoksyadenozyny wybrali atom węgla C-8 (schemat 13) [89]. Przygotowaną 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-6-N-benzoilo-8-bromo-2'-deoksyadenozynę (**83**) [90] poddali reakcji z 1,2-diaminoetanem w etanolu przez 20 godz. w temp. 25°C (wyd.: 70%). Wprowadzone funkcje aminowe zostały ochronione przez grupy trifluoroacetylowe. Pod wpływem trifluorooctanu etylu w mieszaninie metanolu i TEA [81] z **84** otrzymali **85**. Reakcję fosfitylacji przeprowadzili według standardowej procedury [91] otrzymując **86**. Otrzymany amidofosforyn został włączony w łańcuch oligonukleotydowy.

W laboratorium Markiewicza [92, 93] wykorzystano dimetoksytrytylowaną 9-(2'-Deoksy-β-D-erythro-pentofuranozylo)-6-(1,2,4-triazolo-4-y-lo)purynę (**87**), jako prekursor poliamino-2'-



deoksyadenozyny. Związek **87** został poddany reakcji z putrescyną i sperminą. Reakcje prowadzono w temp. 70 °C przez 8 godz. Otrzymano odpowiednie pochodne poliaminowe. Wprowadzone grupy aminowe zostały zablokowane w wyniku reakcji z bezwodnikiem kwasu trifluoroctowego.

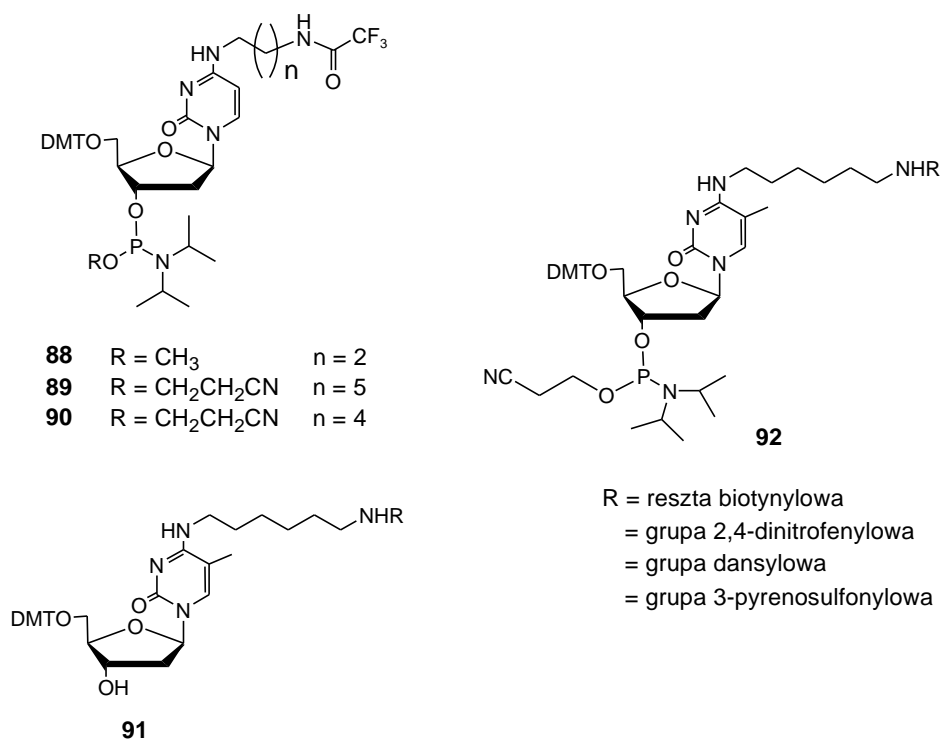


Schemat 13. Pochodna adeniny modyfikowana w pozycji C-8

odpowiednie pochodne poliaminowe. Wprowadzone grupy aminowe zostały zablokowane w wyniku reakcji z bezwodnikiem kwasu trifluoroctowego.

1.2.2. Modyfikacje pochodnych cytozyny

W wyniku transaminacji 2'-deoksycytydyny 1,6-diaminoheksanem [94] lub 1,3-diaminopropanem [95,96] w obecności wodorosiarczanu (IV) sodu zostały otrzymane odpowiednio aminoalkilowane amidofosforyny **88** i **89**. Związek **89** został otrzymany również przez aminoalkilowanie 1,6-diaminoheksanem 4-N-(p-toluenosulfonylowej) pochodnej 2'-deoksycytydyny [97]. Amidofosforyn **89** wprowadzono na 5'-koniec oligonukleotydu podczas syntezy DNA i po odblokowaniu aminoalkilowany oligonukleotyd poddano biotynyłowaniu. W podobny sposób amidofosforyn **90** otrzymano na drodze kilkuetapowej syntezy z 3',5'-di-O-tert-butyldimetylosililo-2'-deoksyurydyny i chlorku mezytylenosulfonylu [98]. Następnie aminoalkilowany amidofosforyn **90** w wyniku substytucji nukleofilowej 1,5-diazapentanem wprowadzono kilkakrotnie na 5'-koniec 2'-O-alkilooligorybonukleotydu i otrzymany oligomer biotynyłowano, a uzyskany produkt wykorzystano w modyfikowanej procedurze oczyszczania kompleksów RNA-białko [98,99].

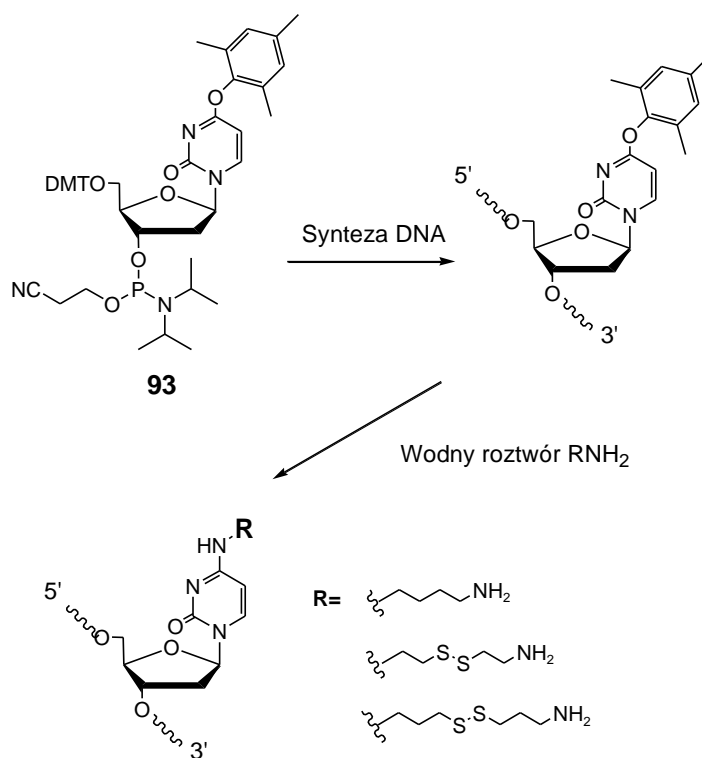


Rys. 7. Pochodne diaminowe cytozyny

Amidofosforyn 5-metylo-2'-deoksycytydyny modyfikowanej w pozycji N-4 zsyntetyzowano w celu nieradioizotopowego znakowania oligonukleotydów [100]. Pochodną **91** otrzymano w reakcji aminoalkilowania odpowiedniego 4-tio-2'-deoksyrybonukleozydu z 1,6-diaminoheksanem. Reakcja **91** z N-hydroksysukcynoimidowym

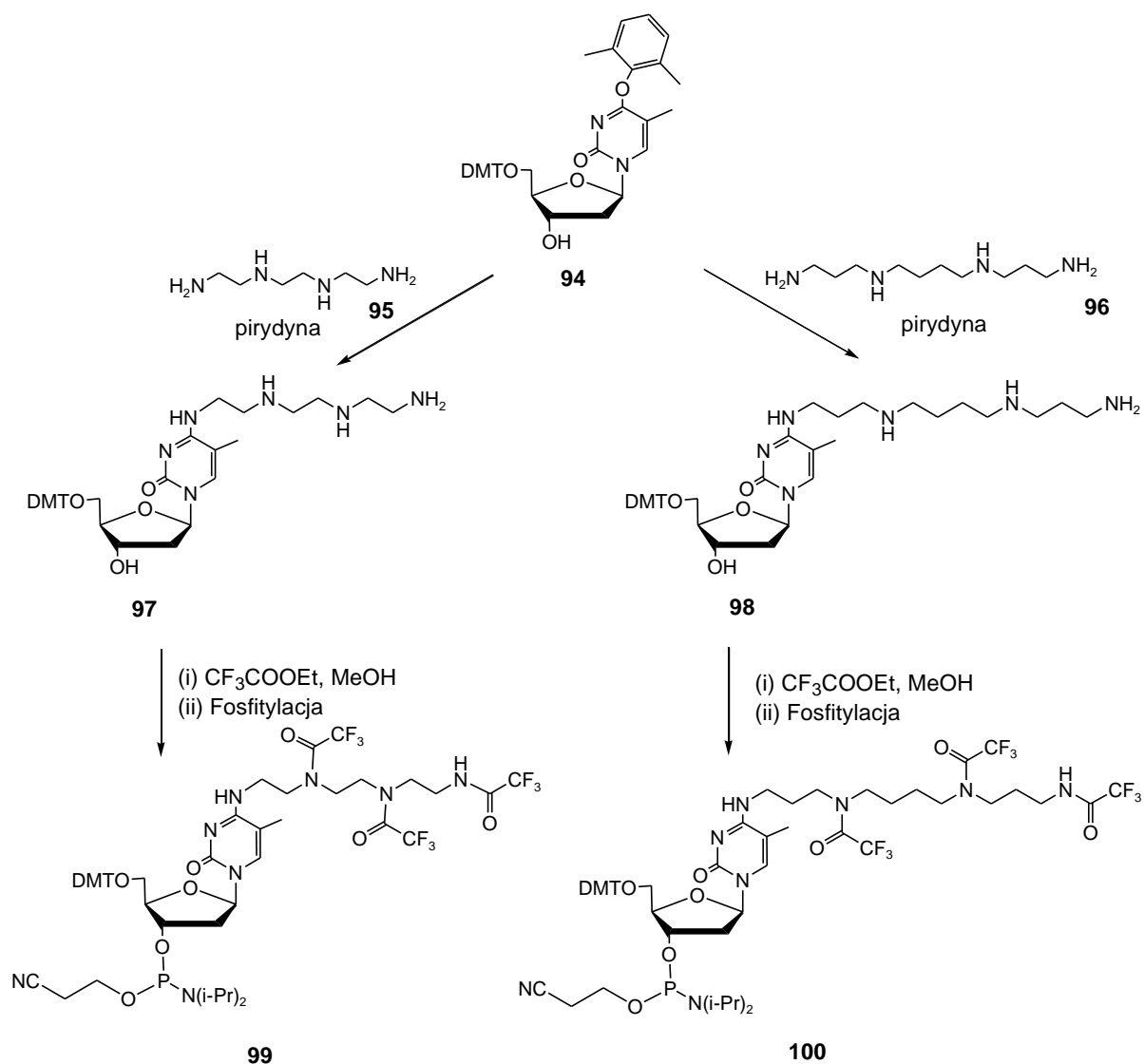
estrem biotyny, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzenem, chlorkiem dansylu lub chlorkiem pyrenosulfonylu, a następnie fosfitylacja doprowadziła do powstania wyznakowanych amidofosforynów **92**.

MacMillan i Verdine [86, 87] zastosowali metodę postsyntetyczną również podczas wprowadzania modyfikacji diaminowych do 2'-deoksytydyny. Amidofosforyn **93** otrzymali analogicznie jak w przypadku 2'-deoksyadenozyny. Pochodną **93** włączyli w łańcuch oligonukleotydowy metodą amidofosforynową. Następnie w reakcji z wodnymi roztworami diamin otrzymano różne 4-N-podstawione pochodne cytozynowe z dobrymi wydajnościami (schemat 14). Substytucja nukleofilowa diamin do arylowych pochodnych cytozynowych zachodziła szybciej niż w przypadku pochodnych adeninowych, dzięki czemu znalazła zastosowanie jako metoda wprowadzania łączników posiadających pierwszorzędowe grupy aminowe.



Schemat 14. Modyfikacja poliaminowa deoksytydyny otrzymana w metodzie postsyntetycznej

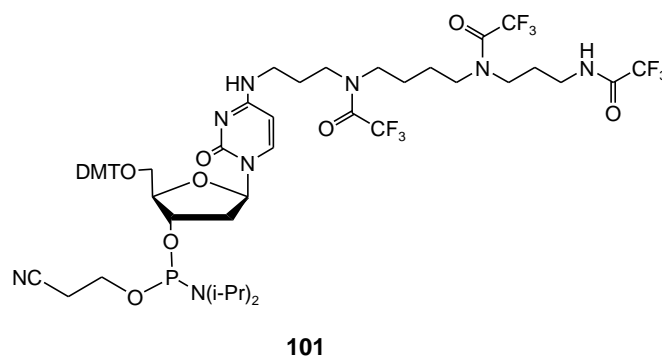
Inni autorzy [101, 102] zastosowali strategię „nukleozydu przekształcalnego” do syntezy amidofosforynów poliamino-2'-deoksytydyny (schemat 15). Tymidynę przekształcili w 4-O-(2,4-dimetylofenylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrylo)tymidynę (**94**), która ulega substytucji nukleofilowej pod wpływem amin tworząc 4-N-alkilo pochodne [87, 103].



Schemat 15. Synteza pochodnej 5-metylo-2'-deoksyctydyny modyfikowana poliaminą w pozycji N-4

Poliaminy takie jak trietylenotetraamina (**95**) i spermina (**96**) posiadają pierwszo- i drugorzędowe funkcje aminowe, przez co autorzy spodziewali się również produktów, które mogły powstać z udziałem bardziej nukleofilowych drugorzędowych funkcji aminowych. Aby ocenić reaktywność atomu węgla C-4 w pochodnej **94** względem pierwszo- i drugorzędowych funkcji aminowych, związek **94** poddano reakcji z N-metylo-1,3-diaminopropanem w pirydynie w temp. 60 °C przez 16 godzin. Powstał jeden produkt z przyłączoną pierwszorzędowną grupą aminową, strukturę jego potwierdzono z wykorzystaniem magnetycznego rezonansu jądrowego. Brak reakcji bardziej nukleofilowej drugorzędowej funkcji aminowej można tłumaczyć znaczącym wpływem sterycznym podstawnika poliaminowego i grupy opuszczającej w stanie przejściowym reakcji. W wyniku

powyższego doświadczenia, prekursor **94** poddano reakcji z **95** lub **96** z niechronionymi drugorzędowymi funkcjami aminowymi. W otrzymanych pochodnych poliaminonukleozydowych **97** i **98** funkcje aminowe poddano następnie reakcji z triflorooctanem etylu, aby wprowadzić blokady trifluoroacetylowe. Związki fosfitylowano [104–107] przekształcając je w odpowiednie 3'-amidofosforyny **99** i **100**, które następnie włączono do łańcucha oligonukleotydu podczas syntezy DNA metodą amidofosforynową. Wydajności przyłączeń amidofosforynów modyfikowanych nukleozydów były zbliżone do obserwowanych dla nukleozydów niemodyfikowanych.

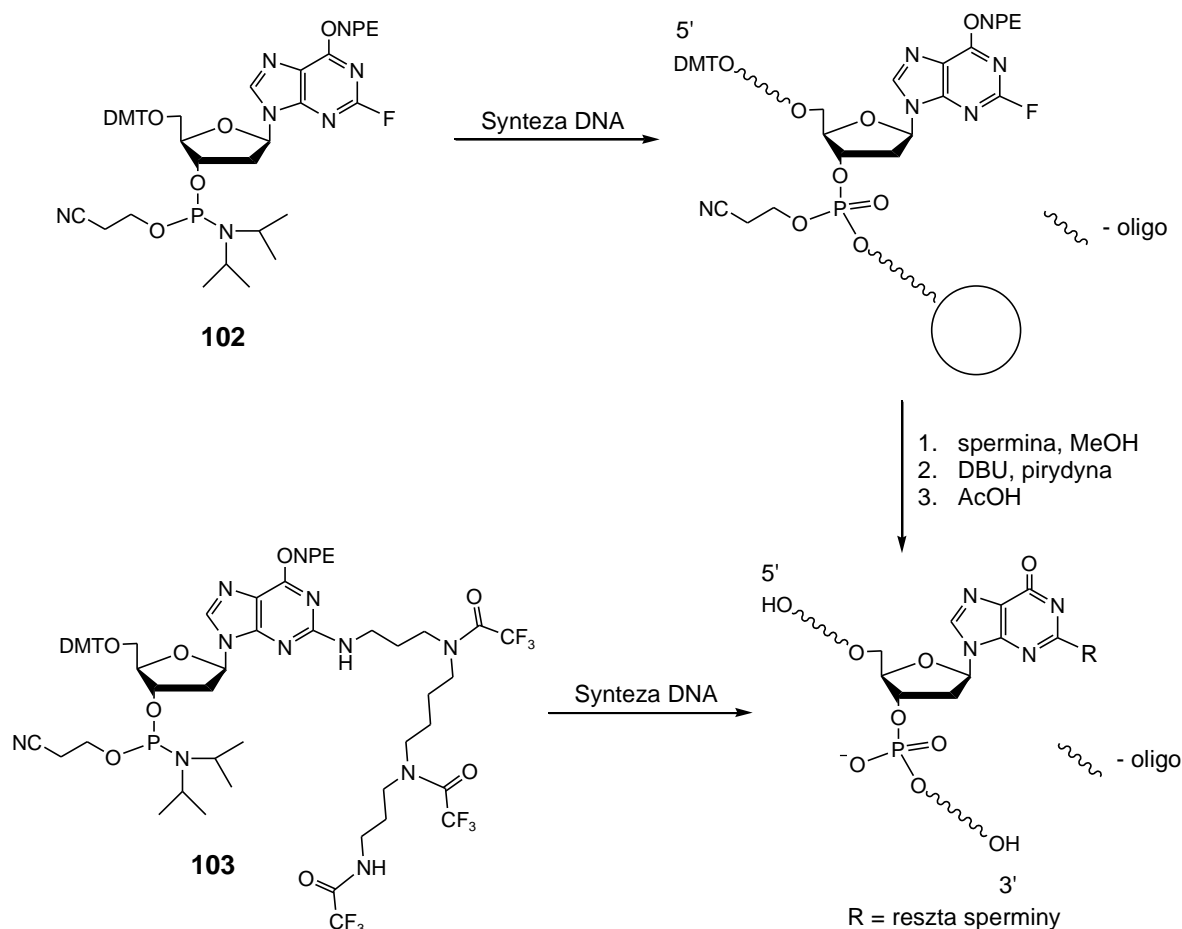


Analogiczny amidofosforyn **101** otrzymano w reakcji pochodnej 4-N-(p-toluenosulfonylo)-2'-deoksycytydyny ze sperminą, następnie pochodną poliaminową poddano reakcji trifluoroacetylowania oraz fosfitylacji [108].

1.2.3. Modyfikacje pochodnych guaniny

W przypadku pochodnych guanozyny reszty poliaminowe wprowadzano w pozycję C-2 pochodnych inozyny zawierających podstawniki halogenowe przy atomie węgla C-2 pierścienia purynowego.

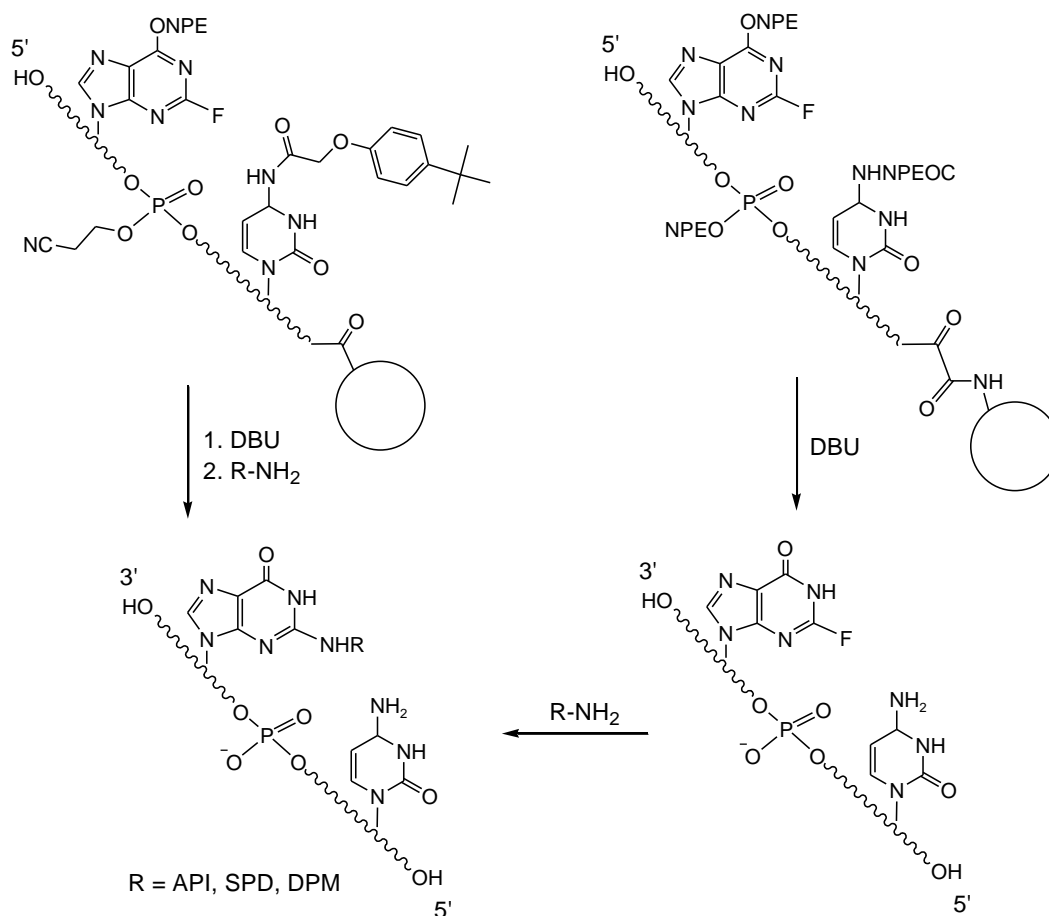
Behr wraz ze współpracownikami jako pierwsi opisali modyfikację 2'-deoksyguanozyny za pomocą sperminy (schemat 16) [109]. Wychodząc z 2'-deoksyguanozyny na drodze sześćoetapowej syntezy otrzymali 3'-amidofosforyn 2-fluoro-6-O-2-(4-nitrofenylo)etylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyinozynę (**102**), który użyli do automatycznej syntezy DNA. Otrzymany 11-mer posiadał dwie jednostki 2'-deoksyinozynowe modyfikowane atomem fluoru w pozycji C-2. Odblokowanie oligonukleotydu, jego odcięcie od podłoża i wprowadzenie sperminy dokonano w reakcji z 1 M roztworem sperminy w gorącym metanolu (50°C). Oligonukleotyd oczyszczono przy użyciu RP-HPLC, usunięto blokady NPE 0,5 M roztworem DBU w pirydynie. Następnie odtrytylowano oligomer na końcu 5' działając 80% wodnym roztworem kwasu octowego.



Schemat 16. Otrzymywanie oligonukleotydów zawierających jednostki poliaminoizozynowe w metodzie bezpośredniej i postsyntetycznej

Autorzy stwierdzili, że podczas syntezy DNA wydajność przyłączania modyfikowanej jednostki **102** spadała do 70-80% obserwując ilości usuwanego kationu trytylowego [110]. Oczyszczony za pomocą RP-HPLC oligomer posiadający pięć jednostek 2-fluoro-2'-deoksyinozyny, poddano działaniu 1,1 M roztworu 1,4-diaminobutanu w metanolu, w temp. 60 °C przez 24 godziny. Analiza HPLC i widma masowe (ES MS) surowych oligonukleotydów przed i po reakcji z diamina, a także produktów hydrolizy enzymatycznej oligomerów wskazały na powstawanie produktów ubocznych na poziomie syntezy DNA i w reakcji z 1,4-diaminobutanem. Powyższy rezultat skłonił autorów do opracowania alternatywnej syntezy oligonukleotydów z jednostkami 2-spermylo-2'-deoksyinozyny [111]. W tym celu zsyntetyzowano 3'-amidofosforyn poliaminonukleozydu **103** z trifluoroacetylowanymi grupami ochronnymi funkcji aminowych. Następnie **103** został wykorzystany w automatycznej syntezie DNA. Otrzymane i oczyszczone poliamino oligonukleotydy z jedną lub trzema resztami sperminy nie budziły zastrzeżeń po analizie spektralnej (MS MALDI-TOF), w przeciwieństwie do oligomeru z sześcioma modyfikacjami.

Pfleiderer i współpracownicy stwierdzili, że oligonukleotydy posiadające jednostki 2-fluoroinozynowe można wyizolować przed reakcją z aminą, prowadzącą do utworzenia 2-N podstawionych guanin, stosując odmienne procedury odblokowania [112–115]. Metodę tę oparto na użyciu amidofosforynów blokowanych grupami 2-(4-nitrofenylo)etylową (NPE) i 2-(4-nitrofenylo)etoksykarbonylową (NPEOC) [112–116] oraz nośników z łącznikiem zawierającym grupę oksalinową (schemat 17) [117, 118].



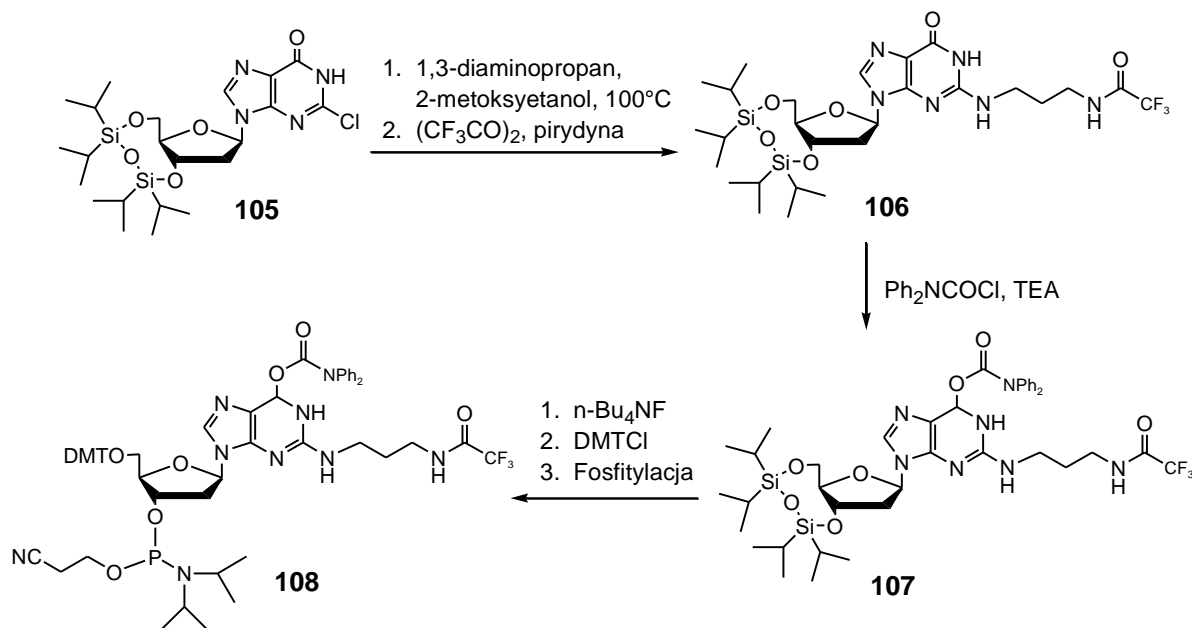
Schemat 17. Wykorzystanie różnych grup ochronnych w postsyntetycznej metodzie otrzymywania poliaminooligonukleotydów

W związku z powyższym inni autorzy zaproponowali dwa kolejne podejścia postsyntetycznego otrzymywania oligomerów z N-2 podstawionymi pochodnymi guaniny [119]. W pierwszym podejściu został zsyntetyzowany oligonukleotyd posiadający jednostkę 2-fluoro-6-O-[2-(4-nitrofenylo)etylo]-2'-deksyinozyny. Niemodyfikowane nukleozydy w obrębie zasady heterocyklicznej były chronione grupą *tert*-butylobenzoilową, zamiast zwykle stosowanych grup benzoilowych i izobutyrylowych. Grupę *tert*-butylobenzoilową

zastosowano w celu uniknięcia substytucji nukleofilowej pierwszorzędowej funkcji aminowej w pozycji C-4 reszt cytozyny [87, 120–124]. Na oligomer związany kowalencyjnie z nośnikiem podziałano 0,5 M roztworem DBU w acetonitrylu przez 30 min. celem usunięcia grupy NPE. Po przemyciu i osuszeniu, przygotowany oligonukleotyd przyłączony do nośnika poddano reakcji odpowiednio ze sperminą, spermidyną lub 3-aminopropylimidazolem w temp. 60°C przez noc. Otrzymane oligonukleotydy oczyszczono i scharakteryzowano metodą spektrometrii mas (ES MS).

W drugim podejściu otrzymany oligonukleotyd również zawierał jednostkę 2-fluoro-6-O-[2-(4-nitrofenylo)etylo]-2'-deoksyinozyny. Natomiast niemodyfikowane nukleozydy były chronione na zasadach grupami NPE i NPEOC. Do automatycznej syntezy DNA wykorzystano podobnie jak we wcześniejszych pracach nośnik z łącznikiem zawierającym grupę oksalinową [118]. W trakcie syntezy DNA wydajności poszczególnych etapów kondensacji wynosiły ok. 99%. Po zakończeniu syntezy na nośnik z przyłączonym oligonukleotydem podziałano 0,5 M roztworem DBU w pirydynie przez 16 godzin. Strukturę oczyszczonego oligomeru potwierdziło widmo masowe. Oligomer posiadający jednostki 2-fluoro-2'-inozynowe poddano reakcjom z roztworami amin. Analiza masowa zsyntetyzowanych produktów wykazała całkowitą przemianę pochodnych 2-fluoroinozynowe w odpowiednie 2-N podstawione pochodne guanozyny.

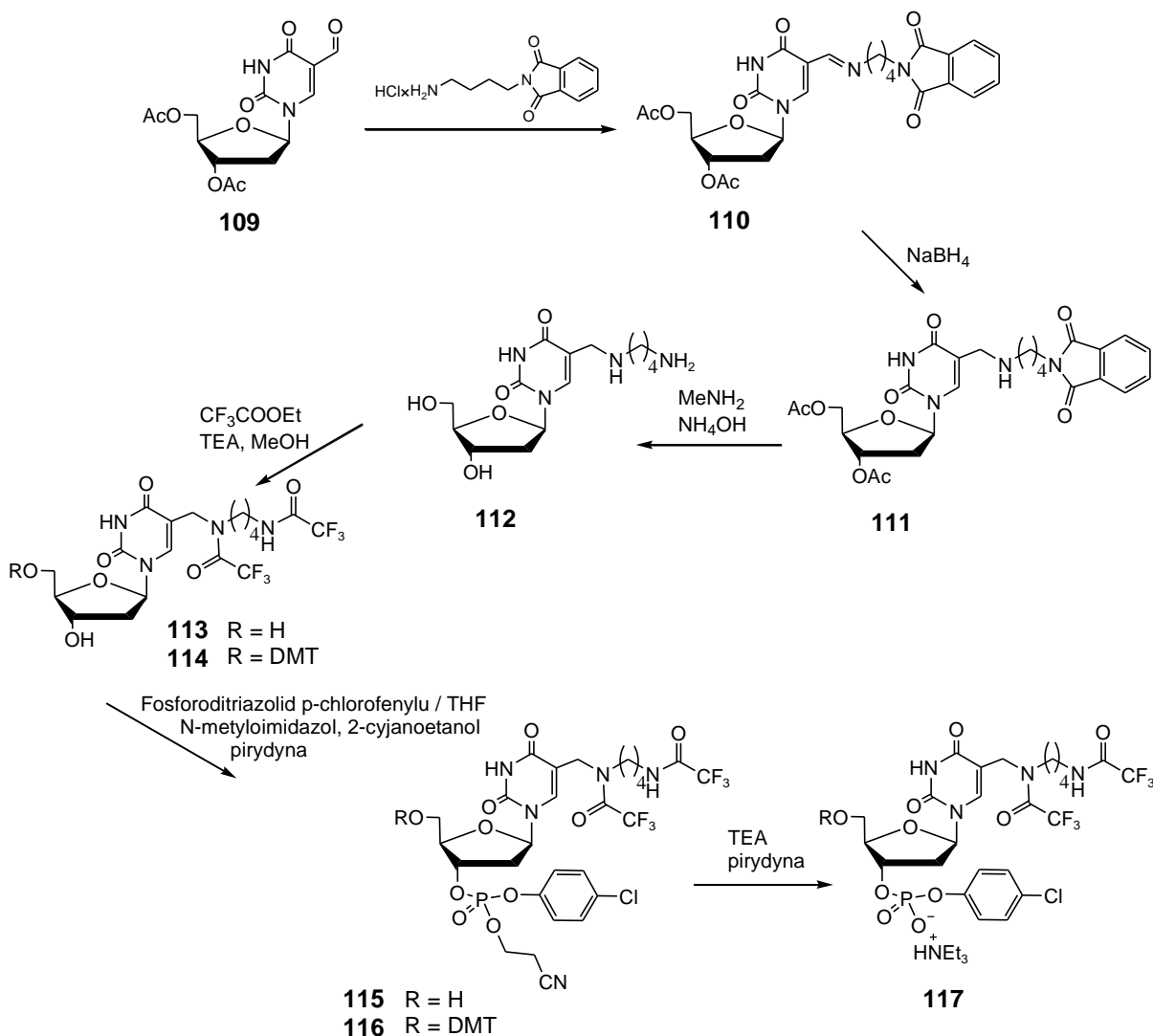
Cook i współpracownicy [125] przedstawili syntezę amidofosforynu N-2-aminoalkilowej pochodnej deoksyguanozyny (**108**) wykorzystując 2-chloro-2'-deoksyinozynę (**104**) [126, 127] jako związek pośredni (schemat 18). W wyniku reakcji **104** z odczynnikiem Markiewicza (TIPDSiCl₂) [21] w obecności TEA otrzymano pochodną 3',5'-O-TIPDSi-2-chloro-2'-deoksyinozyny (**105**). Związek **105** uległ substytucji nukleofilowej pod wpływem 1,3-diaminopropanu w 2-metoksyetanolu w temp. 100°C dając pochodną 2-N-aminoalkilową 2'-deoksyguanozyny z wydajnością 83%. Po trifluoroacetylowaniu wolnej grupy aminowej bezwodnikiem kwasu trifluorooctowego (CF₃CO)₂O w temp. 0°C i reakcji z chlorkiem difenylokarbamoilu otrzymano całkowicie zablokowany nukleozyd **106**. Po usunięciu blokady silylowej z funkcji 3' i 5' hydroksylowych, trytylowaniu i fosfitylowaniu otrzymano amidofosforyn **108**, który został użyty w syntezie oligonukleotydów. Czas kondensacji **108** wydłużono do 10 min. uzyskując wydajności etapowe przekraczające 95%.



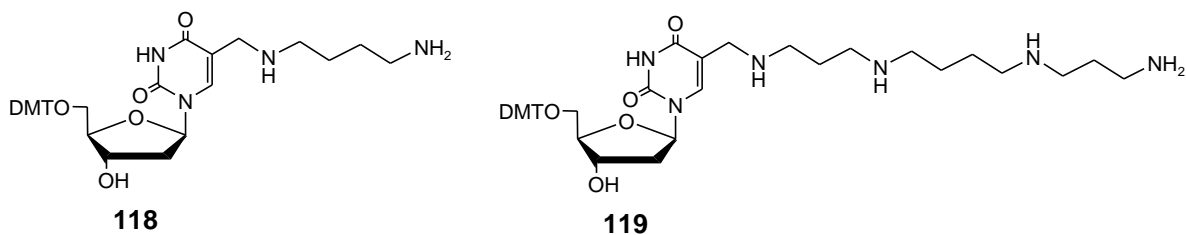
Schemat 18. Synteza 3'-amidofosforynu 2-N-aminoalkilowej pochodnej guaninowej ze związku pośredniego: 2-chloro-2'-deoksyguanozyny

1.2.4. Modyfikacje pochodnych tyminy

Ueda i współpracownicy [81] przedstawili syntezę tymidyny z przyłączoną do zasady heterocyklicznej przez grupę metylową resztą putrescyny (schemat 19). 3',5'-Di-O-acetylotymidyna została utleniona nadsiarczanem potasu [128–130] do 5-formylo-3',5'-di-O-acetylotymidyny **109**. Związek **109** poddano reakcji z nadmiarem chlorowodoru *N*-ftaloiloputrescyny w obecności TEA. Tak wytworzoną zasadę Schiffa **110** zredukowano borowodorkiem sodu otrzymując pochodną **111** z całkowitą wydajnością 30%. W wyniku amonolizy 40%-owym wodnym roztworem metyloaminy (MeNH₂) otrzymano putrescynylotymidynę (**112**). W kolejnym kroku wprowadzono grupy ochronne na aminowe funkcje putrescyny stosując trifluoroctan etylu w obecności TEA. Wykryształowaną z metanolu *N,N*-bis(trifluoroacetylo)putrescynylotymidynę dimetoksyłowano, a następnie przeprowadzono poprzez 3'-(4-chlorofenylo)(2-cjanoetylo)fosforan **116** w trietyloamoniową sól 3'-(4-chlorofenylo)fosforanu **117**, działając na pochodną **115** TEA w temperaturze pokojowej przez 4 godziny. Związki **115** i **117** wykorzystano w syntezie oligonukleotydów metodą fosfortriestrową w roztworze [131,132] lub na nośniku aminometylopolistyrenowym [133].



Schemat 19. Modyfikacja tymidyny putrescyną



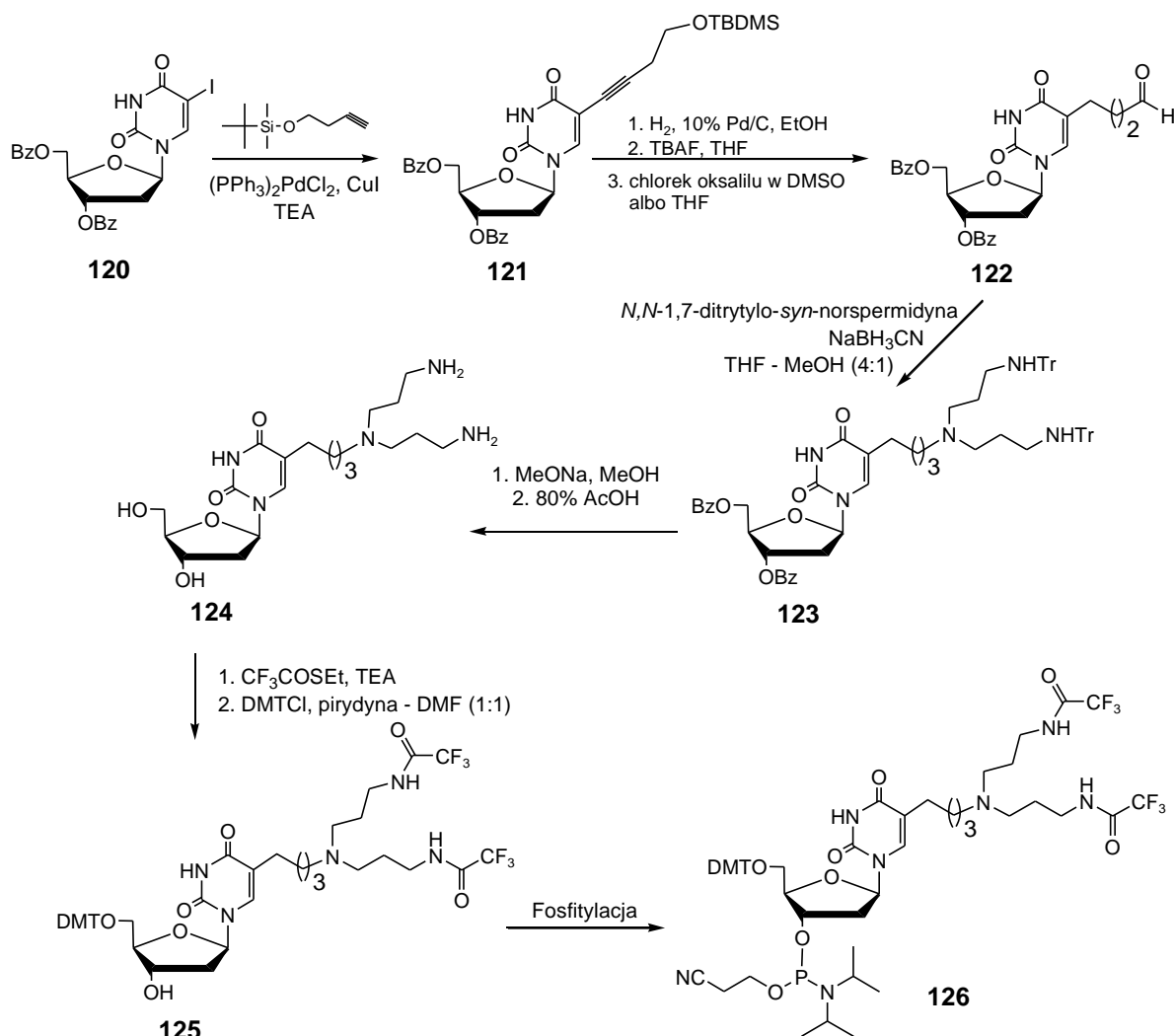
Rys. 8. Dimetoksytrytylowe poliaminowe pochodne tymidyny

W laboratorium Markiewicza [134] wykorzystano pochodną **109** do wprowadzenia reszt poliaminowych: putrescyny i sperminy. Przed reakcją z poliaminami pochodną **109** odacetylowano i funkcję 5'-hydroksylową dimetoksytrytylowano. Następnie trytylowaną

pochodną poddano reakcji z poliaminami nie posiadającymi blokowanych funkcji aminowych. Po redukcji NaBH_4 otrzymano odpowiednio produkty **118** i **119** (rys. 8).

1.2.5. Modyfikacje pochodnych uracylu

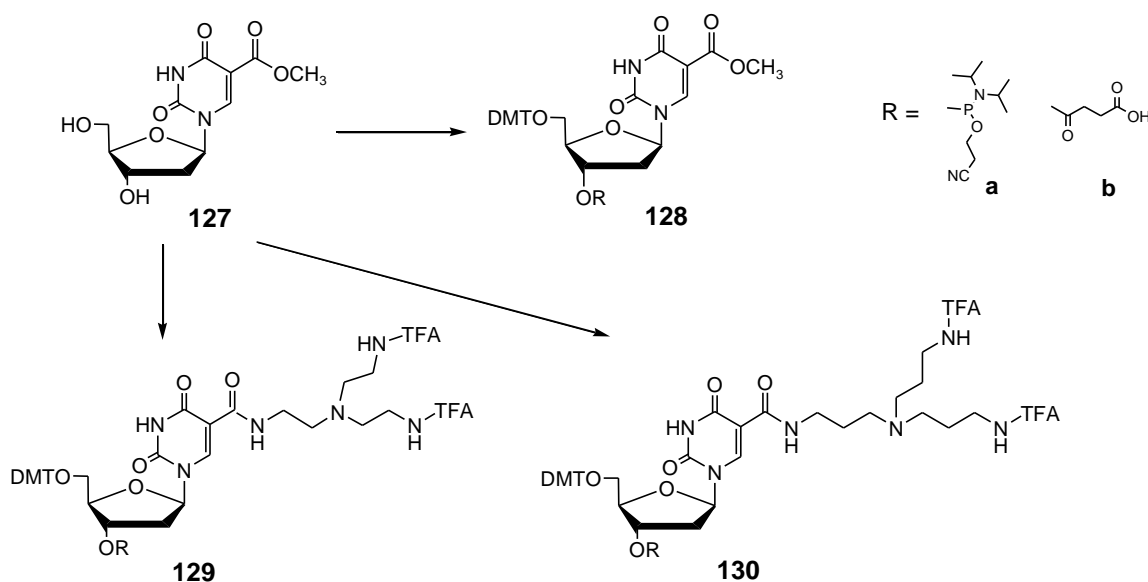
Matsuda i współpracownicy opracowali metody modyfikacji 2'-deoksyurydyny przez wprowadzenie łańcucha poliaminowego w pozycję C-5. W pierwszym podejściu (schemat 20) [135] autorzy zastosowali 5-jodo-3',5'-di-O-benzoilo-2'-deoksyurydynę (**120**) w reakcji z 4-(*tert*-butyldimetylosiloksy)butynem w obecności $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ i jodku miedzi (I) w TEA otrzymując **121** z wydajnością 79%.



Schemat 20. Modyfikacja pochodnej 2'-deoksyurydyny resztą *syn*-norspermidyny

W wyniku hydrogenacji potrójnego wiązania **121** otrzymano odpowiednią pochodną 5-(4-*tert*-butyldimetylosiloksybutynlową). Zdjęto blokadę TBDMSi działając trzema równoważnikami molowymi TBAF w ciągu trzech dni. Stabilność grupy TBDMSi

przyłączonej do funkcji hydroksylowej na końcu łańcucha alifatycznego okazała się większa od stabilności tej grupy blokującej funkcje hydroksylowe w pierścieniu cukrowym nukleozydów. Wolną funkcję hydroksylową utleniono metodą Swerna i otrzymano pochodną formylową **122**, którą poddano reakcji z *N,N*-1,7-ditrytylo-*syn*-norspermidyną. Utworzoną zasadę Schiffa zredukowano cyjanoborowodorkiem sodu przy pH ok. 6,5 z całkowitą wydajnością 63%. Następnie usunięto grupy ochronne, tj. benzoilowe z pierścienia węglowodanowego i trytylowe z reszty poliaminowej działając odpowiednio metanolanem sodu i 80% kwasem octowym. Poliaminową pochodną 2'-deoksyurydyny **124** poddano reakcji z CF_3COSEt w TEA celem zablokowania funkcji aminowych. Wytworzone wiązanie amidowe jest stabilne w kwasowych warunkach odtrytylowania funkcji 5'-hydroksylowej w trakcie syntezy DNA metodą amidofosforynową.



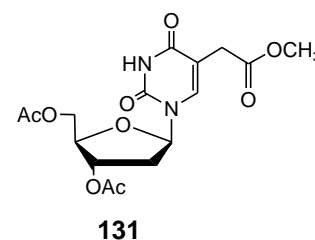
Schemat 21. Pochodne wykorzystane w strategii bezpośredniej i postsyntetycznej otrzymywania oligonukleotydów modyfikowanych poliaminami pochodnych uracylu

W kolejnym kroku prowadzono dimetoksytrytylowanie w pirydynie według standardowej procedury, lecz nie otrzymano oczekiwanego produktu, a jedynie odzyskiwano substrat. Działanie ponad pięciokrotnym nadmiarem DMTCl w mieszaninie pirydyny i DMF (1:1) doprowadziło do otrzymania 5'-dimetoksytrytylowej pochodnej **125** z wydajnością 49%. Reakcję fosfitylacji związku **125** przeprowadzono w acetonitrylu stosując 2-cyanoetylo(*N,N*-diizopropyl)chlorofosfinę i *N,N*-diizopropyletyloaminę otrzymując 3'-amidofosforyn **126** (wyd.: 53%). Stosunkowo niskie wydajności dwóch ostatnich etapów syntezy autorzy tłumaczą wpływem dużego podstawnika poliaminowego przy atomie węgla

C-5 na zmianę reaktywności funkcji hydroksylowych rybozy. Przygotowany związek **126** został wykorzystany w syntezie oligonukleotydów metodą amidofosforynową.

W kolejnym podejściu Matsuda i współpracownicy [136,137] otrzymali oligonukleotydy zawierające jednostki 5-(*N*-aminoalkilo)karbamoilo-2'-deoksyurydyny stosując nową, postsyntetyczną metodę modyfikacji, przy opracowaniu której, wykorzystano ideę „nukleozydów przekształcalnych” wprowadzoną przez Verdine'a [84–87]. 5-Jodo-2'-deoksyurydynę karbonylowano tlenkiem węgla (IV) w metanolu w obecności katalizatora palladowego [138]. Otrzymaną 5-metoksykarbonylo-2'-deoksyurydynę (**127**) dimetoksytrytylowano w pozycji 5', a następnie przekształcono w odpowiedni 3'-amidofosforyn i wykorzystano w automatycznej syntezie fragmentów DNA (schemat 21). 5'-*O*-Dimetoksytrytylowany nukleozyd **127** przekształcono również w pochodną 3'-*O*-sukcynylową, w celu przyłączenia jej do nośnika CPG. Zsyntetyzowane oligonukleotydy zawierające pochodne 5-metoksykarbonylo-2'-deoksyurydyny poddano działaniu znacznego nadmiaru etylenodiaminy lub 1,6-diaminoheksanu w metanolu w temp. pokojowej lub 45°C przez 12-14 godzin. Wynikiem tego działania była konwersja grup metoksylowych w grupy (*N*-aminoalkilo)karbamoilowe, odblokowanie grup ochronnych oraz odcięcie oligomeru od nośnika stałego.

W tym samym laboratorium [139,140] opracowano syntezę 5-podstawionych poliaminowych pochodnych deoksyurydyny w oparciu o wyżej opisaną metodę [136,137]. Autorzy zrezygnowali z postsyntetycznej metody wprowadzania łańcucha poliaminowego na rzecz otrzymywania odpowiednich pochodnych poliaminonukleozydów: 3'-amidofosforynów i 3'-sukcynylołów. Pochodne 3'-sukcynylowe umożliwiają wprowadzenie modyfikowanych jednostek na podłoże stałe, a tym samym na 3'-koniec łańcucha oligonukleotydowego. Wprowadzone funkcje aminowe poddano trifluoroacetylowaniu. Analogiczną syntezę Matsuda i współpracownicy przeprowadzili z wykorzystaniem pochodnej 2'-*O*-metylourydyny i etylenodiaminy [141].



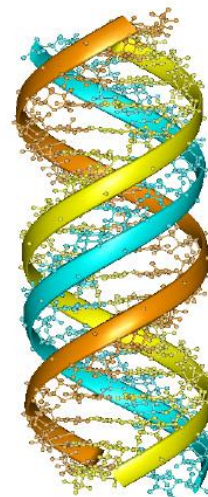
W innych pracach opisano wykorzystanie pochodnej 5-metoksykarbonylometylo-3',5'-*di-O*-acetylo-2'-deoksyurydyny (**131**) do przyłączenia reszt diaminowych [142,143], od 1,2-diaminoetanu do 1,6-diaminoheksanu, oraz reszty *tris*(2-aminoetylo)aminy [144]. Przyłączanie reszty aminowej było prowadzone w obecności DMAP w metanolu w temp. 50 °C. Otrzymano odpowiednie amidofosforyny i modyfikowane oligonukleotydy.

1.3. Wpływ modyfikacji poliaminowych i grupy 2'-O-metylowej na trwałość kompleksów kwasów nukleinowych

1.3.1. Struktury trypleksowe niemodyfikowanych oligonukleotydów

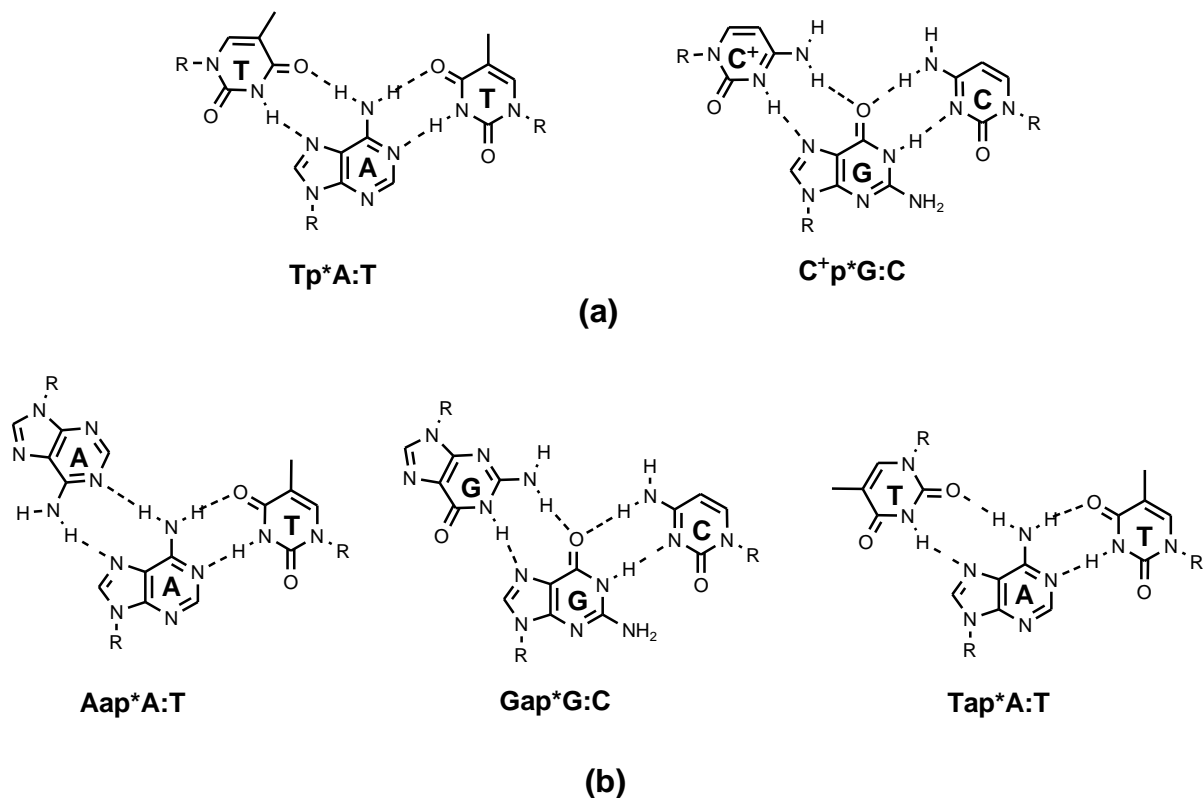
Aleksander Rich, David R. Davies i Gary Felsenferd pierwsi odkryli [145] strukturę trypleksową DNA i RNA w 1957 roku. Początkowo struktura ta wydawała się interesującą anomalią dwuniciowej helisy DNA, bez większego fizjologicznego i praktycznego znaczenia. W 1987 roku zdano sobie sprawę, że trypleksy powstałe z syntetycznie otrzymanych oligonukleotydów można zastosować do projektowania „reagentów” specyficznie rozpoznających sekwencje dwuniciowego DNA [146, 147].

Ligand rozpoznający sekwencję łańcucha kwasu nukleinowego powinien „reagować” z wieloma nukleotydami lub parami zasad. Fragmenty kwasów nukleinowych wiążą inne kwasy nukleinowe bardzo specyficznym. Długość takiego ligandu oligonukleotydowego zależy od rozmiaru docelowego kwasu nukleinowego. Obliczenia statystyczne dotyczące genomu ludzkiego [148] sugerowały wykorzystanie fragmentów 17-nukleotydowych w celu utworzenia struktury trypleksowej w określonym położeniu DNA. Parę lat po odkryciu struktury podwójnej helisy DNA [149] opisano po raz pierwszy tworzenie potrójnej helisy [150]. Wykazano, że krótki oligonukleotyd może połączyć się z dupleksem DNA tworząc potrójną helisę [146, 147]. Podstawy rozpoznawania molekularnego podwójnie splecionego DNA przez oligonukleotydy poznano dzięki badaniom polinukleotydów. Tymina i adenina mogą tworzyć wiązania wodorowe z adeniną wchodzącą w skład pary zasad A:T typu Watsona – Cricka. Cytosyna i guanina mogą również tworzyć wiązania wodorowe z guaniną wchodzącą w skład pary zasad G:C typu Watsona – Cricka. Jednakże cytosyna w pozycji N-3 powinna być protonowana (w innym przypadku tworzy się tylko pojedyncze wiązanie wodorowe).



Rys. 9. Struktura trypleksowa DNA

Trypleksy przedstawiono na rysunkach 9 i 10, na których widać jak zasada z trzeciej nici DNA może utworzyć wiązanie wodorowe typu Hoogsteena, normalne lub odwrócone. Schemat ten został opisany zgodnie z oryginalną propozycją Hoogsteena [151].



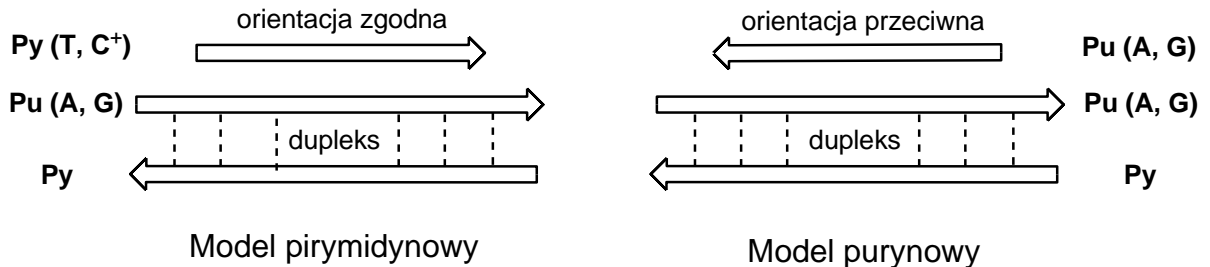
Rys. 10. Modele struktur trypleksowych: (a) model pirymidynowy wiązania – łańcuch polipirymidynowy wiąże się w strukturze trypleksowej w kierunku zgodnym (p) względem polipurynowej nici DNA; (b) model purynowy wiązania - łańcuch polipurynowy wiąże się kierunku przeciwnym (ap) względem polipurynowej nici DNA dając trypleks
 ‘ * ‘ – oddziaływanie wodorowe typu Hoogsteena
 ‘ : ‘ - oddziaływanie wodorowe typu Watsona – Cricka

Powstawanie potrójnej helisy DNA jest wynikiem przyłączenia trzeciej nici w dużej bruzdzie dupletu DNA. Oligonukleotyd tworzący strukturę trypleksową jest bogaty albo w zasady pirymidynowe (Py) albo w purynowe (Pu) w orientacji zgodnej (równoległej) (p) lub przeciwnej (antyrównoległej) (ap) w odniesieniu do centralnego łańcucha purynowego (rys. 11). Trzecia nić bogata w zasady purynowe tworzy trypleks w orientacji antyrównoległej, podczas gdy nić bogata w zasady pirymidynowe występuje w orientacji równoległej [4, 152]. I tak w modelu pirymidynowym tymina rozpoznaje adeninę z pary zasad A:T Watsona – Cricka tworząc triadę Tp*A:T w orientacji zgodnej. Protonowana cytozyna oddziałuje z guaniną z pary zasadowej G:C, tworząc Cp*G:C również w orientacji

zgodnej (rys. 10). W ten sam sposób, w modelu purynowym, adenina trzeciej nici oddziałuje z adeniną z pary A:T. Prowadzi to do powstania następującej triady: Aap*A:T. Natomiast guanina trzeciej nici wiąże się do guaniny z pary zasad G:C typu Watsona – Cricka helisy DNA tworząc triadę Gap*G:C w odwróconym układzie Hoogsteena.

Częste występowanie traktów polipurynowych - polipirymidynowych w DNA organizmów eukariotycznych sugeruje, że sekwencje te mają funkcje biologiczne i w konsekwencji można ich obecność wykorzystać do celów terapeutycznych. Analiza baz danych sekwencji eukariotycznych ujawnia tysiące takich traktów polipurynowych – polipirymidynowych.

Tworzenie się trypleksowych struktur kwasów nukleinowych podlega ścisłym regułom będących rezultatem oddziaływań wewnątrz- i międzycząsteczkowych. Dla danej sekwencji DNA można zaprojektować sekwencję oligonukleotydową, która może specyficznie oddziaływać z nią i w ten sposób może utrudniać ekspresję genu kodowanego przez ten DNA. Struktury trójniciowe zostały przedyskutowane między innymi w pracach [153–156].



Rys. 11. Model purynowy i pirymidynowy w strukturze trypleksowej

Tworzenie i stabilność trypleksów DNA jest uwarunkowana kilkoma typami oddziaływań, takimi jak oddziaływania elektrostatyczne, warstwowe, tworzenie wiązań wodorowych typu Hoogsteena, schemat hydratacji oraz oddziaływania hydrofobowe, a także pH roztworu. Względny udział wymienionych czynników jest trudny do oszacowania w danej strukturze. Jest on wypadkową wszystkich tych „elementów” oddziaływań, a brak jednego czynnika może być skompensowany przez większy wkład innego. Oddziaływania te zostały pokrótce opisane poniżej.

1.3.1.1. Siły elektrostatyczne

Oddziaływania elektrostatyczne prowadzące do stabilizacji trypleksów prawdopodobnie obejmują albo ekranowanie Debye'a – Hückela ujemnie naładowanych fosforanów przez kationy, albo w wyniku specyficznej dla danego miejsca neutralizacji ładunków fosforanowych przez wiązanie kationów [4, 157, 158].

Badania dotyczące wpływu kationów, neutralizujących ujemne ładunki anionów fosforanowych, na trwałość struktury trójniciowej pokazały, że w zależności od wartości ładunku, kationy stabilizują trypleksy przy różnych wartościach stężenia kationu. Potrójne helisy tworzą się z naturalnych polimerów [np.: poli(A), poli(U), poli(T)] w obecności jednododatnich jonów w stężeniach pomiędzy 0,1 – 1 M [150, 159]. Wartość stężenia jonów dwudodatnich, Mg^{2+} , putrescyny²⁺, od 1 mM do 10mM stabilizuje struktury trójniciowe [150, 159]. Sprotonowane poliaminy, takie jak spermina i spermidyna, obdarzone w pH ok. 7 odpowiednio 4 i 3 ładunkami dodatnimi, stabilizują trypleksy przy wartościach stężeń kationu od 0,5 do 5 μM [145, 160–163]. Ze wzrostem stężenia soli w danym zakresie stężeń wzrasta trwałość powstałego trypleksu.

Obecność tylko jednododatniego jonu, kationu sodowego w układzie zwiększa temperaturę topnienia dupleksu DNA [164]. Jeżeli w badanym układzie znajdują się kationy wielowartościowe, takie jak np.: Mg^{2+} lub spermina⁴⁺, przy pewnym stężeniu jonów Na^+ obserwuje się obniżenie temperatury topnienia. Przy granicznej wartości stężenia jonów Na^+ temperatura topnienia osiąga wartość najniższą, ale temperatura ta jest wyższa od temperatury topnienia kompleksu w roztworze pozbawionym soli. Wartość granicznego stężenia jonów Na^+ w obecności jonów Mg^{2+} wynosi 10 mM, natomiast w obecności kationu sperminowego 100 mM. Jeżeli w danym układzie znajdują się kationy wielowartościowe to powyżej wartości granicznego stężenia jonów Na^+ dochodzi do topnienia DNA tak, jak w roztworze pozbawionym kationów. Wspomniany fakt został wyjaśniony na podstawie teorii zagęszczania przeciwjonów¹ (ang. *counterion condensation theory*) [165, 166]. Z tego wynika, że kationy jedno- i wielowartościowe wpływają na neutralizowane przez siebie fosforany. Gdy dwa różne kationy są obecne w układzie, ich udział w zobojętnianiu anionów fosforanowych jest proporcjonalny do ich stężenia. Wpływ stabilizujący kationów wzrasta w serii $K^+ < Mg^{2+} < spermina^{4+}$. Wpływ stabilizujący trypleksy DNA i RNA przez czterowartościowy kation sperminowy jest zauważalny już w mikromolowym stężeniu.

¹ przypuszczalne tłumaczenie

Dane na temat umiejscowienia kationów poliaminowych w dwu- i trójniciowym DNA są dość skąpe i nie jest znany jakiś jeden określony schemat ich oddziaływania z DNA. Tym niemniej uzasadnione jest oczekiwanie, że poliaminy mogą oddziaływać elektrostatycznie z resztami kwasu fosforowego i tworzyć wiązania wodorowe z dostępnymi grupami o charakterze akceptorowym. W dodatku przy stabilizacji wynikającej z neutralizacji fosforanów, kationy poliamin mogą wiązać różne łańcuchy polinukleotydowe, gdy różne części łańcucha kationu poliaminowego oddziałują z różnymi niemi kwasu nukleinowego.

1.3.1.2. Oddziaływania warstwowe i hydrofobowe

Badanie trypleksów zawierających niesparowania i wybrzuszenia pokazują znaczenie wkładu, jaki wnoszą oddziaływania warstwowe w trwałość struktur trójniciowych [167–169].

Wartość energii swobodnej wprowadzonej przez pojedyncze niesparowanie w strukturze trypleksowej wynosi od 2,5 do 6 kcal / mol. Wielkości te są zbliżone w dupleksach DNA i RNA [170]. Wpływ oddziaływań warstwowych na stabilność trypleksów potwierdza fakt, iż wprowadzenie jednostki pozbawionej zasady heterocyklicznej w łańcuchu oligonukleotydowym eliminujące dwa oddziaływania warstwowe, zmniejsza powinowactwo podobnie jak obserwuje się to w naturalnych niedoskonale dopasowanych triadach [171].

Obecność grupy metylowej w 5-metylocytozynie zwiększa oddziaływania warstwowe z sąsiadującymi zasadami heterocyklicznymi. Obecność grupy C-5-metylowej jest prawdopodobnie źródłem efektu stabilizującego strukturę trójniciową [172, 173]. Można to tłumaczyć hiperkoniugacją grupy metylowej przyłączonej do reszty zasady heterocyklicznej lub wpływem grupy metylowej na tworzenie się indukowanego dipolu. Jednakże oddziaływania warstwowe nie dają się wytłumaczyć w jednoznaczny sposób i są prawdopodobnie sumą oddziaływań mających różne źródła.

Przykładowo, obecność grupy propynyłowej w pozycji C-5 2'-deoksyurydyny lub 2'-deoksycytydyny pozwala na zwiększenie efektu warstwowego zasady. Wiązanie nienasycone grupy propynyłowej znajduje się w tej samej płaszczyźnie, co pierścień heterocykliczny. Ponadto grupa propynyłowa jest bardziej hydrofobowa niż grupa metylowa, co w konsekwencji może zwiększyć stabilizację struktury trypleksowej [174].

1.3.1.3. Oddziaływania wodorowe Hoogsteena

Tworzenie się sieci wiązań wodorowych pomiędzy sparowanymi zasadami tworzącymi podwójną helisę kwasu nukleinowego z zasadą trzeciej nici (DNA lub RNA) zachodzi według schematu zaproponowanego przez Hoogsteena i stanowi najistotniejszy

element oddziaływań międzycząsteczkowych decydujących o powstaniu potrójnej helisy. Wiązania wodorowe typu Hoogsteena realizują się w dużej bruździe podwójnej helisy DNA albo jako wiązania według tzw. schematu normalnego albo odwróconego i zostały bardziej szczegółowo omówione wcześniej.

1.3.1.4. Schemat hydratacji

Cząsteczki wody znajdują się w dwuniciowym DNA i „uprzywilejowują” konkretne konformacje i przejścia pomiędzy nimi [175]. Dehydratacja poli(dG) : poli(dC) w obecności etyloamidu N- α -acetylo-L-argininy prowadzi do utworzenia trypleksu [176].

W przypadku trójniciowych kwasów nukleinowych cząsteczki wody mogą odgrywać znaczącą rolę w różnicowaniu stabilności trypleksów zawierających triady G*G:C i tych z A*A:T oraz T*A:T [177]. Badania schematu hydratacji następujących struktur trypleksowych: Py*Pu:Py i Pu*Pu:Py, prowadzone z wykorzystaniem NMR pokazały obecność cząsteczek wody we wszystkich rowkach trójniciowej helisy [178]. Schemat hydratacji w różnych sekwencjach DNA może posłużyć do określenia zdolności tworzenia trypleksów przez podwójną nić poli(Pu) : poli(Py). Na efekt uwodnienia wpływają sekwencje nukleotydów, jednakże dostępne dane nie dają możliwości formułowania uogólnień i reguł.

1.3.2. Wpływ poliaminooligonukleotydów na trwałość struktur dwu- i trójniciowych

Polimaniny biogenne w fizjologicznym pH obdarzone są ładunkiem dodatnim proporcjonalnym do liczby funkcji aminowych w cząsteczce. Badania trwałości struktur dwu- i trójniciowych powstałych z fragmentów kwasów nukleinowych wykazały wzrost stabilności w obecności kationów. Działanie stabilizujące rośnie ze wzrostem stężenia kationu w określonych przedziałach stężeń (patrz 1.3.1.1.), a zarazem z całkowitym ładunkiem jonu i układa się w następującym porządku: $\text{Na}^+ < \text{Mg}^{2+} < \text{spermina}^{4+}$.

Wspomniana właściwość sugerowałaby, że obecność modyfikacji poliaminowych kowalencyjnie związanych z jednostkami nukleotydowymi oligomerów może wpływać na trwałość podwójnej helisy DNA-DNA i DNA-RNA, oraz struktury trójniciowej. W literaturze opisano zarówno stabilizujący wpływ modyfikacji poliaminowych na struktury dupleksowe [62, 63, 109, 111, 119, 125, 135, 139, 140, 142–144] i trypleksowe [62, 63, 70, 71, 75, 76, 101–103, 135, 179], jak i wpływ destabilizujący dupleksy [70, 81, 89, 101, 102, 107, 136, 137] i trypleksy [136, 137, 139, 140].

Za trwałość otrzymanych kompleksów z jednostkami poliaminowymi odpowiada wiele czynników. Poza wcześniej wspomnianymi, istotna jest sama struktura reszty

poliaminowej [70, 71, 139, 140], tzn. ilość funkcji aminowych, ale również długość łańcucha alifatycznego i jego rozgałęzienie. Kolejnym czynnikiem jest położenie w jednostce nukleotydowej, czyli miejsce wiązania kowalencyjnego między nukleotydem a resztą poliaminy. Obecność modyfikacji poliaminowej nie może zakłócać oddziaływań wodorowych typu Watsona – Cricka w przypadku struktur dupleksowych, ani oddziaływań wodorowych typu Hoogsteena w przypadku trypleksów, jeśli oczekujemy stabilizującego efektu modyfikacji poliaminowej. Niekiedy dla tych samych modyfikacji poliaminonukleotydowych obserwuje się przeciwstawne efekty w odniesieniu do struktur dupleksowych i trypleksowych [101, 102, 107, 135, 139, 140]. O destabilizacji dupleksu, a stabilizacji trypleksu może decydować odmienny charakter oddziaływań wodorowych typu Watsona – Cricka i Hoogsteena.

Na trwałość trypleksów wpływa także liczba modyfikacji poliaminowych w łańcuchu oligonukleotydowym i ich wzajemne położenie [111, 136, 137, 139, 140]. Ważne jest także położenie modyfikowanego nukleotydu w łańcuchu oligonukleotydowym. Modyfikacje poliaminowe na końcu 3' lub 5' zdecydowanie bardziej stabilizują strukturę, niż umieszczone pośrodku oligomeru [62, 63, 101, 102, 107, 135–137].

1.3.3. Wpływ grupy 2'-O-metylowej na trwałość struktur dwu- i trójniciowych

Obecność grupy 2'-O-metylowej w łańcuchu oligonukleotydowym wpływa na trwałość struktury dupleksowej, jak i trypleksowej. Istotny efekt stabilizujący można zaobserwować, jeśli cały oligonukleotyd zbudowany jest z jednostek 2'-O-metylorybonukleotydowych. Wpływ pojedynczej modyfikacji 2'-O-metylowej jest znacznie słabszy albo niemożliwy do zaobserwowania. Można to tłumaczyć tym, iż modyfikacja 2'-O-metylowa wpływa na preferowaną konformację reszty cukrowej. W przypadku, gdy modyfikowany jest cały łańcuch oligonukleotydowy jego struktura przestrzenna znacznie różni się od struktury DNA. Właśnie struktura ma decydujący wpływ na tworzenie i stabilność kompleksów kwasów nukleinowych. I tak na przykład, najtrwalsze dupleksy powstają, jeśli oba łańcuchy są 2'-O-metylorubooligonukleotydami [52]. W strukturach trypleksowych wpływ obecności modyfikacji 2'-O-metylowej jest również uwarunkowany innymi elementami powstałej struktury, tj. udziałem oligorybonukleotydów i oligodeoksyrybonukleotydów tworzonych kompleksach [180].

2. CEL PRACY

W ostatnich latach dużo uwagi poświęcono modyfikacjom kwasów nukleinowych za pomocą biogennych poliamin. Zainteresowania te wynikają z kilku powodów. Klasa związków, do której należą putrescyna, spermidyna i spermina wchodzi w skład licznej rodziny produktów naturalnych. Poliaminy występują we wszystkich typach komórek [160]. Dzięki swojemu polikationowemu charakterowi poliaminy oddziałują między innymi z kwasami nukleinowymi i białkami [160, 181, 182]. Obecność sperminy wpływa na trwałość dupleksowych i trypleksowych struktur kwasów nukleinowych poprzez tworzenie między innymi wiązań wodorowych i oddziaływania elektrostatyczne.

Odkrycie szerokiego rozpowszechnienia 2'-*O*-metylorybonukleotydów w RNA pod koniec lat pięćdziesiątych zainicjowało prace syntetyczne. Obecnie 2'-*O*-metylorybooligonukleoty znalazły zastosowanie między innymi w badaniach dotyczących składania mRNA [8], spliceosomów [9] oraz w przygotowaniu odpornych na nukleazy rybozymów typu „głowy młotka” [10]. Rozważa się, również zastosowanie 2'-*O*-metylorybooligonukleotydów w terapii antysensowej i antygenowej.

Biorąc po uwagę właściwości poliamin i 2'-*O*-metylorybonukleotydów interesujące wydają się oligonukleotydy zawierające kowalencyjnie przyłączoną poliaminę i metylowaną funkcję 2'-hydroksylową.

Zastosowanie poliaminooligonukleotydów np.: w terapii antysensowej i antygenowej wymaga przeprowadzenia licznych badań, między innymi: trawień enzymatycznych i pomiaru trwałości termodynamicznej kompleksów zawierających jednostki poliaminonukleotydowe.

Cele niniejszej rozprawy doktorskiej obejmowały:

- ↳ opracowanie syntezy poliamino-2'-*O*-metylonukleozydów i ich 3'-amidofosforynów pochodnych adenozyiny i cytydiny, oraz ich charakterystykę za pomocą analizy NMR i MS;

- ↪ optymalizację syntezy poliamino-2'-deoksynukleozydów i ich 3'-amidofosforynów dla wszystkich czterech 2'-deoksynukleozydów badanych wcześniej w IChB PAN [183];
- ↪ otrzymanie poliaminooligonukleotydów, zarówno w serii DNA, jak i 2'-*O*-metylo RNA metodą amidofosforynową podczas automatycznej syntezy DNA;
- ↪ badanie wpływu modyfikacji poliaminowej na trwałość wiązania fosfodiesterowego w serii DNA w reakcji enzymatycznej hydrolizy z udziałem egzonukleazy trawiącej od końca 5', jak i egzonukleazy trawiącej od 3' końca;
- ↪ badanie trwałości struktur dwuniciowych utworzonych z udziałem poliamino-2'-deoksyoligonukleotydów, które były wcześniej badane metodami chemii kombinatorycznej z wykorzystaniem spermino-2'-deoksycytydyny [108, 183], określenie wpływu liczby modyfikacji poliaminowych na trwałość struktury dwuniciowej;
- ↪ analiza trwałości struktur trypleksowych DNA z wykorzystaniem oligonukleotydów i poliamino-2'-deoksyoligonukleotydów; zastosowane sekwencje oligonukleotydowe zostały wcześniej wyselekcjonowane metodami chemii kombinatorycznej [184, 185] jako oddziałujące z sekwencją DNA promotora ludzkiego genu receptora epidermalnego czynnika wzrostu (HER2) [186].

3. BADANIA WŁASNE

3.1. Synteza 3'-amidofosforynów poliamino-2'-O-metylorybonukleozydów i poliamino-2'-deoksyrybonukleozydów

3.1.1. Prekursory poliamino-2'-O-metylorybonukleozydów A,C

3.1.1.1. Synteza prekursora poliamino-2'-O-metyloadenozyny

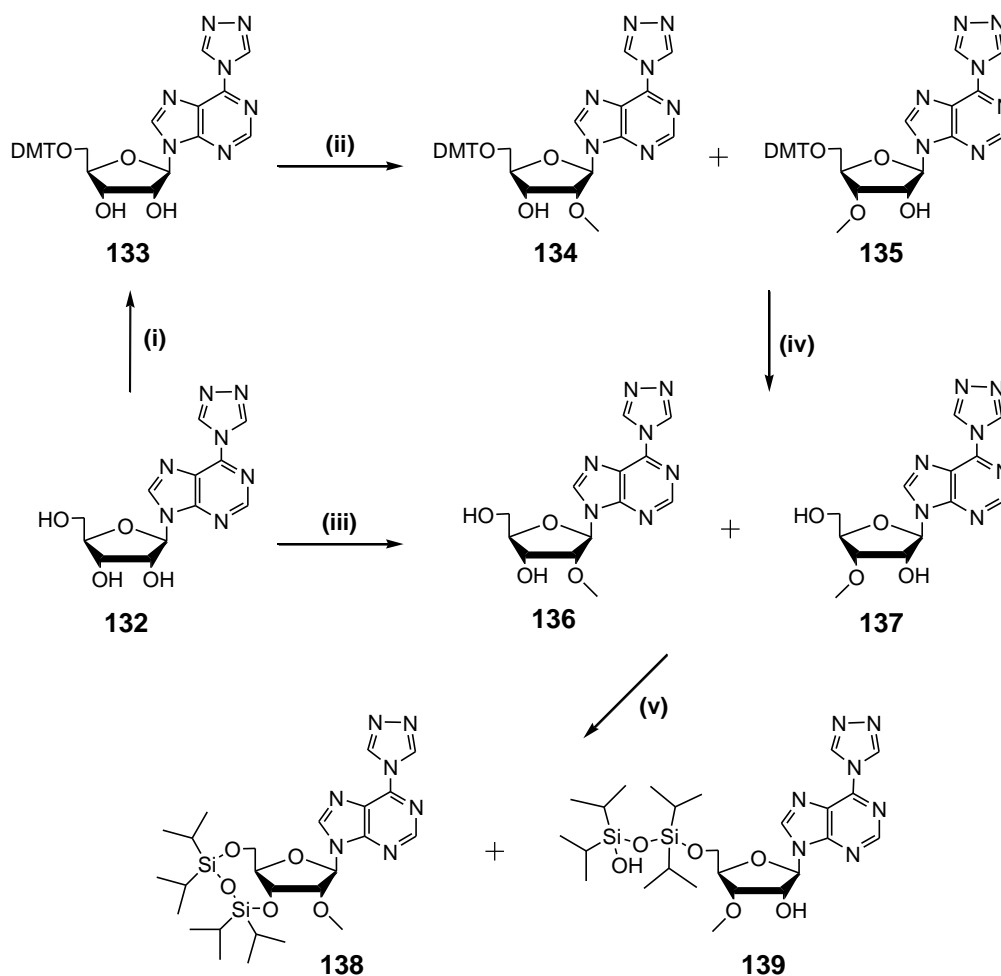
Z prac opublikowanych przez Chattopadhyaya'ę [44] i Pfeleiderera [45] wynika, że wprowadzenie blokady na funkcję egzoaminową adenozyny, z jednoczesnym blokowaniem pozycji 5'-OH grupą trytylową znacznie zwiększa wydajność reakcji metylowania funkcji 2'-hydroksylowej diazometanem w 1,2-dimetoksyetanie (DME) w obecności katalizatora $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$. Wprowadzona grupa trytylowa ułatwia oczyszczenie monometylowych pochodnych na kolumnie chromatograficznej w roztworze toluenu i octanu etylu.

W badaniach prowadzonych w Pracowni Chemii Biokoniugatów IChB PAN zastosowano z powodzeniem 9-[5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksy- β -D-erythro-pentofuranozylo]-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)purynę do otrzymywania pochodnej poliamino-2'-deoksyadenozyny [92, 93]. Z tego względu postanowiłam jako prekursor poliamino-2'-O-metyloadenozyny również wykorzystać triazolową pochodną 2'-O-metyloadenozyny (**134**).

W tym celu wychodząc z adenozyny otrzymałam triazolową pochodną **132** [181, 182], którą następnie dimetoksytrytylowałam otrzymując **133**. W pierwszej kolejności 9-[5-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)- β -D-erythro-pentofuranozylo]-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)purynę (**133**) poddałam reakcji metylowania (schemat 22). Reakcję prowadziłam w temperaturze 0 °C. Analiza TLC wykazała całkowite przereagowanie substratu ($R_f(\text{A}) = 0,48$). Na podstawie analizy $^1\text{H NMR}$, stosunek powstałych 2'- do 3'-O-metylowych pochodnych **134** i **135** określiłam jako 2 : 1. Niestety na tym etapie nie udało się wydajnie rozdzielić izomerów 2'- i 3'-O-metylowych na kolumnie chromatograficznej.

W związku z tym postanowiłam użyć jako substrat w reakcji metylowania wcześniej otrzymaną nieblokowaną 9-(β -D-erythro-pentofuranozylo)-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)purynę (**132**) [181, 182]. Reakcję metylowania prowadziłam w pirydynie w temperaturze pokojowej.

Stosunek produktów 2'- do 3'-*O*-metylowych, odpowiednio **136** i **137**, w mieszaninie reakcyjnej określony na podstawie analizy $^1\text{H NMR}$ wyniósł tylko 1 do 3. Po zatężeniu i trzykrotnym odparowaniu z pirydyną pozostałość poddałam reakcji z 1,3-dichloro-1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksanem (TIPDSiCl₂) [21]. Grupa TIPDSi w przypadku 2'-*O*-metylowanego izomery **136** została przyłączona do funkcji 5'- i 3'-hydroksylowych (**138**), natomiast w pochodnej 3'-*O*-metylowanej **137** silylowaniu uległa tylko pozycja 5'-OH **139**.



Schemat 22. Metylowanie triazolowych pochodnych adenozy i wyizolowanie izomerów 2'- i 3'-*O*-metylowych: (i) DMTC1 (1,1 ekw.), pirydyna; (ii) roztwór CH₂N₂ w DME, SnCl₂×H₂O (0,088 ekw.), CH₂Cl₂, temp. pokojowa, 20 min.; (iii) roztwór CH₂N₂ w DME (9,7 ekw.), SnCl₂×H₂O (0,088 ekw.), pirydyna, temp. pokojowa, 1 godz.; (iv) 2% CHCl₂COOH w CH₂Cl₂, 5 min.; (v) TIPDSiCl₂ (1,2 ekw.), pirydyna, 2 godz.

Otrzymane związki **138** i **139** początkowo próbowałam rozdzielić za pomocą chromatografii kolumnowej wymywając mieszaniną chlorku metylenu i metanolu. Czyste produkty rozdzielałam na kolumnie chromatograficznej w tzw. fazie odwróconej, przy zastosowaniu roztworu acetonitrylu i wody. Produkt **138** został wyizolowany z wydajnością

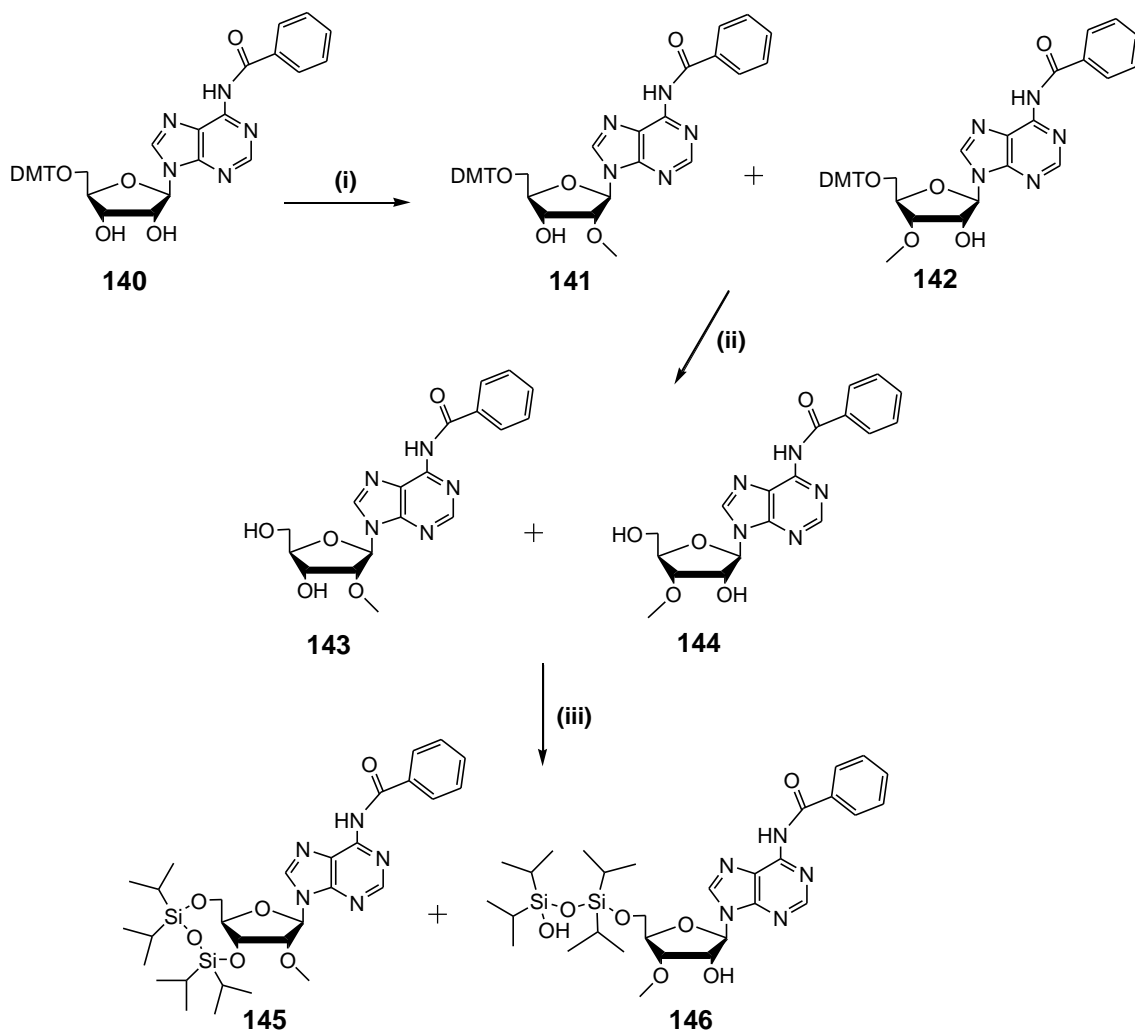
14% (sumaryczna wydajność reakcji metylowania i przyłączenia grupy TIPDSi). Wydajność całkowita **138** z adenozyiny wynosiła 12%. Struktury otrzymanych związków **138** i **139** potwierdziłam za pomocą analizy NMR.

Niska wydajność sumaryczna syntezy pochodnej **138** skłoniła mnie do ponownego zainteresowania się związkiem **133** zawierającym grupę dimetoksytrytylową, jako substratem do metylowania. Reakcję metylowania prowadziłam w CH₂Cl₂ w temperaturze pokojowej. Stosunek powstałych pochodnych 2'- do 3'-*O*-metylowych (**134** i **135**) określony na podstawie analizy ¹H NMR wynosił 2 : 1. Po odparowaniu rozpuszczalników pozostałość odtrytylowałam 4% kwasem dichlorooctowym w CH₂Cl₂. Mieszaninę nukleozydów poddałam reakcji z TIPDSiCl₂, a następnie wyizolowałam **138** z wydajnością 15% (z **133**). Całkowita wydajność z adenozyiny wynosiła 12%. Widma NMR związków **138** i **139** były identyczne z wcześniej otrzymanymi.

Ze względu na niskie wydajności reakcji i pracochłonność (wiele etapów) syntezy odrzuciłam obie metody otrzymywania prekursora **134**.

W kolejnym podejściu powróciłam do procedury opisanej w literaturze [44]. Do reakcji metylowania użyłam 6-*N*-benzoilo-5'-(4,4'-dimetoksytrytylo)adenozyiny (**140**). Stosunek powstałych izomerów 2'- do 3'-*O*-metylowych **141** i **142** określony na podstawie analizy ¹H NMR wynosił 1 : 1. Reakcja była prowadzona w CH₂Cl₂ w temperaturze pokojowej. Następnie odblokowałam funkcję 5'-hydroksylową 2% kwasem dichlorooctowym. Po wstępnym oczyszczeniu, mieszaninę izomerów poddałam reakcji z TIPDSiCl₂. Związek **145** otrzymałam z **140** z wydajnością 26% (sumaryczna wydajność **145** z adenozyiny wynosiła 21%) (schemat 23). Struktury pochodnych 2'-*O*-metylowej **145** i 3'-*O*-metylowej **156** potwierdziłam analizą ¹H NMR i MS ES. Odstąpiłam od powyższej metody metylowania, ponieważ związek **145** wymagałby odblokowania i wprowadzenia pierścienia triazolowego w pozycji C-6 zasady heterocyklicznej. Zwiększyłoby to liczbę etapów i obniżyło całkowitą wydajność.

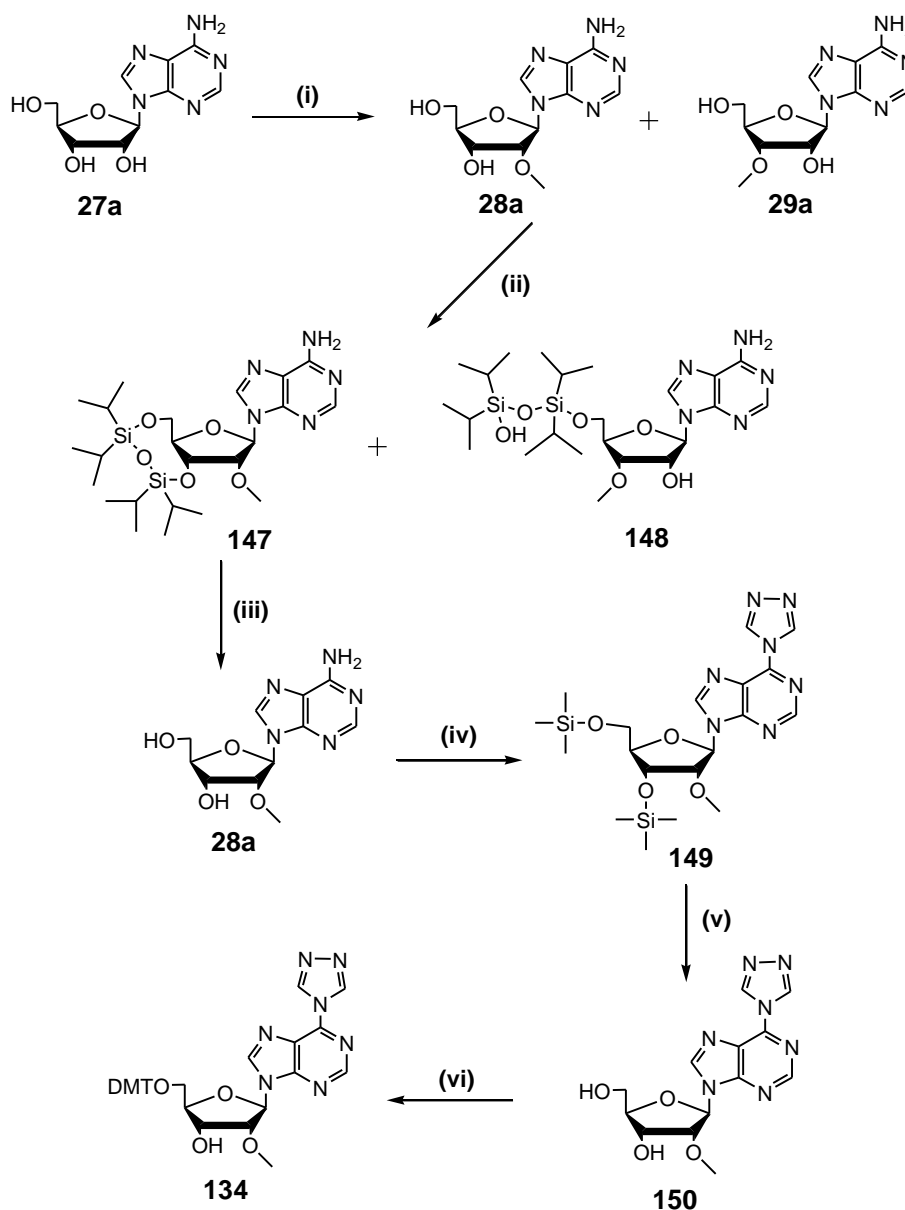
Ostatecznie syntezę prekursora poliamino-2'-*O*-metyloadenozyiny oparłam na bezpośrednim metylowaniu adenozyiny diazometanem w DME w obecności 0,088 ekw. SnCl₂×2H₂O (schemat 24) [39]. Początkowo użyłam w reakcji metylowania jako rozpuszczalnik metanol, ale z racji słabej rozpuszczalności w nim krystalicznej adenozyiny metylowanie nie zachodziło. Natomiast, gdy adenozyinę rozpuściłam w pirydynie i następnie roztwór zatężyłam otrzymując olej, który później rozpuściłam w metanolu z małą ilością pirydyny (0,5% obj.) reakcja metylowania diazometanem wobec SnCl₂×2H₂O zachodziła bez problemów. Analiza TLC wykazała całkowite przereagowanie substratu.



Schemat 23. Metylowanie benzoilowej pochodnej adenozyiny i wyizolowanie izomerów 2'- i 3'-*O*-metylowych: (i) roztwór CH_2N_2 w DME, $\text{SnCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (0,088 ekw.), CH_2Cl_2 , temp. pokojowa, 20 min.; (ii) 2% CHCl_2COOH w CH_2Cl_2 , 5 min.; (iii) TIPDSiCl_2 (1,2 ekw.), pirydyna, 2 godz.

Reakcja przebiegała w temperaturze pokojowej. Po 1 godzinie odparowałam rozpuszczalniki. Otrzymałam zielonobrunatny olej, w skład którego wchodziły: 2'-*O*-metyloadenozyina **28a** i 3'-*O*-metyloadenozyina **29a**. Na podstawie analizy $^1\text{H NMR}$ stwierdziłam, że pochodne 2'- i 3'-*O*-metyłowe powstały w proporcji 4 do 5. W celu rozdzielenia izomerów, otrzymany olej trzykrotnie odparowałam z bezwodną pirydyną i poddałam reakcji z TIPDSiCl_2 . Po 2 godzinach reakcję silylowania zakończyłam, a jej produkty oczyściłam za pomocą kolumnowej chromatografii w tzw. fazie odwróconej (silanizowany żel krzemionkowy). W pierwszej kolejności wyizolowałam pochodną 3'-*O*-metylową **148**, a następnie produkt **147**. Otrzymałam związek **147** w postaci białego proszku z wydajnością 41%. Struktury produktów **147** i **148** potwierdziłam analizą $^1\text{H NMR}$.

Dodatkowo dla **147** wykonałam widmo spektrometrii mas MS ES. Zastosowanie blokady TIPDSi umożliwiło rozdzielenie i oczyszczenie produktów metylowania.



Schemat 24. Synteza prekursora poliamino-2'-*O*-metyloadenozy: (i) roztwór CH₂N₂ w DME (22 ekw.), SnCl₂×H₂O (0,5 ekw.), MeOH z 0,5% pirydyny, temp. pokojowa, 1 godz.; (ii) TIPDSiCl₂ (1,5 ekw.), pirydyna, temp. pokojowa, 2 godz., całkowita wyd.: 41% izomeru 2'-*O*-metylowego; (iii) 32% NH₃ / pirydyna (2:1), 70°C, 72 godz.; (iv) TMSCl (2 ekw.), 1,2-bis[(dimetyloamino)metyleno]hydrazyna (3,9 ekw.), pirydyna, 100°C, 24 godz.; (v) MeOH, przez noc, wyd. po (iii)-(v): 38%; (vi) DMTCl (1,1 ekw.), 3 godz., wyd.: 87%.

W kolejnym etapie zamierzałam otrzymać pochodną triazolową **150**. Do tego celu mogłam wykorzystać związek **147**, ponieważ podczas reakcji pochodnej adenozy z 1,2-bis[(dimetyloamino)metyleno]hydrazyną muszą być chronione funkcje hydroksylowe pierścienia rybozy. Gdyby na etapie wprowadzenia grupy triazolowej pozostawić grupę

TIPDSi i otrzymać związek **138**, to następnie należałoby do usunięcia TIPDSi użyć odczynnika z jonami fluorkowymi. Przerób mieszaniny po odblokowaniu byłby wówczas bardziej skomplikowany niż to ma miejsce wtedy, gdy do usunięcia posłużyć się roztworem NH_3 w wodnej pirydynie. Z kolei użycie tego ostatniego czynnika odblokowującego w przypadku pochodnej **138** doprowadziłoby do substytucji podstawnika C-6-triazolowego i powstania 2'-*O*-metyloadenozyny, a więc „przedwczesnego” przereagowania otrzymanego prekursora poliamino-2'-*O*-metyloadenozyny. Dlatego najpierw odblokowałam funkcje 3'- i 5'-hydroksylowe związku **147** w reakcji ze stężonym amoniakiem w pirydynie (1 : 2). Reakcję prowadziłam w szczelnie zamkniętym naczyniu w suszarce nastawionej na 70°C przez trzy dni.

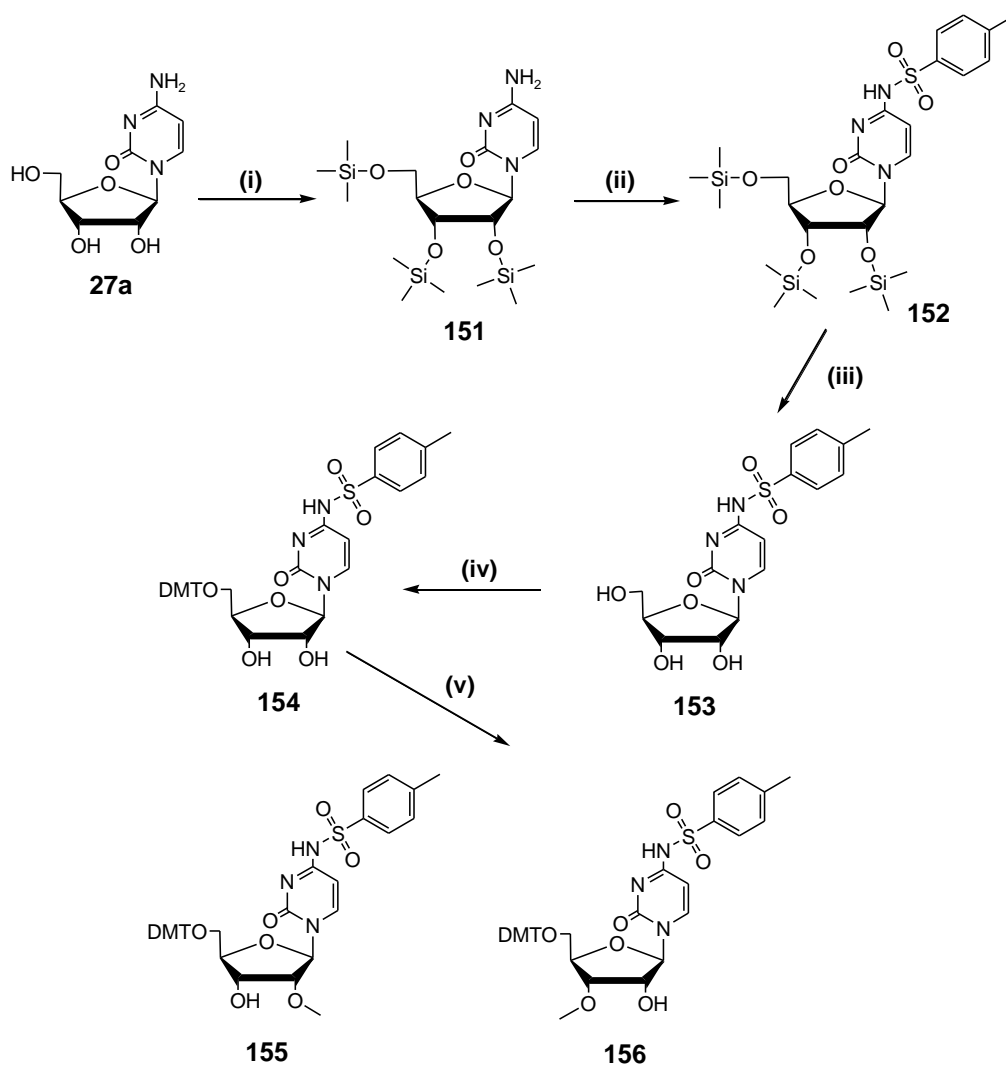
Wprowadzenie grupy triazolowej do nieoczyszczonego związku **28a** przeprowadziłam analogicznie do wcześniej opisanych reakcji dla adenozyny i 2'-deoksyadenozyny [181, 182]. Surową 2'-*O*-metyloadenozynę (**28a**) ogrzewałam w temp. 100°C pod chłodnicą zwrotną z 4 ekw. 1,2-bis[(dimetylo-amino)metyleno]hydrazyny i 2 ekw. TMSCl . W pierwszej kolejności dochodzi do ochrony funkcji hydroksylowych grupami trimetylosililowymi. Po 24 godzinach, biorąc pod uwagę możliwość odsililowania grup hydroksylowych dodałam kolejną porcję TMSCl . Po zagęszczeniu pod próżnią mieszaniny poreakcyjnej pozostałość odparowałam z toluenem i podzieliłam między chlorek metylenu, a mieszaninę nasyconych wodnych roztworów NaHCO_3 i NaCl . Warstwę organiczną dwukrotnie przemyłam mieszaniną wodnych roztworów: nasyconego NaCl i 1 M HCl . Zastosowane zabiegi tj. usunięcie pirydyny, obecność solanki i kwasu solnego podczas przerobu w niskiej temperaturze, schłodzenie roztworów ekstrahujących do ok. 5°C, miały na celu zmniejszenie rozpuszczalności produktu w warstwie wodnej i oddzielenie nadmiaru diazyny w postaci soli (dichlorowoderek diazyny). Pochodna **150** wykryła z metanolu z wydajnością 38%. Strukturę otrzymanego związku potwierdziłam analizą $^1\text{H NMR}$ i MS ES .

W ostatnim etapie przeprowadziłam typową reakcję dimetoksytrytylowania pozycji 5'-OH **150** z wydajnością 98%. Strukturę **134** potwierdziłam analizą $^1\text{H NMR}$ i MS ES .

3.1.1.2. Synteza prekursora poliamino-2'-*O*-metylocytydyny

W syntezie pochodnej poliamino-2'-deoksycytydyny został użyty z powodzeniem prekursor: 4-*N-p*-toluenosulfonylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydyna [108]. Jako prekursor poliamino-2'-*O*-metylocytydyny zdecydowałam się na analogiczną pochodną, 4-*N-p*-toluenosulfonylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-*O*-metylocytydynę (**156**).

Początkowo syntezę prekursora poliamino-2'-*O*-metylocytydyny planowałam oprzeć na pochodnej 4-*N*-*p*-toluenosulfonylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyny **154** [97, 187], a następnie metylowaniu diazometanem w 1,2-dimetoksyetanie w obecności katalizatora $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (schemat 25). Z doniesień literaturowych wynikało [44, 45], że wprowadzenie grupy 4,4'-dimetoksytrytylowej lub 4-monometoksytrytylowej dla ochrony funkcji 5'-hydroksylowej oraz wprowadzenie blokady na funkcję egzoaminową powoduje wzrost wydajności syntezy pochodnej 2'-*O*-metylowej względem 3'-izomeru. Obecność grupy trytylowej miała ułatwić oczyszczenie otrzymanych izomerów na kolumnie chromatograficznej przy zastosowaniu mieszaniny toluenu i octanu etylu jako eluentu. W tym celu, wychodząc z cytydyny (**27b**), otrzymałam 4-*N*-*p*-toluenosulfonylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynę (**154**) ($R_f(\text{A}) = 0,55$).

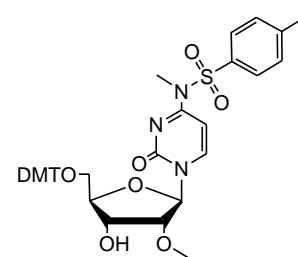
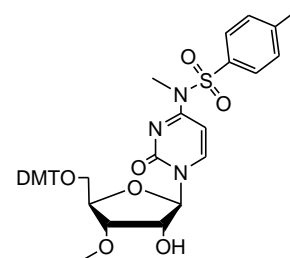


Schemat 25. Próba otrzymywania prekursora poliamino-2'-*O*-metylocytydyny: (i) TMSCl (6 ekw.), pirydyna, 1 godz.; (ii) chlorek *p*-toluenosulfonylowy (2 ekw.), pirydyna, 60°C, 20 godz.; (iii) 32% NH_3 - pirydyna (1:1), 2,5 godz.; (iv) DMTCI (1,1 ekw.), pirydyna, 2,5 godz.; (v) roztwór CH_2N_2 w DME (2,5 ekw.), $\text{SnCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (0,044 ekw.), acetonitryl, temp. 0°C, 25 min.

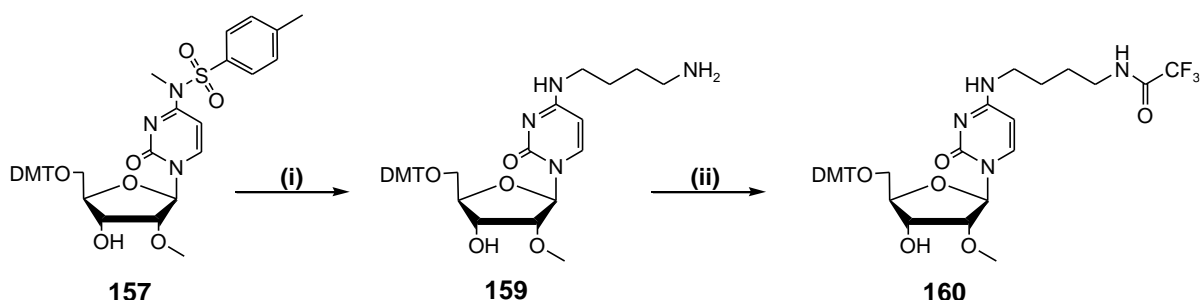
Przygotowaną pochodną **154** (0,14 mmola) poddałam reakcji metylowania. Związek **154** rozpuściłam w acetonitrylu i dodałam $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0,044 ekw.). Otrzymany roztwór schłodziłam do temp. 0°C i do naczynia reakcyjnego wstrzyknęłam roztwór diazometanu w DME (teoretycznie 2,5 ekw.) tak, aby temperatura nie przekroczyła 0°C . Analiza TLC wykazała całkowite przereagowanie substratu. Otrzymałam izomer 2'-*O*-metylowy ($R_f(\text{D}) = 0,50$) oraz pochodną 3'-*O*-metylową ($R_f(\text{D}) = 0,33$). Stosunek izomerów 2' do 3' określony na podstawie analizy ^1H NMR wynosił 4 : 1. Zmiana rozpuszczalnika reakcji na CH_2Cl_2 nie wpłynęła na wydajności izomerów 2' i 3'. Przy powtarzaniu powyższej reakcji, podczas oczyszczania mieszaniny reakcyjnej na kolumnie chromatograficznej, otrzymywałam izomer 2'-*O*-metylowy o różnej czystości. Do wmywania stosowałam mieszaninę toluenu i octanu etylu.

Kiedy prowadziłam reakcję w tych samych warunkach w skali 1,4 mmola zaobserwowałam tworzenie się dodatkowych produktów metylowania. Otrzymałam pochodne dimetylowe. Doszłam do wniosku, że prawdopodobnie poza metylowaniem jednej funkcji hydroksylowej, również mógł ulec metylowaniu atom azotu grupy egzoaminowej dając pochodne 4-*N*-metylo-4-*N*-*p*-toluenosulfonylowe 2'-*O*-metylo lub 3'-*O*-metylocytydyny. Analiza związków **157** ($R_f(\text{D}) = 0,66$) i **158** ($R_f(\text{D}) = 0,57$) za pomocą ^1H NMR potwierdziła to przypuszczenie. W mieszaninie reakcyjnej stosunek otrzymanych produktów **155**, **157**, **156**, **158** wynosił 30:35:4:13 na podstawie analizy NMR. Struktury związków **155**, **157**, **156**, **158**, po oczyszczeniu chromatograficznym (mieszanina toluenu i octanu etylu), potwierdziła analiza ^1H NMR.

Oczyszczony związek **157** poddałam reakcji z dziesięciokrotnym nadmiarem putrescyny w celu sprawdzenia przydatności do syntezy poliamino-2'-*O*-metylocytydyny (schemat 26). Reakcję prowadziłam w temp. 70°C przez 17 godzin. W wyniku ataku nukleofilowego grupy aminowej putrescyny jej funkcja aminowa została przyłączona do atomu węgla C-4. Surowy związek **159** poddałam reakcji z bezwodnikiem kwasu trifluorooctowego w pirydynie, aby zablokować funkcję aminową wprowadzonej reszty putrescyny. Analiza widma ^1H NMR potwierdziła strukturę otrzymanego związku **160**. Na podstawie uzyskanego widma, poza grupą 2'-*O*-metylową, nie stwierdziłam obecności dodatkowej grupy metylowej w cząsteczce, co wykluczało

**157****158**

metylowanie np. pozycji N-3 w substracie **157**. Dlatego pochodna **157** mogła być wykorzystana jako prekursor poliamino-2'-*O*-metylocytydyny.



Schemat 26. Reakcja dimetylowanej pochodnej cytozyny z putrescyną: (i) putrescyna (10 ekw.), pirydyna, temp. 70°C, 17 godz.; (ii) (CF₃CO)₂O (3 ekw.), pirydyna, 20 min.

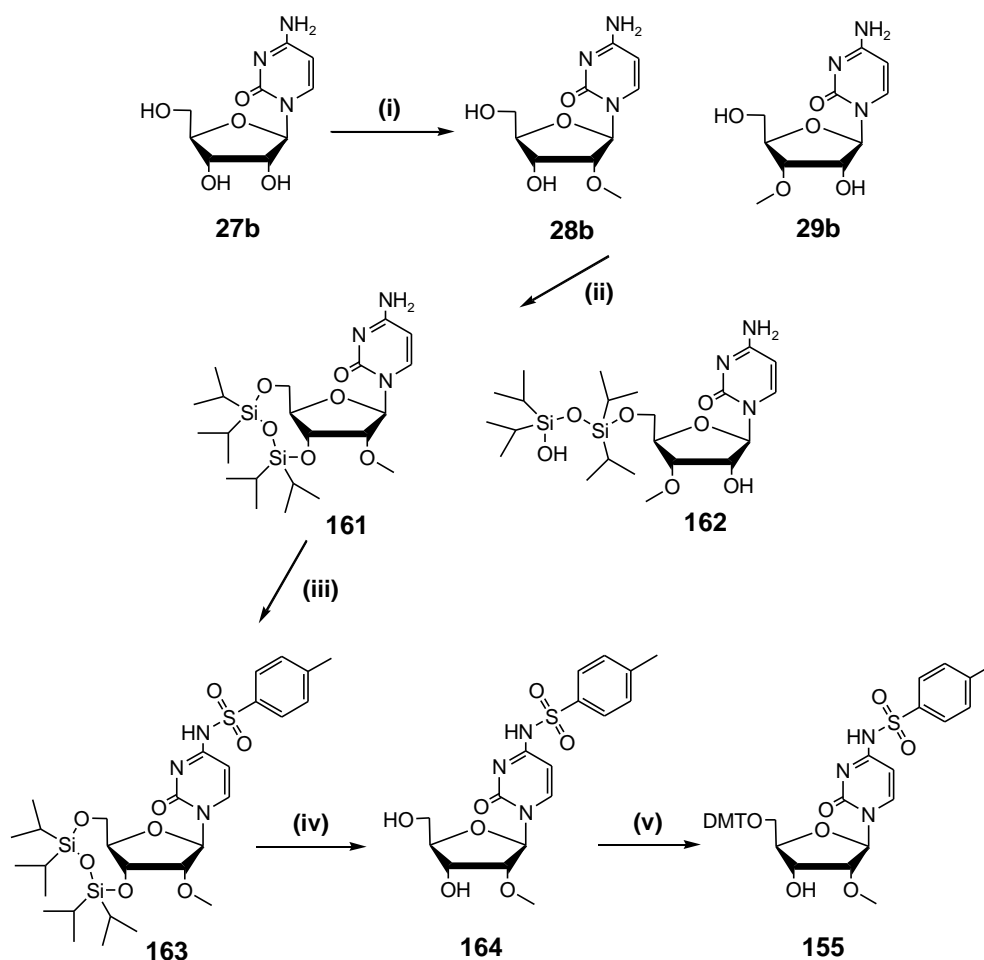
Wspomnianą metodę otrzymywania prekursora poliamino-2'-*O*-metylocytydyny mimo wszystko odrzuciłam ze względu na przypadkowość uzyskania czystych pochodnych 2'-*O*-metylowych z dobrymi wydajnościami. Trudności te wynikają z bardzo zbliżonych wartości R_f otrzymanych produktów **157**, **158**, **155**, **156** odpowiednio R_f(D) wynoszą 0,66; 0,57; 0,49; 0,33 i naprzemiennego migrowania pochodnych 2'- i 3'-*O*-metylowych. W konsekwencji utrudniają uzyskanie czystych izomerów na etapie oczyszczania chromatograficznego.

Kolejnym substratem, który postanowiłam wykorzystać w reakcji metylowania była 4-*N*-benzoilo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyna. Pochodna ta była wcześniej wykorzystana w reakcji metylowania diazometanem w obecności SnCl₂×2H₂O przez Chattopadhyaya'ę i współpracowników [44]. Na podstawie analizy NMR mieszaniny reakcyjnej stosunek otrzymanych izomerów 2' i 3'-*O*-metylowych wynosił 3 : 2. Niestety, podobnie jak miało to miejsce w przypadku pochodnych adenozyne, nie udało mi się otrzymać czystych izomerów z dobrymi wydajnościami. Do oczyszczania na kolumnie chromatograficznej wykorzystywałam jako eluent mieszaninę toluenu i octanu etylu, tak jak to opisano w literaturze [45].

Ostatecznie syntezę prekursora poliamino-2'-*O*-metylocytydyny oparłam na metylowaniu cytydyny, a następnie wprowadzeniu grupy *p*-toluenosulfonowej do „aktywacji” funkcji egzaminowej, a grupy dimetoksytrytylowej do blokowania pozycji 5'-OH (schemat 27).

Cytydynę (**27b**) rozpuściłam częściowo w metanolu i poddałam metylowaniu diazometanem w DME w obecności katalizatora, jakim jest SnCl₂×2H₂O [39, 40]. Reakcję

początkowo prowadziłam w temp. 0 °C. Analiza TLC pokazywała niewielki stopień przereagowania substratu. Po ogrzaniu mieszaniny reakcyjnej do temperatury pokojowej mogłam stwierdzić na podstawie analizy TLC, że reakcja zaszła prawie całkowicie. Początkowo związek **28b** zamierzałam oczyścić przez krystalizację z etanolu [40], ale że reakcja metylowania nie zaszła ilościowo, otrzymane kryształy zawierały zarówno 2'-*O*-metylocytydynam, jak i śladowe ilości cytydynam (ok. 3–5% na podstawie analizy TLC), zaniechałam krystalizacji.



Schemat 27. Synteza prekursora poliamino-2'-*O*-metylocytydynam: roztwór CH₂N₂ w DME (11 ekw.), SnCl₂×H₂O (0,088 ekw.), MeOH, temp. pokojowa, 20 min; (ii) TIPDSiCl₂ (1,1 ekw.), pirydyna, temp. pokojowa, 2 godz., całkowita wyd.: 66% 2'-*O*-metylowanego izomeru; (iii) chlorek *p*-toluenosulfonowy (2 ekw.), pirydyna, 70°C, przez noc; (iv) 40% HF / pirydyna (1:4), 1 godz.; (v) DMTCI (1,1 ekw.), pirydyna, 2,5 godz. całkowita wyd.: 67%.

Ze względu na małą skuteczność (praco- i czasochłonność) oczyszczania chromatograficznego izomerów postanowiłam ułatwić oczyszczanie stosując „czasową” ochronną grupę TIPDSi. Na tym etapie pozostałość po zateżeniu i trzykrotnym odparowaniu z bezwodną pirydyną poddałam reakcji z TIPDSiCl₂ (1 ekw.). Grupa TIPDSi w przypadku

izomeru 2'-*O*-metylowego została przyłączona do funkcji 5'- i 3'-hydroksylowych, natomiast w pochodnej 3'-*O*-metylowanej silylowaniu ulega tylko pozycja 5'-OH. Otrzymane produkty znacznie różniły się współczynnikami R_f tj. $R_f(A) = 0,48$ i $R_f(A) = 0,30$. Wykorzystanie odczynnika Markiewicza umożliwiło mi oczyszczenie 3',5'-*O*-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-2'-*O*-metylocytydyny (**161**) przez wymycie roztworem 1,5 do 6% metanolu w chlorku metylenu. Całkowita wydajność metylowania i silylowania **161** wynosiła 66%.

W następnym etapie syntezy wykorzystałam obecność blokady silylowej. Związek **161** poddałam bezpośrednio reakcji z chlorkiem *p*-toluenosulfonowym w temp. 70°C przez noc. Analiza TLC wykazała zakończenie reakcji. Po typowym przerobie ($\text{NaHCO}_{3\text{aq}}$ / CH_2Cl_2) otrzymaną surową 4-*N-p*-toluenosulfonylo-3',5'-*O*-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-2'-*O*-metylocytydynam (**163**) poddałam odsilylowaniu. Strukturę wcześniej oczyszczonej pochodnej **163** potwierdziłam stosując NMR i spektrometrię mas FAB MS. Do reakcji hydrolizy grupy TIPDSi użyłam wcześniej przygotowaną mieszaninę 40% HF_{aq} i pirydyny (1 : 4). Po ponad godzinie na podstawie analizy TLC stwierdziłam, że reakcja odsilylowania zaszła do końca.

W ostatnim etapie otrzymaną surową 4-*N-p*-toluenosulfonylo-2'-*O*-metylocytydynam (**164**), której strukturę potwierdziła spektrometria mas, poddałam reakcji z chlorkiem 4,4'-dimetoksytrytylowym. Czystą 4-*N-p*-toluenosulfonylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-*O*-metylocytydynam (**155**) otrzymałam w wyniku oczyszczania na kolumnie chromatograficznej z wydajnością 67% z **161**. Sumaryczna wydajność z cytydyny wynosiła 44%. Strukturę związku **155** potwierdziłam za pomocą NMR i MS.

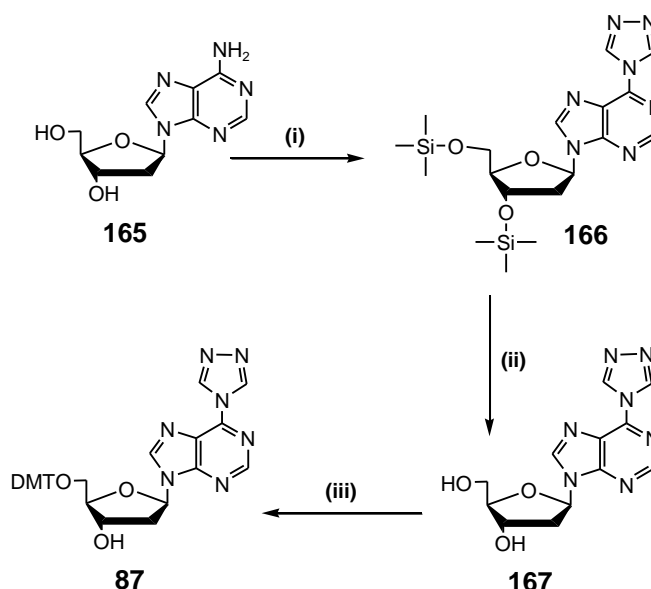
3.1.2. Prekursory poliamino-2'-deoksynukleozydów A,C,G,T

3.1.2.1. Synteza prekursora poliamino-2'-deoksyadenozyny

Jako prekursor poliamino-2'-deoksyadenozyny wykorzystałam 9-[5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksy- β -D-erythro-pentofuranozylo]-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)purynę (**87**) [92, 93]. W pierwszym etapie otrzymałam pochodną triazolową 2'-deoksyadenozyny **167** (schemat 28) [181, 182]. 2'-Deoksyadenozynam poddałam reakcji z prawie czterokrotnym nadmiarem 1,2-bis[(dimetyloamino)metyleno]hydrazyny w obecności TMSCl (2 ekw.). Reakcję prowadziłam w temp. 100 °C pod chłodnicą zwrotną przez 24 godz. Najpierw ulegają silylowaniu funkcje hydroksylowe rybozy, a wytworzony chlorowódor tworzy z częścią diazyny sól (dichlorowodorek).

Podczas reakcji cyklizacji z udziałem pochodnej hydrazyny dochodzić może do częściowego odsilylowania funkcji hydroksylowych rybozy. Dlatego po zakończonej reakcji

cyklizacji dodałam kolejną porcję TMSCl (1,3 ekw.), aby w czasie przerobu nie utracić porcji produktu, która częściowo uległa hydrolizie. Po 20 min. mieszaninę reakcyjną zatężyłam i odparowałam z toluenem usuwając śladowe ilości pirydyny. Aby zmniejszyć rozpuszczalność produktu w warstwie wodnej, poza wcześniejszym usunięciem pirydyny, podczas standartowego przerobu ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{NaHCO}_3$), wykorzystywałam roztwór solanki i przerób wykonywałam w niskiej temperaturze. W celu pozbycia się nadmiaru diazyny dodatkowo do przemycia użyłam roztwór kwasu solnego w obecności NaCl. W kolejnym etapie syntezy zdjęłam grupy TMS z funkcji hydroksylowych. Oleistą pozostałość po odparowaniu rozpuściłam w metanolu, w którym nastąpiło odsililowanie, i pozostawiłam do krystalizacji produktu. Otrzymałam związek **167** z wydajnością 77%.



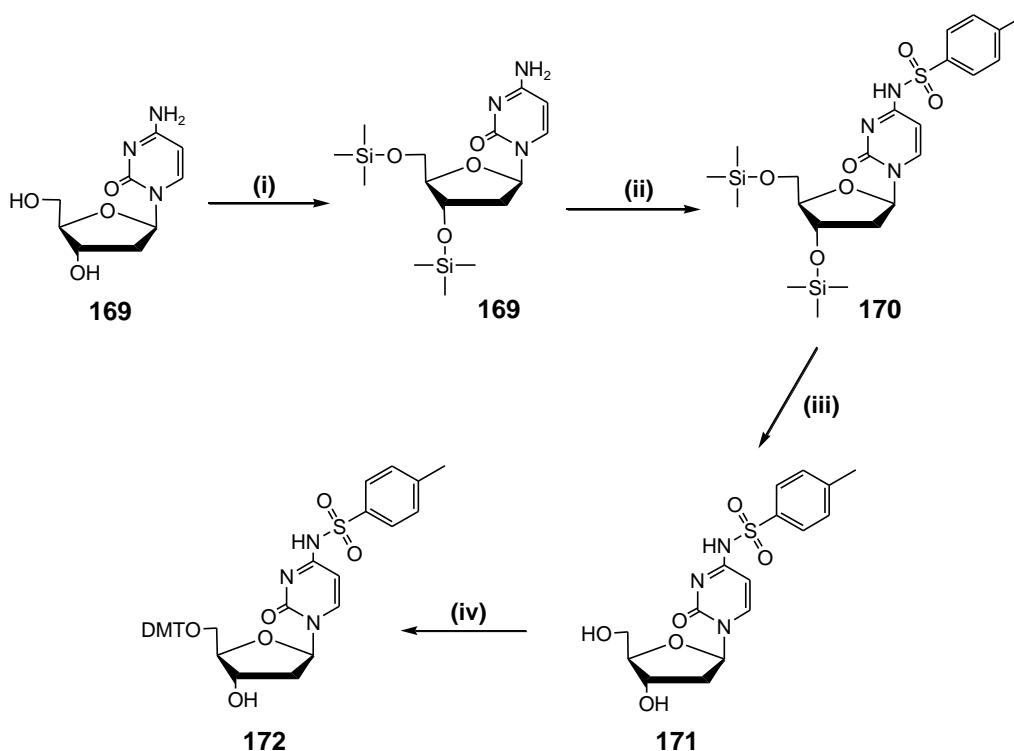
Schemat 28. Synteza prekursora poliamino-2'-deoksyadenozyny: (i) TMSCl (2 ekw.), 1,2-bis[(dimetyloamino)-metyleno]hydrazyna (3,9 ekw.), pirydyna, 100°C, 24 godz.; (ii) MeOH, przez noc; (iii) DMTCl (1,2 ekw.), 3,5 godz.

Następnie zablokowałam funkcję 5'-hydroksylową grupą 4,4'-dimetoksytrytylową 1,2 ekw. DMTCl. Otrzymałam czysty prekursor **87** po chromatografii kolumnowej i liofilizacji z wydajnością 92%. Struktury związków **87** i **167** potwierdziłam za pomocą ^1H NMR.

3.1.2.2. Synteza prekursora poliamino-2'-deoksycytydyny

W syntezie pochodnej poliamino-2'-deoksycytydyny został użyty z powodzeniem prekursor: 4-*N-p*-toluenosulfonylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydyna [108]. W pierwszej kolejności 2'-deoksycytodynę przekształcałam w pochodną **171** (schemat 29)

[97, 187]. Wprowadzenie blokady *p*-toluenosulfonowej na grupę egzoaminową wymagało wcześniejszej ochrony funkcji hydroksylowych pierścienia cukrowego. W tym celu 2'-deoksycytydynam poddałam reakcji z nadmiarem TMSCl w pirydynie. Po godzinie odparowałam częściowo rozpuszczalnik i dodałam chlorek *p*-toluenosulfonowy. W szczelnie zamkniętym naczyniu reakcję prowadziłam w temp. 60°C przez noc. W wyniku nukleofilowego ataku funkcji egzaminowej reszty cytozyny na atom siarki chlorku *p*-toluenosulfonowego powstała 4-*N*-*p*-toluenosulfonylo-3',5'-bis-*O*-trimetylosililowa pochodna deoksycytydyny (**170**). Analiza TLC wykazała całkowite przereagowanie produktu.



Schemat 29. Synteza prekursora poliamino-2'-deoksycytydyny: (i) TMSCl (4 ekw.), pirydyna, 1 godz.; (ii) chlorek *p*-toluenosulfonowy (2 ekw.), pirydyna, 60°C, przez noc, (iii) 40% HF / pirydyna (1:4), 1 godz. i 40 min.; DMTCl (1 ekw.), pirydyna 2,5 godz.

W celu usunięcia blokad silylowych z funkcji hydroksylowych reszty rybozy, surową pochodną **170** poddałam reakcji z wcześniej przygotowaną mieszaniną 40% HF_{aq} i pirydyny (1 : 4). Do reakcji mogłam wykorzystać 32% wodny roztwór amoniaku w pirydynie (1 : 1), który wcześniej był z powodzeniem stosowany. Różnica między tymi dwoma czynnikami powodującymi hydrolizę polega na tym, że odsilylowanie roztworem amoniaku trwa 4 godz., a roztworem HF tylko 1 godzinę. Stosując roztwór amoniaku w pirydynie przerób mieszaniny poreakcyjnej ogranicza się do odparowania rozpuszczalników i nie ma potrzeby stosowania procedury podziału pomiędzy wodę i rozpuszczalnik organiczny. Jest to istotne, jeśli

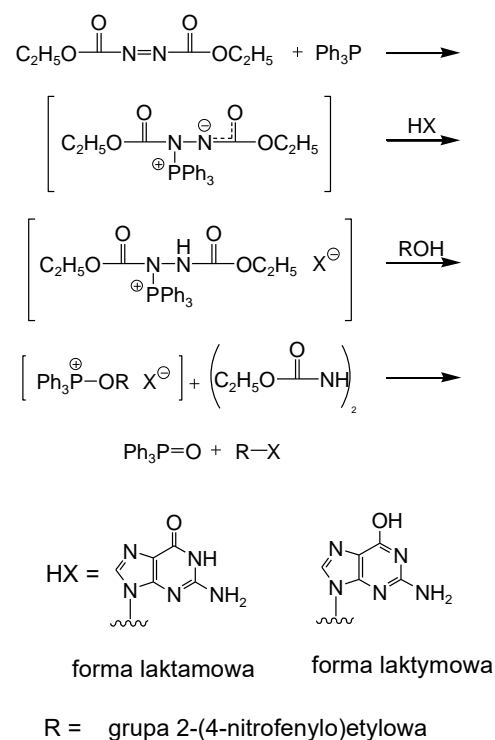
otrzymany produkt częściowo rozpuszcza się w roztworze wodnym. Natomiast w omawianym przypadku pochodna **171** dobrze rozpuszcza się w rozpuszczalnikach organicznych, a więc podzielenie mieszaniny reakcyjnej między chlorek metylenu a nasycony wodny roztwór NaHCO₃ nie powoduje utraty **171**. Po ponad godzinie analiza TLC wykazała zupełne usunięcie grup siliowych. Reakcję odsililowania zakończyłam przez zneutralizowanie HF nasyconym roztworem NaHCO₃. Surowy związek **171** poddałam reakcji z DMTCl w pirydynie, aby wprowadzić grupę 4,4'-dimetoksytrytylową w pozycję 5'-OH. Reakcja trytylowania zaszła ilościowo po ok. 2,5 godzinach, co wykazała analiza TLC. Otrzymałam czysty związek **172** po oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej i liofilizacji z wydajnością 68%. Strukturę związku **172** potwierdziła analiza ¹H NMR.

3.1.2.3. Synteza prekursora poliamino-2'-deoksyguanozyny

Prekursor poliamino-2'-deoksyguanozyny **180** otrzymałam zgodnie z opisem Godziny i Markiewicza [93]. Aby otrzymać 2-fluorową pochodną 2'-deoksyguanozyny, w pierwszej kolejności zablokowałam pozycję O-6 deoksyguanozyny grupą 2-(4-nitrofenylo)etylową (NPE).

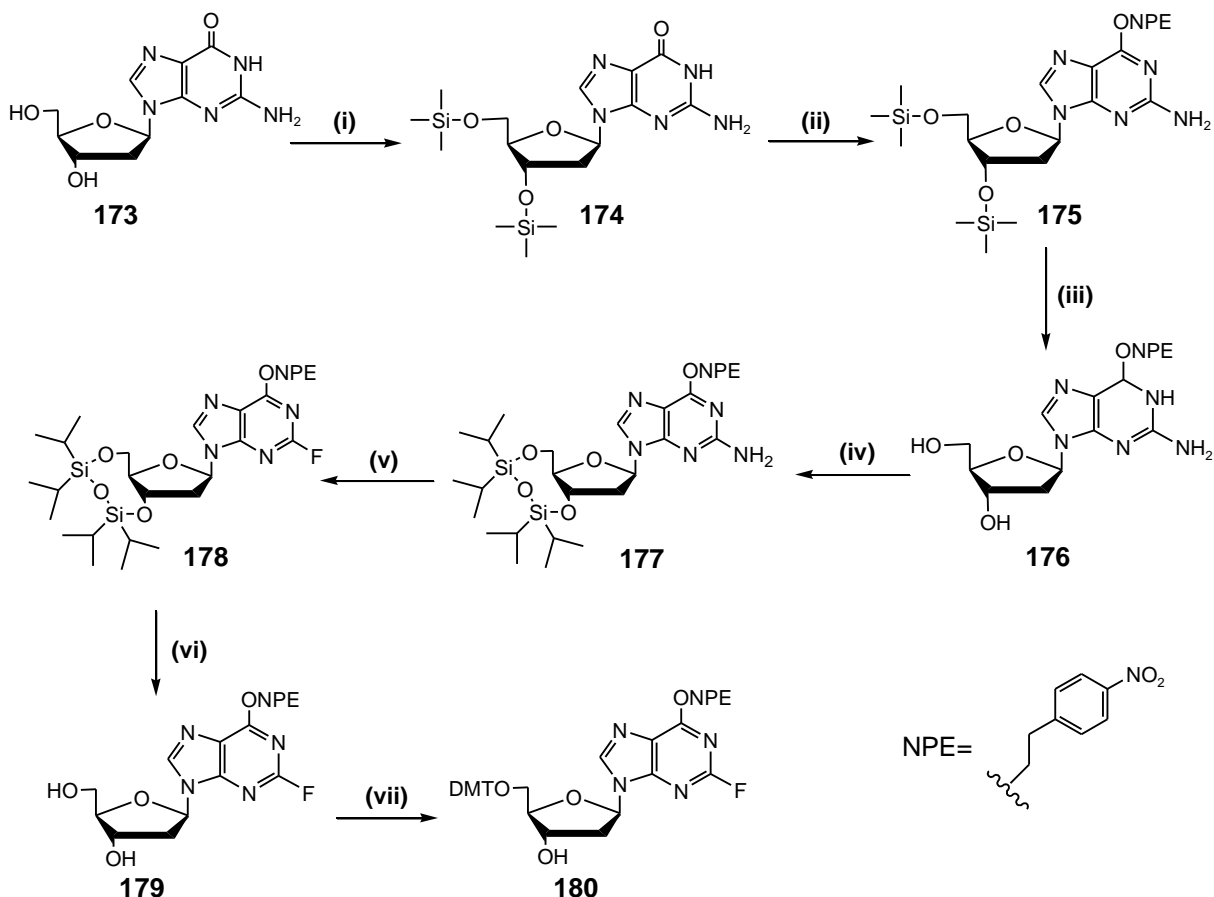
W tym celu wykorzystałam metodę przejściowych grup ochronnych (ang. *transient protection*) dla funkcji hydroksylowych. 2'-Deoksyguanozynę częściowo rozpuściłam w suchym DMF i poddałam reakcji z heksametylodisilazaniem (HMDS). W wyniku reakcji powstała pochodna 3',5'-bis-*O*-trimetylosililowa deoksyguanozyny całkowicie rozpuszczalna w DMF. Po 20 minutach nadmiar HMDS i rozpuszczalnik odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość poddałam reakcji Mitsunobu przez dodanie 1,6 ekw. 2-(4-nitrofenylo)etanolu oraz po 2,4 ekw. trifenylofosfiny i azodikarboksylanu dietylu (DEAD). Reakcję prowadziłam w suchym 1,4-dioksanie. Mechanizm reakcji Mitsunobu przedstawiono na schemacie 30 [188, 189].

Następnie usunęłam blokady trimetylosililowe z pierścienia cukrowego przy użyciu wcześniej przygotowanego roztworu 40% HF i pirydyny (1 :80) zatężonego do połowy objętości.



Schemat 30. Mechanizm reakcji Mitsunobu

Reakcja odsililowania zaszła całkowicie przez 1,5 godziny, co wykazała analiza TLC ($R_f(A) = 0,35$). Mieszaninę reakcyjną standardowo przerobiłam, a surowy produkt **176** oczyściłam na kolumnie chromatograficznej w mieszaninie metanolu i chlorku metylenu. Uzyskałam 6-*O*-2-(4-nitrofenylo)etylo-2'-deoksyguanozynę (**176**) z wydajnością 65%. Strukturę związku **176** potwierdziłam analizą ^1H NMR.



Schemat 31. Synteza prekursora poliamino-2'-deoksyguanozyny: (i) HMDS (4 ekw.), DMF, 20 min.; (ii) 2-(4-nitrofenylo)etanol (1,6 ekw.), trifenylofosfina (2,4 ekw.), DEAD ((2,4 ekw.), 1,4 dioksan, 5 godz., (iii) 40% HF w pirydynie (1:80), 1,5 godz.; (iv) TIPDSiCl₂, pirydyna, 3 godz.; (v) PVPHF, TBN (2 ekw.), toluen, -5°C do 0°C, 2,5 godz.; (vi) 40% HF w pirydynie (1:4), 2 godz.; (vii) DMTCl (1,2 ekw.), pirydyna, 3 godz. i 40 min.

Kolejnym zadaniem syntetycznym było wprowadzenie atomu fluoru w pozycję C-2 zasady heterocyklicznej. Reakcję fluorowania przeprowadziłam w toluenie. Zastosowany rozpuszczalnik wymagał zwiększenia lipofilowości pochodnej nukleozydowej **176**, poprzez wprowadzenie blokad funkcji hydroksylowych reszty rybozy. W tym celu, zamiast blokady trimetylosililowej wykorzystałam trwalszą grupę 1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksano-1,3-diolową (TIPDSi). Pochodną **176** odparowałam trzykrotnie z pirydyną i poddałam reakcji z półtorakrotnym nadmiarem TIPDSiCl₂ w pirydynie. Po 3 godz. reakcja zaszła całkowicie

($R_f(A) = 0,71$). Otrzymałam czysty produkt **177** po standardowym przerobieniu i oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej z wydajnością 87%.

Tak funkcjonalizowaną pochodną deoksyrybozy **177** poddałam fluorowaniu polifluorowodorkiem poliwinylpirydyny (PVPHF). PVPHF jest polimerycznym ciałem stałym, przez to łatwiej się nim posługiwać podczas prowadzenia reakcji. Zaletą stosowania PVPHF jest przede wszystkim wyższa wydajność fluorowania pozycji C-2 pochodnej guanozyny, niż w przypadku fluorowania 70% HF w pirydynie (zaledwie 30%). Trwałość kompleksu PVPHF zależy od stosunku molowego poliwinylpirydyny i HF. Handlowo dostępny PVPHF zawierający 59% wagowych fluorowodoru, jest trwały nawet do temp. 50°C.

Związek **177** poddałam reakcji z PVPHF w obecności azotynu *tert*-butylu (TBN) w niskiej temperaturze (-10°C), w atmosferze argonu. Użycie argonu miało na celu zapobiec przedostaniu się wilgoci do układu, a w konsekwencji degradacji produktu. Reakcja fluorowania przebiega poprzez etap utworzenia soli diazoniowej, a następnie atak nukleofilowy anionu fluorkowego na atom węgla C-2 reszty zasady heterocyklicznej. Po 2,5 godzinach, aby usunąć czynnik fluorujący, roztwór przesączałam przez lejek piankowy, a przesącz podzieliłam między 0,1 M NaHCO₃ i octan etylu.

W kolejnym etapie surową 2-fluoro-6-*O*-2-(4-nitrofenylo)etylo-3',5'-*O*-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-2'-deoksyinozynę **178**, poddałam reakcji z HF w pirydynie, aby usunąć grupę TIPDSi. Analiza TLC ($R_f(A) = 0,47$) wykazała zdjęcie blokady silylowej po ok. 2 godzinach. Otrzymałam pochodną **179** po oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej z wydajnością 56%.

W ostatnim etapie związek **179** przeprowadziłam w 5'-*O*-dimetoksytrytylową pochodną **180** w reakcji z 1,3 ekw. DMTCl w pirydynie. Po przerobieniu i oczyszczeniu otrzymałam prekursor poliamino-2'-deoksyguanozyny **180** z wydajnością 89% (schemat 31), którego strukturę potwierdziłam analizą NMR.

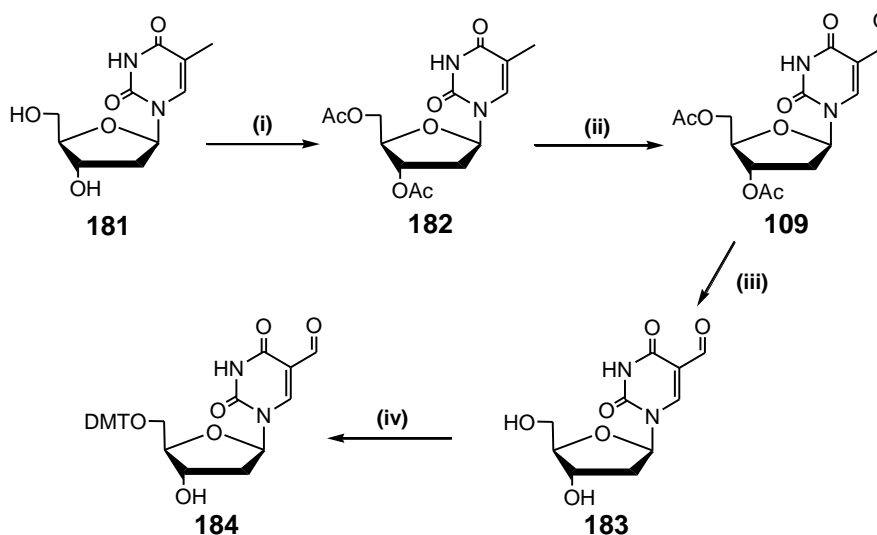
3.1.2.4. Synteza prekursora poliaminotymidyny

Tymidynę w reakcji z bezwodnikiem octowym przeprowadziłam w 3',5'-di-*O*-acetylotymidynę (**182**) [183]. W celu otrzymania 5-formylowej pochodnej 2'-deoksyurydyny, związek **182** rozpuściłam w acetonitrylu z dodatkiem 3,5-krotnego molowego nadmiaru 2,6-lutydyny. Wprowadzone blokady acetylowe miały za zadanie chronić funkcje hydroksylowe pierścienia cukrowego w trakcie utleniania grupy metylowej w pozycji C-5 zasady heterocyklicznej. Następnie dodałam czynnik utleniający tj. 2 równoważniki molowe

nadsiarczanu potasu ($K_2S_2O_8$) i 0,4 równoważnika molowego siarczanu miedzi (II) rozpuszczone w wodzie [81]. Reakcję prowadziłam w temp. ok. $65^\circ C$ pod chłodnicą zwrotną. Niejednorodną mieszaninę reakcyjną intensywnie mieszałam przy użyciu mieszadła magnetycznego.

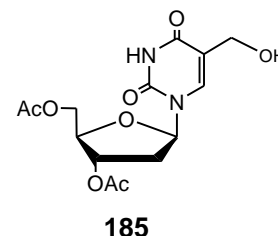
Po 2 godzinach analiza TLC wykazała obecność dwóch produktów: $R_f(A) = 0,67$ i $R_f(A) = 0,42$. Mieszaninę reakcyjną zateżyłam odparowując acetonitryl. Pozostałość podzieliłam między wodę i octan etylu. Warstwę organiczną ekstrahowałam wodą i 5% wodnym roztworem EDTA. EDTA wykorzystałam do usunięcia kationów miedziowych z warstwy organicznej. Na koniec połączone warstwy wodne ekstrahowałam CH_2Cl_2 , aby wyizolować w maksymalnej ilości związek wolniej migrujący na płycie silikażelowej podczas analizy TLC. Po oczyszczeniu z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej otrzymałam 5-formylo-3',5'-di-*O*-acetylo-2'-deoksyurydynę (**109**) z wydajnością 47%. Strukturę związku **109** potwierdziła analiza 1H NMR i spektrometria mas (MS).

Podejrzewając obecność pochodnych formylowych, które uległy odacetylowaniu, połączoną warstwę wodną z utleniania **182** zateżyłam i odparowałam kilkakrotnie z pirydyną w celu usunięcia śladowych ilości wody, w których mogłyby rozpuścić się pochodne nieorganiczne, a następnie stałą pozostałość rozpuściłam w bezwodnej pirydynie. Roztwór poddałam reakcji doacetylowania i otrzymałam dodatkową porcję **109** z wydajnością 9%.



Schemat 32. Synteza prekursora poliaminotymidyny: (i) Ac_2O (4 ekw.), pirydyna, 3 godz.; (ii) $K_2S_2O_8$ (2 ekw.), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,4 ekw.), 2,6-lutydyna (3,5 ekw.), CH_3CN , woda, $65^\circ C$, 2 godz.; (iii) 0,9 M TEA, woda / metanol (7:1), 0,5 godz.; (iv) DMTCl (1,1 ekw.), pirydyna, 1,5 godz.

Wyizolowałam też wolniej migrujący podczas analizy TLC związek ($R_f(A) = 0,42$). Podejrzałam, że podczas utleniania grupy metylowej dochodzi do częściowego odacetylowania funkcji hydroksylowych i wyizolowany związek jest 5-formylową pochodną monoacetylowanej 2'-deoksyurydyny. Analiza $^1\text{H NMR}$ i MS pozwoliła na określenie jego rzeczywistej struktury jako 5-hydroksymetylo-3',5'-di-*O*-acetylo-2'-deoksyurydyny (**185**). Związek **185** poddałam ponownie reakcji utleniania w warunkach identycznych jak w przypadku utleniania **182**. Po 2 godzinach nie obserwowałam już za pomocą analizy TLC obecności związku **185** w mieszaninie reakcyjnej. Po przerobieniu i oczyszczeniu z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej otrzymałam **109** z wydajnością 30%. Związek **185** okazał się produktem pośrednim podczas utleniania. Dodatkowe utlenianie wyizolowanego produktu pośredniego i doacetylowanie pochodnej formylowej z częściowo zhydrolizowanymi wiązaniami estrowymi z warstwy wodnej pozwala zwiększyć całkowitą wydajność syntezy **185** z 47% do 62%.



W kolejnych eksperymentach zamierzałam poprawić wydajność utleniania grupy metylowej 3',5'-di-*O*-acetylotymidyny. W przeprowadzonych eksperymentach analizowałam tylko warstwę organiczną otrzymaną po przerobieniu mieszaniny reakcyjnej. W pierwszej kolejności wydłużyłam czas reakcji do 4 godzin. Wydajność reakcji zmalała do 41%. W tych warunkach nie obserwowałam obecności związku **185** na końcu reakcji utleniania. Zatem pochodna 5-metylohydroksylowa uległa całkowicie utlenieniu do grupy formylowej. Związek **109** otrzymałam jednak tylko z wydajnością 41%. To świadczy o tym, że reakcji utleniania towarzyszy hydroliza grup acetylowych chronionych funkcje hydroksylowe reszty rybozy.

Biorąc pod uwagę fakt, że reakcja przebiega w układzie dwufazowym zastosowałam katalizator przeniesienia fazowego – siarczan (VI) tetrabutylamoniowy z lipofilowym kationem. Dodanie tego katalizatora miało ułatwić migrację reagenta utleniającego, anionu nadsiarczanowego z warstwy wodnej do organicznej. Obecność siarczanu (VI) tetrabutylamoniowego również nie wpłynęła na poprawę wydajności.

W kolejnym podejściu zastosowałam inny katalizator przeniesienia fazowego, sól sodową kwasu *p*-toluenosulfonowego z lipofilową częścią anionową, a zarazem użyłam DMF zamiast acetonitrylu. W takim układzie utlenianie nie zachodziło wcale. Natomiast, kiedy wykorzystywałam nitrometan zamiast acetonitrylu oczekiwany produkt powstawał tylko z wydajnością ok. 10%. Wydajność tę oceniłam na podstawie analizy NMR mieszaniny

reakcyjnej. Na tym zakończyłam próby zwiększenia wydajności syntezy 5-formylo-3',5'-di-*O*-acetylo-2'-deoksyurydyny (**109**).

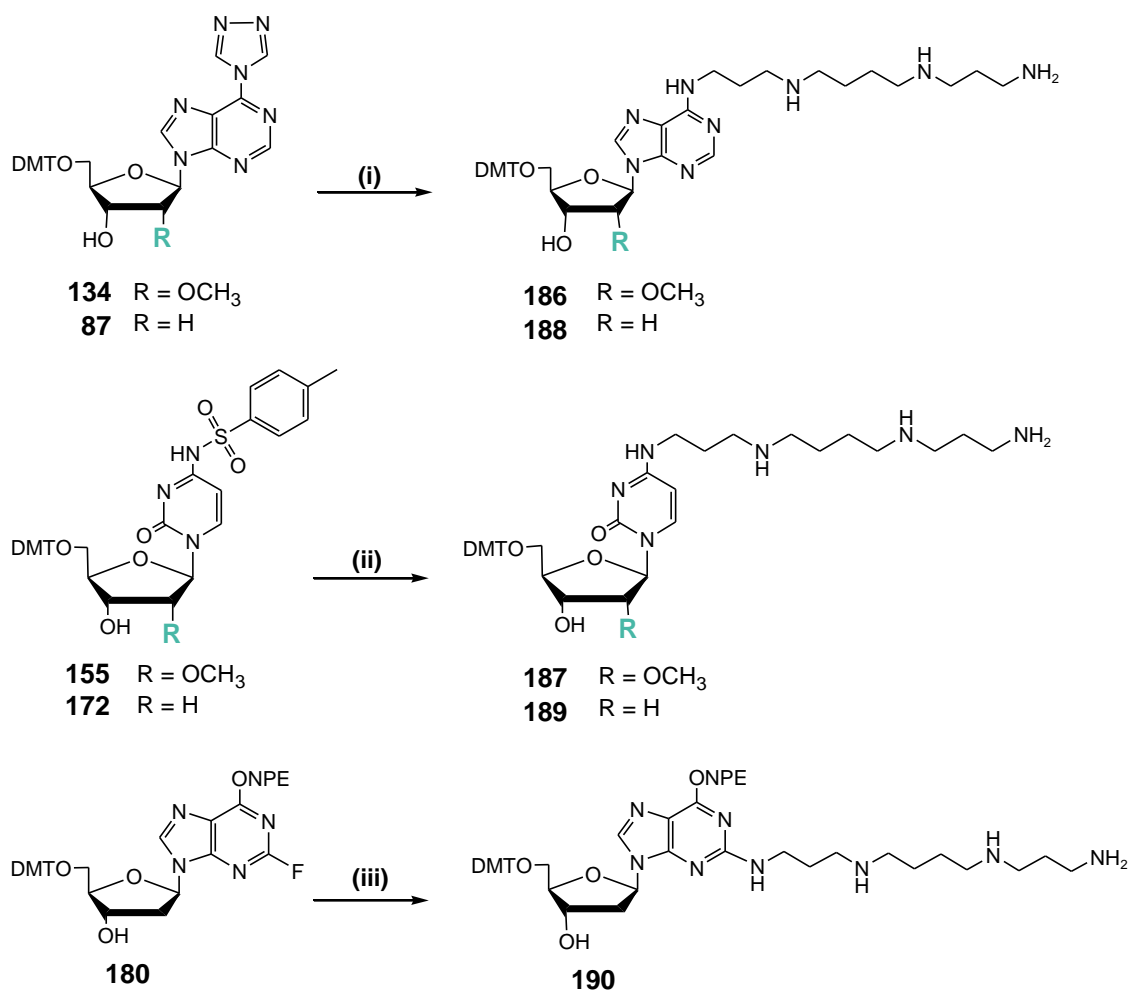
W kolejnym kroku zdjęłam blokady acetylowe z funkcji hydroksylowych pierścienia cukrowego pochodnej **109** w reakcji 0,9 M TEA w wodnym roztworze metanolu. Analiza TLC wykazała zakończenie reakcji po 0,5 godz. ($R_f(A) = 0,20$). Surową 5-formylo-2'-deoksyurydynę (**183**) poddałam typowej reakcji dimetoksytrytylowania w warunkach standardowych i otrzymałam 5-formylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydynę (**184**) z wydajnością 98%. Analiza $^1\text{H NMR}$ potwierdziła strukturę otrzymanego związku.

3.1.3. Wprowadzanie reszty poliaminowej do pierścienia zasady heterocyklicznej

Otrzymane prekursorzy poliamino-2'-*O*-metyloadenozyny **134** i poliamino-2'-*O*-metylocytydyny **155** poddałam reakcji ze sperminą (schemat 33) analogicznie do reakcji opisanych dla serii 2'-deoksynukleozydów [92, 93, 108].

W wyniku ataku nukleofilowego pierwszorzędowej grupy aminowej poliaminy na atom węgla należący do zasady heterocyklicznej kowalencyjnie związany z grupą opuszczającą, dochodzi do reakcji substytucji. Wykorzystana poliamina posiada dwa rodzaje grup aminowych: pierwszo- i drugorzędowe. Prowadzone wcześniej doświadczenia z prekursorami poliamino-2'-deoksynukleozydów pokazały, że w zastosowanych warunkach reakcji dochodzi do ataku nukleofilowego pierwszorzędowej grupy aminowej, a nie drugorzędowej. W obecności tylko drugorzędowej grupy aminowej, w reakcji z di-*n*-butyloaminą, nie dochodzi do powstania pochodnych aminowych [93]. Wspomniany fakt umożliwia stosowanie nieblokowanej poliaminy. Ze względu na symetryczność sperminy, w odróżnieniu np. od spermidyny, nie ma znaczenia, która z funkcji pierwszorzędowych przyłączy się, prowadząc do jednorodnego produktu.

Reakcję prowadziłam z dziesięciokrotnym nadmiarem sperminy w pirydynie w temperaturze 70 °C. Dla pochodnej adeniny **134** czas reakcji wynosił kilka godzin natomiast dla cytozynowego związku **155**, kilkanaście godzin. Może to wskazywać, iż obecność pierścienia triazolowego bardziej uaktywnia atak nukleofilowy poliaminy na atom węgla zasady heterocyklicznej niż grupa *p*-toluenosulfonoamidowa. Taki wniosek byłby w pełni uzasadniony, jeśli można byłoby porównać właściwości tych dwóch grup opuszczających przyłączonych do takiej samej zasady heterocyklicznej – purynowej lub pirymidynowej. Niestety nie dysponowałam związkami, które umożliwiłyby przeprowadzenie takich porównawczych reakcji.



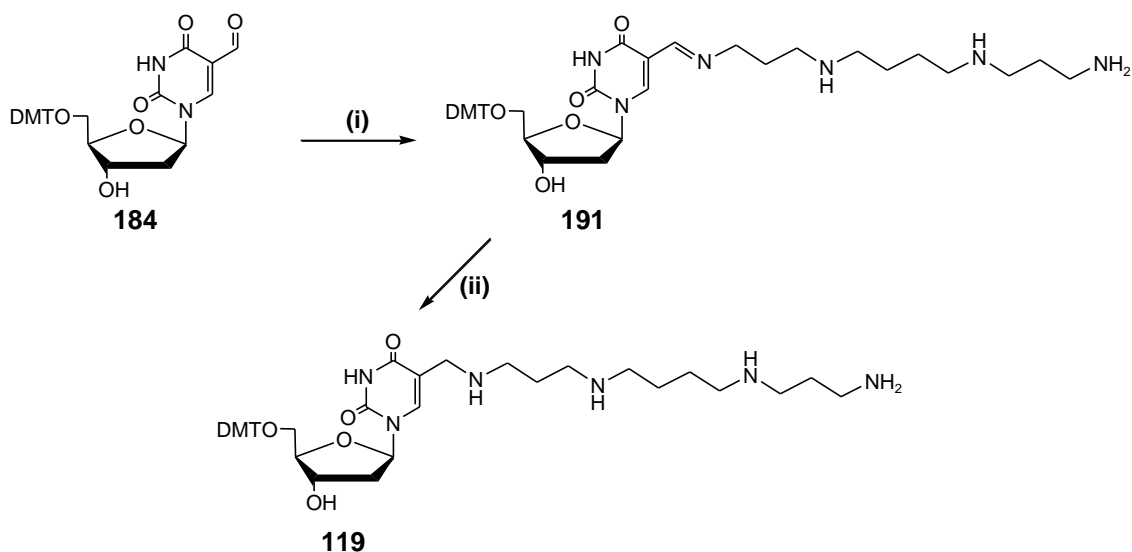
Schemat 33. Wprowadzenie łańcucha poliaminowego do prekursorów pochodnych adeniny, cytozyny i guaniny: (i) spermina (10 ekw.), pirydyna, 70°C, 8 godz.; (ii) spermina (10 ekw.), pirydyna, 70°C, 17 godz.; (iii) spermina (10 ekw.), pirydyna, temp. pokojowa, 1,5 godz.

Analogiczne reakcje przeprowadziłam dla prekursorów poliamino-2'-deoksyadenozyny **87** [93] i poliamino-2'-deoksycytydyny **172** [108] przekształcając je w odpowiednie poliaminowe pochodne **186** i **187**.

Prekursor poliamino-2'-deoksyguanozyny **180** również ulega substytucji nukleofilowej w reakcji ze sperminą (schemat 34) [93]. Atom fluoru kowalencyjnie związany z pierścieniem pirymidynowym reszty purynowej uaktywnia atom węgla w pozycji C-2. Prekursor **180** jest najbardziej reaktywny spośród prekursorów badanych w niniejszej pracy. Atak nukleofilowy następuje w temperaturze pokojowej. Poliaminową pochodną **190** otrzymałam w przeciągu 1,5 godziny.

Pochodną poliaminotymidyny otrzymałam z prekursora **184** w dwóch krokach (schemat 34) [134]. W pierwszym, poddałam **184** działaniu sperminy w mieszaninie

pirydyny i metanolu przez 2 godziny. Następnie wytworzoną zasadę Schiffa **191** zredukowałam borowodorkiem sodu (NaBH_4) i otrzymałam związek **119**.

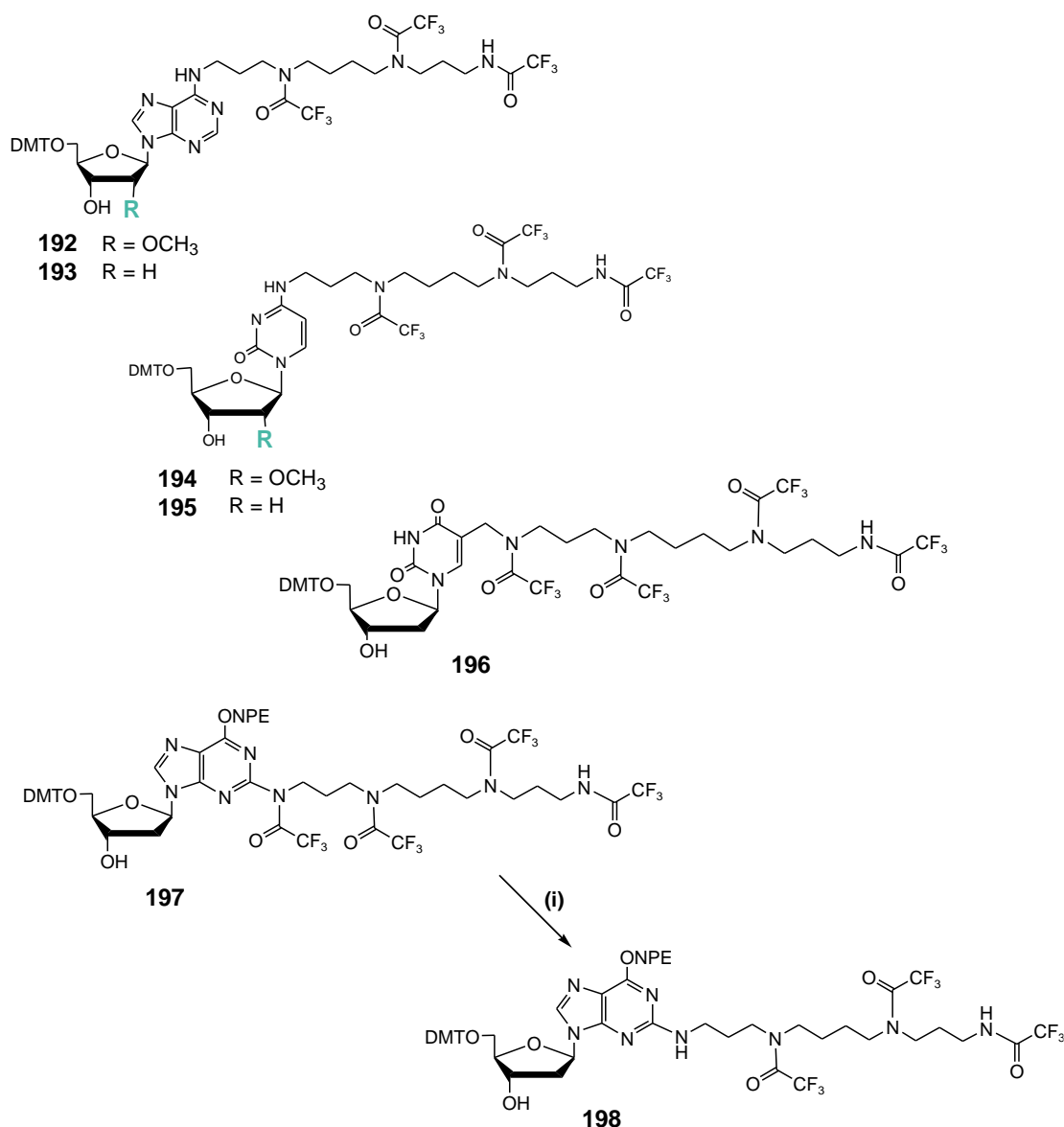


Schemat 34. Przyłączanie łańcucha poliaminowego do prekursora poliaminotymidyny: (i) spermina (10 ekw.), pirydyna – metanol (1 : 1), 2 godz.; (ii) NaBH_4 , 2 godz.

3.1.4. Reakcje trifluoroacetylowania funkcji aminowych reszt poliaminowych

Każdy poliaminonukleozyd posiadał niechronione funkcje aminowe należące do reszty poliaminowej, które podczas otrzymywania 3'-amidofosforynu stanowiłyby potencjalne miejsca ataku czynnika fosfitylującego. Przed reakcją fosfitylacji należało zablokować funkcje aminowe, zarówno pierwszo- jak i drugorzędowe. W tym celu użyłam bezwodnika kwasu trifluorooctowego w pirydynie.

W przypadku trifluoroacetylowania **190** powstawały dwa produkty trifluoroacetylowania, **197** i **198**. Po standardowym przerobie mieszaninę produktów poddałam działaniu metanolu w chlorku metylenu (65:35, v/v). W tych warunkach dochodziło do częściowej solwolizy, w wyniku której, związek **197** przekształcał się w produkt **198** (schemat 35) [93, 183].

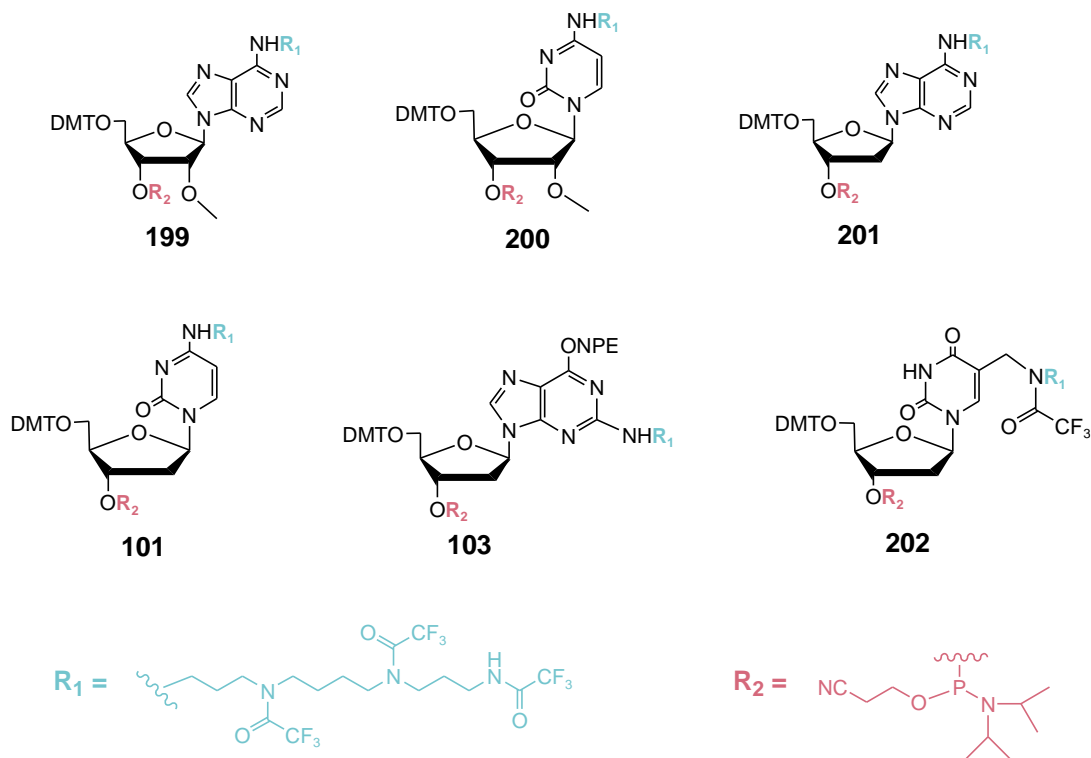


Schemat 35. Poliaminonukleozydy po reakcji trifluoroacetylowania: (i) CH₂Cl₂ – metanol (35 : 65, v/v), 6,5 godz.

3.1.5. Reakcje fosfitylacji

Poszczególne pochodne poliamino-2'-*O*-metylonukleozydowe **192**, **194** i poliamino-2'-deoksynukleozydowe **193**, **195**, **196**, i **198** poddałam reakcji fosfitylacji według standardowej procedury. Jako czynnik fosfitylujący wykorzystałam bis(*N,N*-diizopropylamino)(2-cyjanoetoksy)fosfinę. Katalizatorem reakcji był 1-*H*-tetrazol w ilości jednego równoważnika molowego. Oczekiwane produkty powstawały w przeciągu godziny. Otrzymałam odpowiednie 3'-amidofosforyny **101**, **103**, **199-202** (rys. 12), których strukturę potwierdziła analiza ¹H NMR i ³¹P NMR. Dodatkowo wykonałam widma masowe pochodnych 2'-*O*-metylowych **199** i **200**. Wydajności syntez przeważnie przekraczały 70%.

Jedynie w przypadku amidofosforynu **201**, wydajność wynosiła tylko 53%, tak niska wartość wydajności mogła być spowodowana małą skalą (0,1 mmol).



Rys. 12. Otrzymane 3'-amidofosforyny poliamino-2'-*O*-metyloribonukleozydów i poliamino-2'-deoksynukleozydów

3.2. Synteza chemiczna i oczyszczanie poliaminooligonukleotydów

3.2.1. Synteza chemiczna i oczyszczanie poliamino-2'-deksyoligonukleotydów

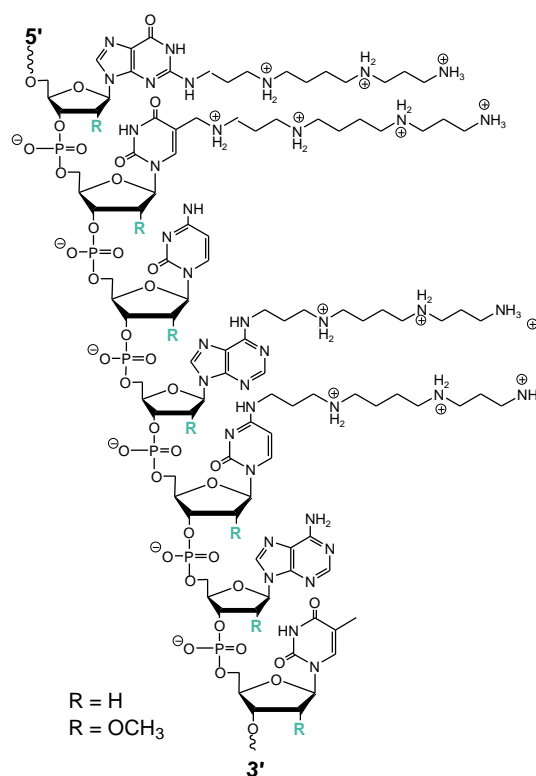
Otrzymane amidofosforyny **101**, **103**, **201**, **202** wykorzystałam do syntezy poliamino-2'-deksyoligonukleotydów, których sekwencje i przeznaczenie opisałam w tabeli 3. Modyfikowane amidofosforyny w postaci liofilizatu rozpuściłam w acetonitrylu, zasypałam sitami molekularnymi 3Å i pozostawiłam w szczelnie zamkniętych fiolkach przez noc. W przypadku standardowych amidofosforynów rozpuszczałam je i suszyłam sitami molekularnymi na godzinę przed syntezą. Wydajności etapów kondensacji nie odbiegały od typowych (ok. 98%). Syntezy wykonałam za pomocą automatycznego syntetyzera DNA w skali 0,2 μmola używając takich samych ilości substratów i stosując czasy poszczególnych etapów takie, jak podczas syntezy niemodyfikowanych oligomerów.

Otrzymane poliaminooligonukleotydy poddałam typowej procedurze odblokowania, czyli działaniu 32% wodnego roztworu NH_3 . Natomiast w przypadku oligomerów zawierających pochodną poliamino-2'-deoksyguanozyny do odblokowania stosowałam 40% wodny roztwór metyloaminy.

Po odblokowaniu przystąpiłam do oczyszczania otrzymanych oligomerów. Ze względu na obecność w łańcuchu DNA sprotonowanej reszty sperminy zmienia się całkowity ładunek (q) „makrocząsteczkowej” części powstałego oligomeru (tabela 3). Jedna modyfikacja resztą sperminy wprowadza trzy ładunki dodatnie, natomiast cztery w przypadku pochodnej sperminotymidyny. Jeżeli całkowity ładunek oligomeru był ujemny i $|q| \geq 3$ poliaminooligonukleotyd oczyszczałam analogicznie do niemodyfikowanych łańcuchów.

W przypadku, gdy całkowity ładunek był dodatni i $|q| \geq 3$, tak jak np. dla $d(\text{C}^{\text{sp}}\text{C}^{\text{sp}}\text{C}^{\text{sp}}\text{C}^{\text{sp}}\text{T}\text{T}\text{T}\text{T})$ $q = +5$, stosowałam bufor fosforanowy i elektroforezę prowadziłam „w odwrotnym kierunku”, a biokoniugat migrował w stronę katody.

Dla oligomerów, gdzie całkowity ładunek wynosił $|q| \leq 2$ początkowo wykonywałam próby oczyszczenia elektroforetycznego na 20% żelu akryloamidowym w odpowiednich buforach i kierunkach, ale oligomery bardzo wolno migrowały i praktycznie pozostawały na starcie. Tłumaczę to faktem, że oligomery były obdarzone zbyt małym ładunkiem w porównaniu do wielkości całej cząsteczki. Dlatego wykonałam typową elektroforezę, ale w 7% a nie 20% żelu akryloamidowym dla $q = +2$ i w buforze fosforanowym w przeciwnym kierunku dla $q = -1$. Wykorzystanie 7% żelu miało na celu ułatwienie migracji dużych cząsteczek, w „luźniejszej” strukturze poliakrylamidu.



Rys. 13. Poglądowy model poliamino-2'-*O*-metylooligonukleotydu i poliamino-2'-deoksyoligonukleotydu

Tabela 3. Zsyntetyzowane poliamino-2'-deoksyoligonukleotydy

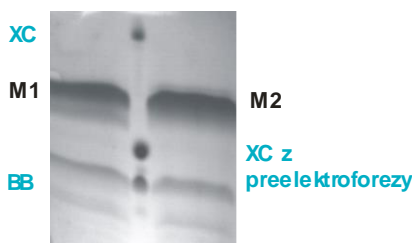
Symbol oligomeru	Sekwencja	Długość oligomeru	Całkowity ładunek	Zastosowanie w niniejszej pracy
E1	d(C ^{sp} TTTTTTTT)	8	-4	Trawienia enzymatyczne
E2	d(TTTTTTTC ^{sp} TTTTTTTT)	15	-11	
E3	d(C ^{sp} TTTTTTTTTC ^{sp} TTTTTTTT)	16	-9	
E4	d(A ^{sp} TTTTTTTT)	8	-4	
E5	d(TTTTTTTA ^{sp} TTTTTTTT)	15	-11	
E6	d(G ^{sp} TTTTTTTT)	8	-4	
E7	d(TTTTTTTG ^{sp} TTTTTTTT)	15	-11	
E8	d(T ^{sp} TTTTTTTT)	8	-3	
E9	d(TTTTTTTT ^{sp} TTTTTTTT)	15	-10	
D1	d(C ^{sp} CCCTTTT)	8	-4	Pomiar temperatur topnienia dupleksów
D2	d(CC ^{sp} CCTTTT)	8	-4	
D3	d(CCC ^{sp} CTTTT)	8	-4	
D4	d(CCCC ^{sp} TTTT)	8	-4	
D5	d(C ^{sp} C ^{sp} CCCTTTT)	8	-1	
D6	d(CC ^{sp} C ^{sp} CCTTTT)	8	-1	
D7	d(CCC ^{sp} C ^{sp} TTTT)	8	-1	
D8	d(C ^{sp} CC ^{sp} CCTTTT)	8	-1	
D9	d(CC ^{sp} CC ^{sp} TTTT)	8	-1	
D10	d(C ^{sp} CCC ^{sp} TTTT)	8	-1	
D11	d(C ^{sp} C ^{sp} C ^{sp} CCTTTT)	8	+2	
D12	d(CC ^{sp} C ^{sp} C ^{sp} TTTT)	8	+2	
D13	d(C ^{sp} CC ^{sp} C ^{sp} TTTT)	8	+2	
D14	d(C ^{sp} C ^{sp} CC ^{sp} TTTT)	8	+2	
D15	d(C ^{sp} C ^{sp} C ^{sp} C ^{sp} TTTT)	8	+5	
B	d(AC ^{sp} GTACGT)	15	-4	Pomiar temperatur topnienia trypleksów
C	d(AC ^{sp} GTAC ^{sp} GT)	15	-1	
T9a	d(G ^{sp} TG GTG GGG TGT GGG)	15	-11	
T9b	d(GT ^{sp} G GTG GGG TGT GGG)	15	-10	
T9c	d(GTG GTG GG ^{sp} G TGT GGG)	15	-11	
T9d	d(GTG GTG GGG T ^{sp} GT GGG)	15	-10	
T9e	d(GTG GTG GGG TGT GG ^{sp} G)	15	-11	
T10a	d(G ^{sp} GT GGT GGT TGT GGT)	15	-11	
T10b	d(GGT GGT GG ^{sp} T TGT GGT)	15	-11	
T10c	d(GGT GGT GGT ^{sp} TGT GGT)	15	-10	
T10d	d(GGT GGT GGT TGT GG ^{sp} T)	15	-11	

W tak przygotowanej płycie elektroforetycznej obserwowałam migrację tych cząsteczek. Taka metoda analizy pozwoliła na oszacowanie czystości uzyskanych oligomerów. Ich wysoka czystość (powyżej 95%) skłoniła mnie do pominięcia etapu oczyszczania na drodze elektroforezy. Zdecydowałam się ograniczyć oczyszczanie do sączenia żelowego. Przepuściłam więc, obdarzone ładunkiem $q = +2$ i $q = -1$ surowe oligomery przez kolumny NAP-25 wypełnione Sephadexem G-25, w celu odseparowania oligonukleotydu od związków niskocząsteczkowych, takich jak np.: sole, amoniak itp.

Przy wysokiej wydajności przyłączania modyfikowanych jednostek podczas syntezy DNA metodą amidofosforynową taki poziom czystości oligomerów był wystarczający do przeprowadzenia pomiarów temperatur topnienia ich kompleksów.

3.2.2. Synteza chemiczna i oczyszczanie poliamino-2'-*O*-metylorybooligo-nukleotydów

Amidofosforyn poliamino-2'-*O*-metylocytydyny **200** również wykorzystałam w automatycznej syntezie DNA, w celu otrzymania poliamino-2'-*O*-metylooligonukleotydu. Otrzymałam następujący 18-mer z jedną pochodną poliamino-2'-*O*-metylocytydyny (Cm^{SP}): 5'-TTATTC m^{SP} TTTAGAATGGTG-3'. Po odblokowaniu oligomer oczyściłam elektroforetycznie. Okazało się, że produkt po oczyszczeniu, zawierał oprócz właściwego oligomeru, także zanieczyszczenie w postaci 17-meru nie zawierającego jednostki Cm^{SP} . Mogłam to stwierdzić na podstawie analizy MS MALDI-TOF. Przyczyną pojawienia się tego zanieczyszczenia musiała być niekompletna reakcja „kapowania” w czasie syntezy oligonukleotydów prowadzonej za pomocą automatycznego syntetyzera DNA. Wydaje się, że oprócz oczyszczenia za pomocą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym należałoby, w analogicznych sytuacjach, stosować dodatkowo oczyszczanie za pomocą chromatografii HPLC np. na kolumnie z tzw. fazą odwróconą.



Fot. 1. Dokumentacja elektroforezy w 20% żelu poliakryloamidowym poliamino-2'-*O*-metylorybooligonukleotydów **M1** i **M2**.

Aby poprawić wydajność przyłączenia 3'-amidofosforynu **200** zwiększyłam czas kondensacji do 14 minut (standardowo 2 min.) i użyłam dwukrotnie większej ilości modyfikowanego amidofosforynu podczas automatycznej syntezy DNA. Otrzymałam oligomer 5'-**Cm^{sp}TTTTTTTT**-3' (**M1**). W alogiczny sposób otrzymałam oligonukleotydy 5'-**Am^{sp}TTTTTTTT**-3' (**M2**) wykorzystując amidofosforyn **199**. Wydajności etapów kondensacji amidofosforynów poliamino-2'-*O*-metylorybonukleozydów tym razem nie odbiegały od typowych (ok. 98%). Oligonukleotydy **M1** i **M2** scharakteryzowałam za pomocą analizy elektroforetycznej na żelu denaturującym (fot. 1).

Uzyskane wyniki potwierdziły poprawność syntezy amidofosforynów spermino-2'-*O*-metyloadenozyny **199** i spermino-2'-*O*-metylocytydyny **200** oraz ich przydatność w syntezie poliaminooligonukleotydów.

3.3. Wpływ modyfikacji poliaminowej oligonukleotydów na ich hydrolizę enzymatyczną

Przeprowadziłam badania wpływu modyfikacji sperminą zasad heterocyklicznych DNA na ewentualne zwiększenie trwałości modyfikowanych DNA podczas hydrolizy za pomocą enzymów nukleolitycznych. Do trawień enzymatycznych wykorzystywałam zarówno egzonukleazę trawiącą oligonukleotydy od końca 5', fosfodiesterazę I (PDE I) z jadu węża, jak i hydrolizującą od końca 3', fosfodiesterazę II (PDE II) ze śledziona wołowej. Do trawień wykorzystywałam jako wzorzec niemodyfikowany 22-mer i następujące poliamino-2'-deoksyoligonukleotydy:

- E1** d(CspTTTTTTTT)
- E2** d(TTTTTTTCspTTTTTTTT)
- E3** d(CspTTTTTTTTCspTTTTTTTT)
- E4** d(AspTTTTTTTT)
- E5** d(TTTTTTTTAspTTTTTTTT)
- E6** d(GspTTTTTTTT)
- E7** d(TTTTTTTTGspTTTTTTTT)
- E8** d(TspTTTTTTTT)
- E9** d(TTTTTTTTspTTTTTTTT)

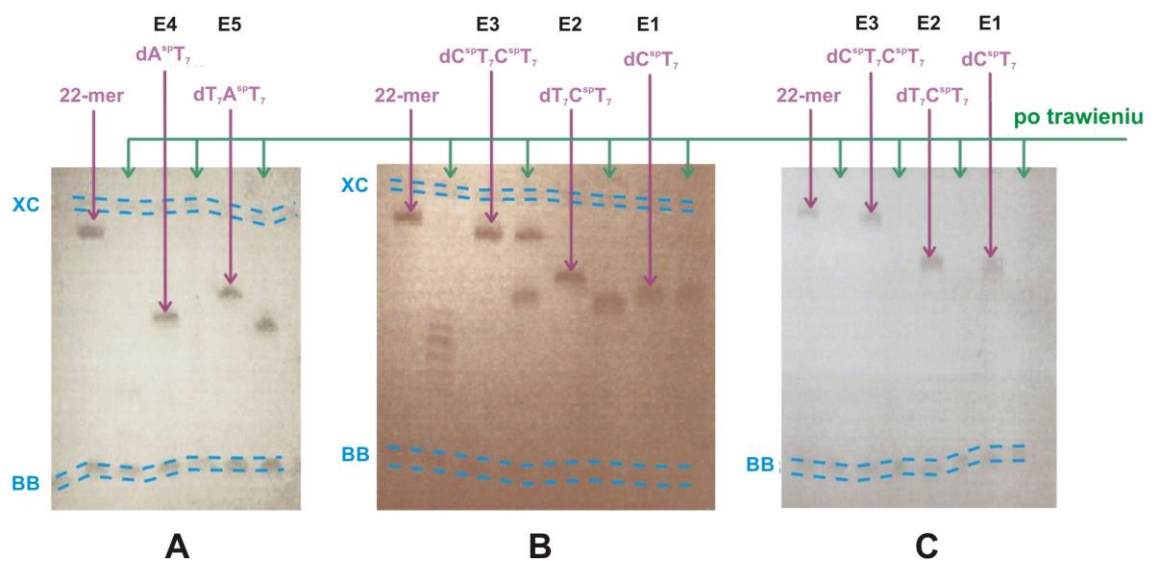
Reakcję enzymatyczną prowadziłam w temperaturze 37 °C przez 3 godziny z PDE I lub 0,5 godziny z PDE II. Przykładowe wyniki hydrolizy przedstawia rys. 14.

Trawienie poliamino-2'-deoksyoligonukleotydów za pomocą PDE I wykonywałam przy stężeniach nukleazy równych 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 7,0, 10 i 15 U / μmol wiązania

fosfodiesterowego. Przy stężeniu $4 \text{ U} / \mu\text{mol}$ obserwowałam częściowy efekt ochronny modyfikacji poliaminowej; piętnastomer uległ strawieniu do ośmiomeru. Ośmiomery ulegały trawieniu np. w przypadku pochodnej poliamino-2'-deoksyadenozynowej, ale nie z jednostką poliamino-2'-deoksyguanozyny. Przy większym stężeniu dochodziło do całkowitego trawienia wszystkich badanych oligomerów.

Podczas hydrolizy katalizowanej przez PDE II, przy zastosowaniu $1 \text{ U} / \mu\text{mol}$ wiązania fosfodiesterowego obserwowałam częściowe trawienie poliamino-2'-deoksyoligonukleotydów. Zwiększenie stężenia enzymu do $10 \text{ U} / \mu\text{mol}$ wiązania fosfodiesterowego prowadziło już do całkowitego strawienia modyfikowanych oligomerów (rys. 14).

Stwierdziłam częściowy efekt ochronny niektórych modyfikacji, choć jest on stosunkowo niewielki i nie ma znaczenia praktycznego takiego jak np. modyfikowanie wiązania internukleotydowego w przypadku oligotiofosforanów nukleozydowych, oligometanofosfonianów nukleozydowych, itp. [190, 191]

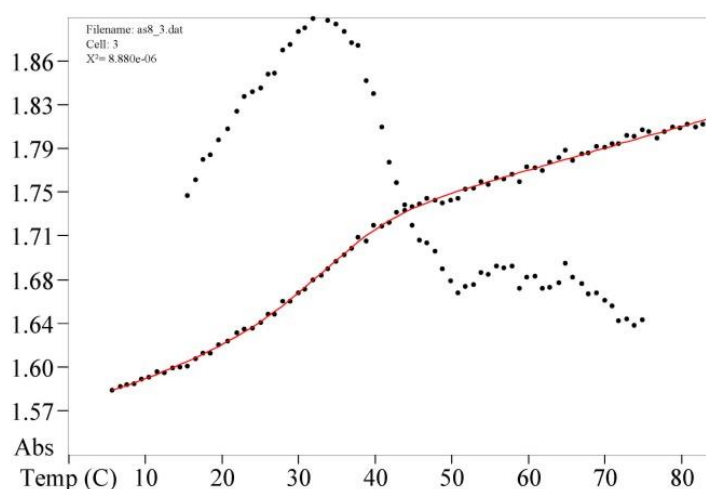


Rys. 14. Przykładowe obrazy elektroforezy substratów i produktów poliaminooligonukleotydowych użytych w trawieniach enzymatycznych: A – PDE I, $4 \text{ U} / \mu\text{mol}$ wiązania fosfodiesterowego; 8-mer **E4** ulega całkowicie trawieniu, 15-mer **E5** zostaje częściowo trawiony do 8-meru. Obserwuje się częściowy efekt ochronny modyfikacji poliaminowej. B - PDE II $1 \text{ U} / \mu\text{mol}$ wiązania fosfodiesterowego; 16-mer **E3** jest częściowo trawiony do 9-meru, 15-mer **E2** trawiony do 8-meru, 8-mer **E1** nie ulega trawieniu. Oligonukleotydy ulegają trawieniu do modyfikacji poliaminowej, obserwuje się całkowity efekt ochronny. C - PDE I, $10 \text{ U} / \mu\text{mol}$ wiązania fosfodiesterowego; wszystkie oligomery (**E1**, **E2**, **E3**) ulegają całkowitemu trawieniu. 22-mer – oligodeoksynukleotyd nie zawierający modyfikacji poliaminowej.

3.4. Wpływ ilości modyfikacji poliaminowych na trwałość struktury dwuniciowej DNA

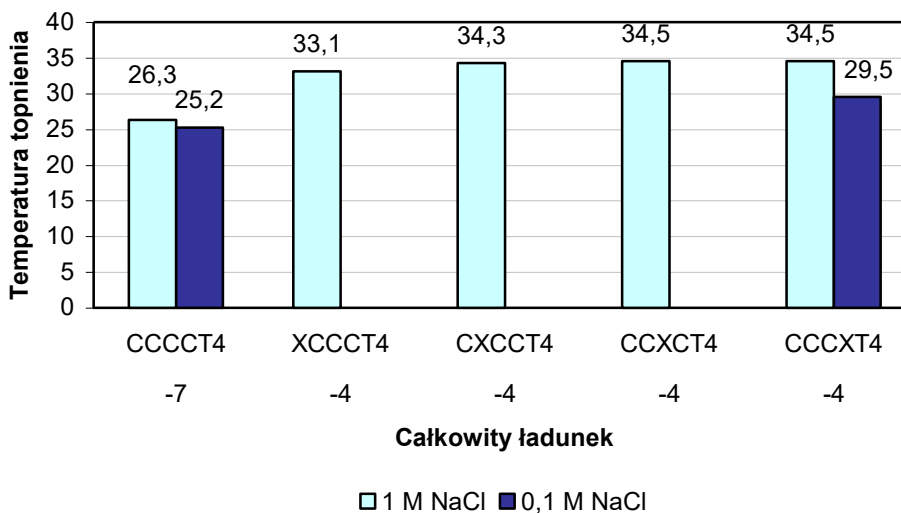
Badania przeprowadzone wcześniej z wykorzystaniem rozproszonej biblioteki kombinatorycznej (ang. *Synthetic Oligonucleotide Combinatorial Library* – SOCL) wykazały, że modyfikowane resztą sperminy jednostki cytozynowe stabilizują strukturę dwuniciową DNA. Otrzymana biblioteka posiadała cztery randomizowane pozycje d(XXXXTTTT), gdzie X stanowił 2'-deoksycytydynę (dC) lub 2'-deoksycytydynę modyfikowaną resztą sperminy w pozycji N-4 (dC^{SP}). Łączna liczba oligonukleotydów składających się na bibliotekę wynosiła 16, co odpowiada liczbie wariacji z powtórzeniami dwóch wymiennie przyłączanych elementów na czterech pozycjach (2^4) [108].

W celu sprawdzenia wpływu ilości modyfikacji poliaminowych na trwałość struktury dwuniciowej otrzymałam z osobna każdy element biblioteki i komplementarny oligonukleotyd d(AAAAGGGG). Zmieszałam każdy z 16-tu oligonukleotydów tworzących SOCL d(X₄T₄) z równomolową ilością komplementarnego oktameru d(A₄G₄) tak, aby absorpcja (A) otrzymanych roztworów mieściła się w przedziale od 0,2 do 1,8. Pomiar temperatur topnienia prowadziłam dla trzech różnych stężeń dla każdego układu. Przykładowy obraz pomiaru temperatury topnienia przedstawiłam na wykresie 1. Na podstawie uzyskanych wyników, przy użyciu programu komputerowego MeltWin 3.5, otrzymałam wartość temperatury topnienia dupleksów dla stężenia $c = 1 \times 10^{-4}$ M. Pomiar wykonywałam w dwóch buforach o różnych stężeniach NaCl; dla wszystkich oligomerów w 1 M NaCl i dla wybranych sekwencji w 0,1 M NaCl.



Wykres 1. Krzywa topnienia oraz pierwsza pochodna d(CCCXT₄) i komplementarnego oligomeru d(A₄G₄), gdzie X = dC^{SP}

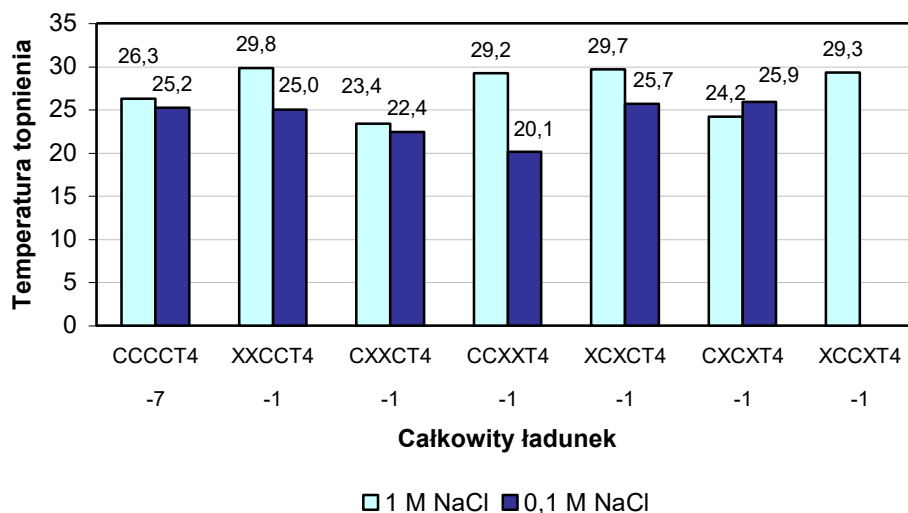
Odnotowałam wyraźną stabilizację formy dupleksowej w przypadku obecności jednej modyfikacji dC^{SP} w oligomerze: ΔT_m ok. 8°C dla 1 M NaCl. Otrzymane wartości były zbliżone dla wszystkich czterech oligomerów posiadających jedną resztę sperminy w różnych położeniach (wykres 2).



Wykres 2. Temperatury topnienia struktury dwuniciowej d(AAAAGGGG) z komplementarnymi oligomerami posiadającymi jedną modyfikację poliaminową, gdzie X = dC^{SP}

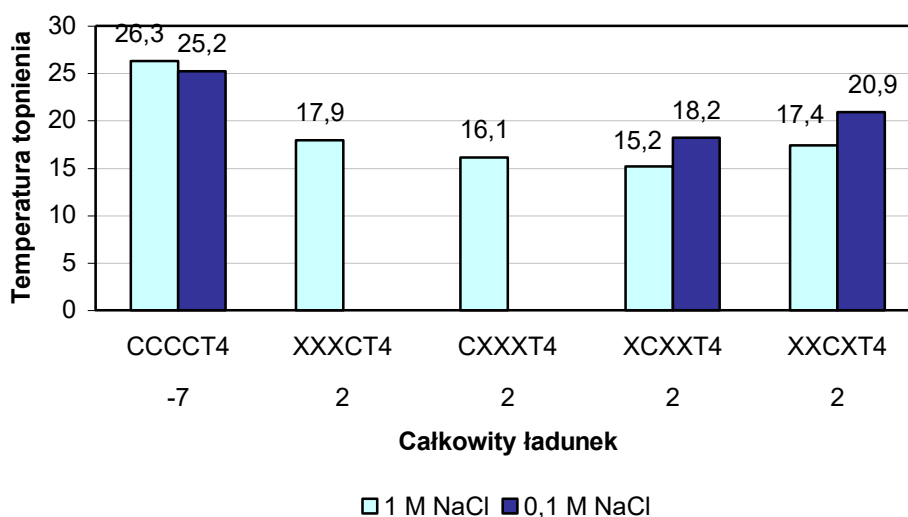
W przypadku kompleksów oligonukleotydów zawierających dwie modyfikacje dC^{SP} obserwovałam zarówno stabilizację, jak i destabilizację dupleksów (wykres 3). Na trwałość otrzymanych kompleksów może wpływać położenie modyfikowanej jednostki nukleotydowej. Jeśli jedna z modyfikacji znajdowała się na 5'-końcu oligomeru, obserwovałam wzrost stabilności takiej struktury dwuniciowej.

Oligomery z trzema modyfikacjami wykazywały destabilizację niezależnie od położenia w łańcuchu modyfikowanych resztami sperminy jednostek nukleotydowych (wykres 4). Prawdopodobnie nagromadzenie się na krótkim odcinku łańcucha oligonukleotydowego sprotonowanych reszt poliaminowych powoduje odpychanie się ładunków dodatnich sąsiadujących fragmentów poliaminowych. To w konsekwencji wpływa na strukturę modyfikowanego oligomeru i destabilizację kompleksu dwuniciowego. Wyraźnie widoczny jest jednak wpływ stabilizujący modyfikacji dC^{SP} w roztworze o niższym stężeniu soli (0,1 M NaCl). Ten wzrost trwałości kompleksów jest zgodny zarówno z obserwacjami analizy całej biblioteki kombinatorycznej [108], jak i z kationowym charakterem poliaminooligonukleotydów [192].



Wykres 3. Temperatury topnienia struktury dwuniciowej d(AAAAGGGG) z komplementarnymi oligomerami posiadającymi dwie modyfikacje poliaminowe, gdzie X = dC^{SP}

W przypadku oligomeru **D15**, z czterema resztami poliaminowymi, nie rejestrowałam tworzenia się struktury dwuniciowej. W tym wypadku cztery modyfikowane reszty nukleotydowe ze sprotonowanymi łańcuchami poliaminowymi są umieszczone obok siebie i mogą wpływać na strukturę poliaminooligonukleotydu tak, że ostatecznie nie tworzy się żaden kompleks dwuniciowy.



Wykres 4. Temperatury topnienia struktury dwuniciowej d(AAAAGGGG) z komplementarnymi oligomerami posiadającymi trzy modyfikacje poliaminowe, gdzie X = dC^{SP}

Zbiornicze wyniki pomiarów temperatur topnienia przedstawiłam na wykresie 5 i w tabelach 4 i 5. Wykres 5 przedstawia średnie temperatury topnienia dla dupleksów powstałych z poliaminooligonukleotydami, posiadającymi różne ilości modyfikacji poliaminowych, i komplementarnym oligomerem. W przypadku dwóch modyfikacji, gdzie obserwowałam zarówno efekt stabilizujący, jak i destabilizujący, przedstawiłam wartość najwyższej temperatury topnienia uzyskaną dla sekwencji d(XXCCTTTT), gdzie X = dC^{SP}.

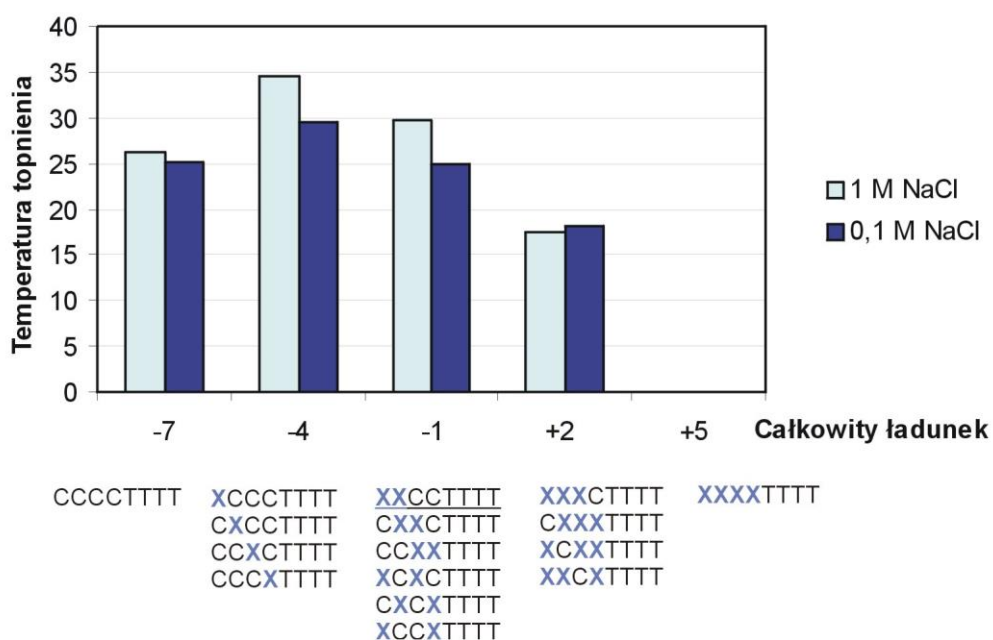
Wcześniejsze badania biblioteki kombinatorycznej d(X₄T₄) wykazały, że niektóre oligonukleotydy biblioteki mogą oddziaływać niespecyficycznie z niekomplementarnymi oligonukleotydami. Tworzenie się takich kompleksów zaobserwowano np. dla d(C₄T₄) [108].

Tabela 4. Temperatury topnienia struktur dwuniciowych, modyfikowanych poliaminooligonukleotydów z komplementarnym d(AAAAGGGG) w 1 M NaCl (X = dC^{SP})

Symbol	Liczba modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	dG ₁ w 37°C (kcal/mol)	T _{m1} (°C, 1×10 ⁻⁴ M)	dG ₂ w 37°C (kcal/mol)	T _{m2} (°C, 1×10 ⁻⁴ M)
D0	0	CCCCT ₄	-4,91±0,37	27,2	-3,69±0,41	26,3
D1	1	XCCCT ₄	-5,84±0,27	32,9	-5,98±0,25	33,1
D2	1	CXCCT ₄	-5,99±0,27	33,6	-6,17±0,32	34,3
D3	1	CCXCT ₄	-6,11±0,12	34,6	-6,06±0,03	34,5
D4	1	CCCXT ₄	-6,13±0,10	34,6	-6,06±0,03	34,5
D5	2	XXCCT ₄	-4,96±0,81	30,2	-5,09±0,93	29,8
D6	2	CXXCT ₄	-4,87±0,69	25,7	-2,89±0,13	23,4
D7	2	CCXXT ₄	-2,99±3,24	23,6	-5,53±0,21	29,2
D8	2	XCXCT ₄	-5,53±0,41	30,5	-5,31±0,82	29,7
D9	2	CXCXT ₄	-4,90±0,50	25,4	-4,38±0,99	24,2
D10	2	XCCXT ₄	-5,21±1,40	29,3	-	-
D11	3	XXXCT ₄	-4,52±0,56	19,7	-3,18±0,61	17,9
D12	3	CXXXT ₄	-4,06±1,25	16,1	-	-
D13	3	XCXXT ₄	-4,20±0,97	17,3	-3,02±0,52	15,2
D14	3	XXCXT ₄	-5,06±1,09	21,1	-4,04±0,66	17,4
D15	4	XXXXT ₄	nie udało się zmierzyć			

Tabela 5. Temperatury topnienia struktur dwuniciowych, modyfikowanych poliaminooligonukleotydów z komplementarnym d(AAAAGGGG) w 0,1 M NaCl (X = dC^{SP})

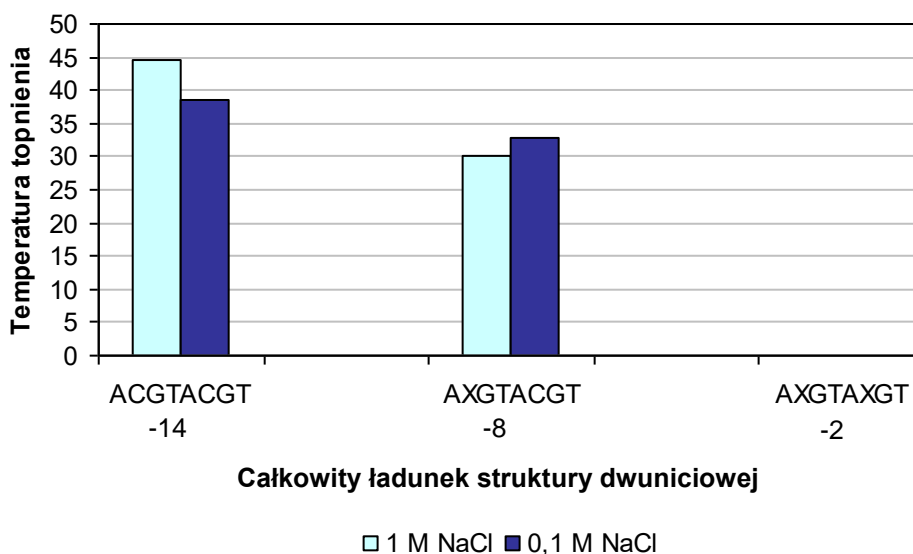
Symbol	Liczba modyfikacji	Sekwencja (5'-3')	dG ₁ w 37°C (kcal/mol)	T _{m1} (°C, 1×10 ⁻⁴ M)	dG ₂ w 37°C (kcal/mol)	T _{m2} (°C, 1×10 ⁻⁴ M)
D0	0	CCCCT ₄	-4,76±0,22	25,6	-3,98±0,20	25,2
D4	1	CCCXT ₄	-5,38±0,23	29,9	-4,76±0,33	29,5
D5	2	XXCCT ₄	-5,25±0,14	27,2	-3,37±0,98	25,0
D6	2	CXXCT ₄	-4,89±1,23	23,9	-5,83±1,81	22,4
D7	2	CCXXT ₄	-4,30±1,02	22,0	-3,82±2,97	20,1
D8	2	XCXCT ₄	-4,57±0,58	26,5	-3,87±0,55	25,7
D9	2	CXCXT ₄	-4,29±0,38	25,4	-4,74±0,58	25,9
D13	3	XCXXT ₄	-3,74±0,28	18,2	-	-
D14	3	XXCXT ₄	-4,84±0,19	20,4	-5,71±0,31	20,9
D15	4	XXXXT ₄	nie udało się zmierzyć			

**Wykres 5.** Średnie temperatury topnienia struktury dwuniciowej d(AAAAGGGG) z elementami biblioteki d(XXXXTTTT) w 0,1 M NaCl, gdzie X = dC lub dC^{SP}; w przypadku dwóch modyfikacji (q = -1) podano T_m podkreślonego oligomeru; X = dC^{SP}

Celem sprawdzenia wpływu obecności sprotonowanego łańcucha poliaminowego na tworzenie struktury dupleksowej wybrałam jeden z poliaminooligonukleotydów biblioteki tworzących najtrwalszy kompleks z d(AAAAGGGG). Był to jeden z oligomerów posiadających jedną modyfikację poliaminową: d(CXCCTTTT) (**D2**), X = dC^{sp}. Zmieszałam poliaminooligonukleotyd **D2** z równomolową ilością niemodyfikowanego oligomery d(CCCCTTTT). Przeprowadziłam pomiar temperatury topnienia analogicznie jak w przypadku elementów biblioteki kombinatorycznej d(X₄T₄) z komplementarnym oligomerem d(A₄G₄). W wyniku powyższego eksperymentu nie obserwowałam tworzenia się kompleksu.

W związku ze zróżnicowaniem temperatur topnienia dupleksów z dwiema modyfikacjami poliaminowymi – obserwowałam zarówno efekt stabilizujący, destabilizujący jak i brak wpływu na trwałość kompleksów - postanowiłam bliżej zbadać wpływ obecności dwóch reszt sperminy w strukturze dwuniciowej.

Aby zbadać wpływ obecności dwóch i czterech reszt poliaminowych w łańcuchu oligomeru składającego się również z ośmiu jednostek nukleotydowych, zaprojektowałam sekwencję tak, że oligomer posiadał powtórzenie sekwencji ACGT. Otrzymany oligomer d(ACGTACGT) jest oligonukleotydem autokomplementarnym. Zsyntetyzowałam następujące oligomery; d(ACGTACGT) (**A**) i modyfikowane resztą sperminy: d(AC^{sp}GTACGT) (**B**) oraz d(AC^{sp}GTAC^{sp}GT) (**C**) posiadające w układzie dwuniciowym odpowiednio dwie i cztery modyfikacje poliaminowe. Topnienie analizowałam również w roztworach o stężeniu 0,1 i 1 M NaCl (tabela 6, wykres 6). Obecność jednej modyfikacji dC^{sp} w oligomerze **B** (a w układzie dwuniciowym **BB** dwóch modyfikacji) prowadziła do powstania dupleksu o niższej trwałości. W omawianym przypadku modyfikacje poliaminowe były w dwóch różnych łańcuchach oligonukleotydowych. Takie układy nie były wcześniej przez nas badane. Destabilizacja może wynikać częściowo z odpychania się sprotonowanych dwóch reszt sperminy znajdujących się w strukturze dupleksu. W przypadku oligomeru **C**, z dwiema modyfikacjami poliaminowymi, nie powstaje kompleks dwuniciowy **CC** w warunkach pomiarowych. Prawdopodobnie leżące naprzeciw siebie sprotonowane grupy poliaminowe odpychają się, do tego stopnia, że nie tworzy się kompleks. Nietworzenie się kompleksu lub destabilizacja w omawianych modelach (biblioteka kombinatoryczna d(X₄T₄) i autokomplementarne oligomery) mogą być spowodowane przez różne czynniki. Na obecnym etapie badań dane te są zbyt fragmentaryczne, aby mogły posłużyć jako punkt wyjściowy dla głębszych spekulacji.



Wykres 6. Temperatury topnienia autokomplementarnych oligomerów: niemodyfikowanego oligomeru i posiadających jednostki modyfikowane sperminy (dC^{SP})

Tabela 6. Pomiar temperatur topnienia strukturu dwuniciowej oligonukleotydu autokomplementarnego ($X = C^{SP}$)

Symbol	L.m.	Sekwencja (5'-3')	dG_1 w 37°C (kcal / mol)	Tm_1 (°C, 1×10^{-4} M)	dG_2 w 37°C (kcal/mol)	Tm_2 (°C, 1×10^{-4} M)	Stężenie NaCl
AA	0	ACGTACGT	$-6,92 \pm 0,09$	45,1	$-7,18 \pm 0,04$	44,7	1 M
BB	2	AXGTACGT	$-4,89 \pm 0,08$	30,6	$-4,82 \pm 0,01$	30,0	1 M
CC	4	AXGTAXGT	nie udało się zmierzyć				1 M
AA	0	ACGTACGT	$-6,07 \pm 0,19$	40,5	$-5,89 \pm 0,03$	38,7	0,1 M
BB	2	AXGTACGT	$-5,14 \pm 0,04$	33,0	$-5,06 \pm 0,06$	32,7	0,1 M
CC	4	AXGTAXGT	nie udało się zmierzyć				0,1 M

L.m. – liczba modyfikacji poliaminowych w strukturze dwuniciowej

Podsumowując powyższy rozdział stwierdziłam, że trwałość kompleksów elementów biblioteki kombinatorycznej $d(X_4T_4)$, gdzie $X = dC$ lub dC^{SP} , z komplementarnym oligomerem $d(A_4T_4)$ dla jednej modyfikacji dC^{SP} powoduje wzrost trwałości struktury dwuniciowej. W przypadku dwóch modyfikacji obserwowałam zarówno stabilizację, destabilizację jak i brak wpływu na trwałość kompleksu. Trzy modyfikacje destabilizowały, natomiast cztery uniemożliwiały tworzenie się dupleksu. W przypadku trzech i czterech

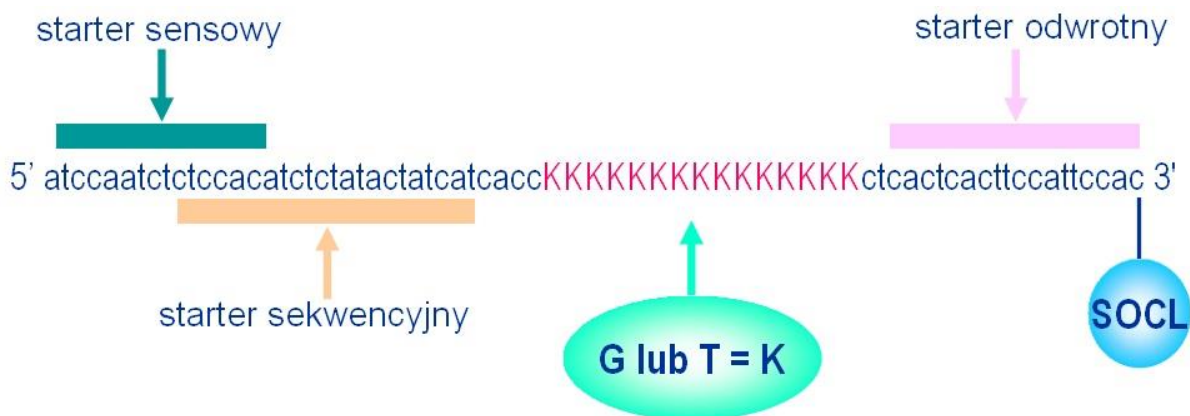
modyfikacji w bliskim sąsiedztwie w łańcuchu oligomeru prawdopodobnie może dochodzić do silnego odpychania obdarzonych ładunkiem dodatnim reszt sperminy, a w konsekwencji przyjmowania przez poliaminooligonukleotydy konformacji niekorzystnej dla utworzenia kompleksu dwuniciowego.

Na podstawie pomiaru temperatur topnienia nie można stwierdzić oddziaływań niespecyficznych wywołanych obecnością jednej sprotonowanej reszty sperminy w łańcuchu oligonukleotydowym. Nie obserwowałam tworzenia się kompleksu po zmieszaniu w równomolowych ilościach modyfikowanego oligomeru d(CC^{SP}CCTTTT) z niekomplementarnym oligomerem d(CCCCTTTT).

Obecność np. dwóch modyfikacji w jednym łańcuchu struktury dwuniciowej może wykazywać odmienny wpływ niż umieszczenie pojedynczych modyfikacji w dwóch łańcuchach (oligomer autokomplementarny z jedną modyfikacją). W tym przypadku może dochodzić do odpychania dwóch łańcuchów, natomiast, jeśli modyfikacje są umieszczone w jednym łańcuchu oligonukleotydowym prawdopodobnie dochodzi do zmiany konformacji tego łańcucha.

3.5. Analiza trwałości struktury trypleksowej DNA z wykorzystaniem oligonukleotydów i poliaminooligonukleotydów

Badania przeprowadzone wcześniej w Pracowni Chemii Biokunigatów [184, 185] dotyczyły poszukiwania sekwencji oligonukleotydów zdolnych do tworzenia kompleksu z dwuniciową sekwencją DNA promotora ludzkiego genu receptora epidermalnego czynnika wzrostu (HER2) [186]. W pracach tych [184, 185] została wykorzystana rozproszona biblioteka kombinatoryczna oligonukleotydów (SOCL) zawierająca 15-oligonukleotydowy ciąg dG lub T (rys. 15).



Rys. 15. Schemat SOCL z 15-nukleotydydowym fragmentem randomizowanym dG i T

Wśród elementów biblioteki SOCL składającej się z $2^{15} = 32768$ różnych oligonukleotydów znajdował się także oligonukleotyd o sekwencji kanonicznej, zdolny do tworzenia kompleksu z HER2. Sekwencja HER2 została wbudowana w znakowaną sondę o długości 33 nukleotydów (HER2PIN2) i wykazano, że kanoniczny oligomer d(GGTGGTGGTTGTGGT) przyłączony do podłoża stałego może oddziaływać z nią (rys. 16).



Rys. 16. Tworzenie trypleksu z wykorzystaniem rozproszonej biblioteki kombinatorycznej oligonukleotydów (SOCL) i znakowanej sondy HER2PIN2

Przeprowadzono selekcję oligonukleotydów spośród oligomerów tworzących rozproszoną kombinatoryczną bibliotekę oligonukleotydową (SOCL). W czasie selekcji biblioteki kombinatorycznej sondą HER2PIN2 znaleziono piętnaście elementów biblioteki (tabela 7) tworzących z nią silne kompleksy w warunkach sprzyjających tworzeniu trójniciowych DNA. Wśród tych oligonukleotydów był również oligomer o sekwencji kanonicznej **10**.

Zsyntetyzowano wszystkie 15-mery wyselekcjonowane i „odczytane” z biblioteki SOCL. Wykonano analizę PAGE na żelu natywnym ich kompleksów z sondą HER2PIN2. Warunki analizy elektroforetycznej były tak dobrane, aby sprzyjały tworzeniu struktur trypleksowych. Wszystkie oligonukleotydy (**1–15**) tworzyły bardzo trwałe kompleksy z HER2PIN2. Analiza ta nie ujawniła żadnych różnic w zdolności do tworzenia kompleksu pomiędzy wyselekcjonowanymi 15-merami (rys. 17). Z tego względu wykonano równoległe analizę poszczególnych aktywnych sekwencji z HER2PIN2 w systemie BIAcore (ang. *Biospecific Interaction Analysis*). Zastosowana technologia BIAcore [193–195] jest oparta

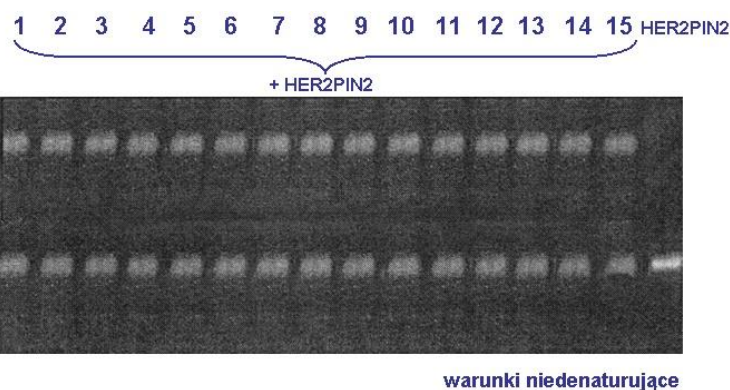
na zasadzie analizy powinowactwa i obrazuje oddziaływania dwóch lub więcej biomolekuł w rzeczywistym czasie, bez konieczności ich znakowania.

Detekcja sygnału oparta jest na zjawisku optycznego powierzchniowego rezonansu plazmowego (ang. *optical phenomenon of surface plasmon resonance – SPR*). Sygnał rezonansu mierzy się na powierzchni cienkiej błony metalowej

w warunkach całkowitej wewnętrznej refrakcji światła. Przedmiotem pomiaru są różnice współczynnika refrakcji. Zmiany te są bezpośrednio zależne od zmian stężenia badanych kompleksów na badanej powierzchni. Przeprowadzenie analizy BIAcore polega na immobilizacji jednego z oddziaływujących reagentów (w tym przypadku sondy HER2PIN2) na dekstranowej matrycy płytki sensorowej stanowiącej powierzchnię obszaru mikroprzepływu. Następnie poddawana jest próba zawierająca drugi reagent. Każda zmiana stężenia na powierzchni immobilizowanej matrycy dekstranowej zmienia współczynnik refrakcji, jest wykrywana jako tzw. sygnał SPR. Jest ona wyrażana w tzw. jednostkach rezonansu (ang. *resonance units – RU*). Na podstawie tej analizy można było oszacować ilościowo trwałość otrzymanych kompleksów (tabela 8).

Tabela 7. Wyselekcjonowane elementy biblioteki tworzące trypleks z HER2PIN3

<i>idealna</i>		GGTGGTGGTTGTGGT
No 1/15		TTTGGGTTTGGGTTT
No 2/15		TGTGTTTTTTGTGTG
No 3/15		GGTTGTTGGTGTGTT
No 4/15		TTGTGTGGGTGGTTG
No 5/15		TGTTTGTGGTGTTTT
No 6/15		TTGGTTTGGTTGTGG
No 7/15		GGTTGTGGTTGTGGG
No 8/15		TTTGGGTTTGGGTTG
No 9/15		GGGTGTGGGGTGGTG
No 10/15		GGTGGTGGTTGTGGT
No 11/15		GTTGGTGGTTTTTTTG
No 12/15		TTGGTTGGTTTTTGT
No 13/15		TGGGTGTGGGTTGTT
No 14/15		TGTTGTGTTGGTTGT
No 15/15		GGGTGTGGGTGTTTG



Rys. 17. Analiza PAGE na żelu natywnym 15-stu elementów aktywnych SOCL z sondą HER2PIN2

Chcąc bliżej przyjrzeć się otrzymanym strukturom postanowiłam przeprowadzić pomiary trwałości tworzonych kompleksów z wykorzystaniem spektrometrii w ultrafiolecie. W tym celu mieszałam z osobna każdy spośród 15-merów (**T1-T15**) z równomolową ilością nieznakowanej sondy HER2PIN2 tak, aby stężenie każdego oligomeru wynosiło 1 μ M. Wyznaczyłam dla tego stężenia, z wartości pierwszej pochodnej, temperaturę topnienia. Wykorzystałam piętnastomery, zawierające sekwencje wybrane z biblioteki kombinatorycznej jako zdolne do tworzenia kompleksu z sondą HER2PIN2, zawierającą sekwencję promotora ludzkiego epidermalnego czynnika wzrostu (HER2).

Mimo, że na podstawie analizy BIAcore i PAGE stwierdzono tworzenie się trwałych kompleksów [184], podczas pomiaru temperatury topnienia nieznakowanej HER2PIN2 z piętnastomerami odnotowałam tylko jedną wartość temperatury topnienia. Można było wyznaczyć tylko jeden zakres topnienia ok. 80 °C. Przykładową krzywą topnienia przedstawia wykres 7.

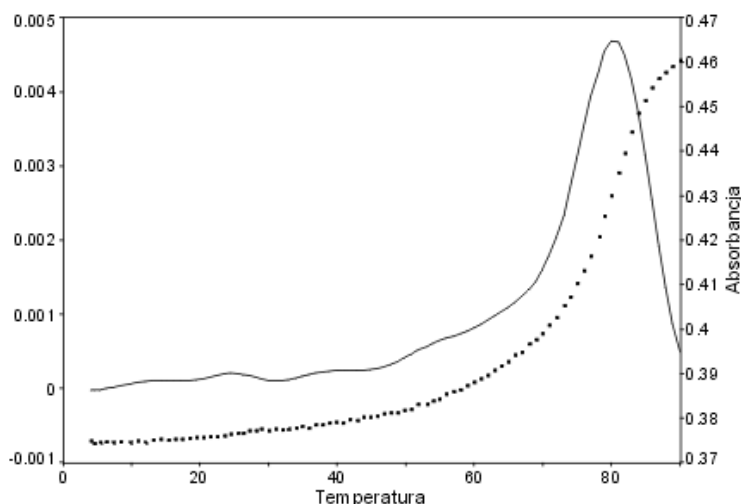
Doświadczenia topnienia struktury szpilkowej HER2PIN2 wykazały, że jej topnienie ma miejsce właśnie w temperaturze 80 °C. Pojawia się więc pozorna rozbieżność pomiędzy wynikami analiz przeprowadzonych poprzednio – selekcja SOCL, PAGE, BIAcore –a wynikami pomiaru topnienia kompleksu dwuskładnikowego: pentadekamer-HER2PIN2. Uważam, że sprzeczność ta jest pozorna i przemawia

raczej za utworzeniem bardzo trwałego kompleksu, który rozpada się dopiero, gdy rozpleceniu ulega dwuniciowa struktura szpilkowa HER2PIN2.

Otrzymany wynik skłonił mnie do postawienia pytania, czy badane kompleksy rzeczywiście tworzą struktury trypleksowe. Jeśli tak, to czy obecność struktury szpilkowej zmienia zdecydowanie trwałość tych trypleksów.

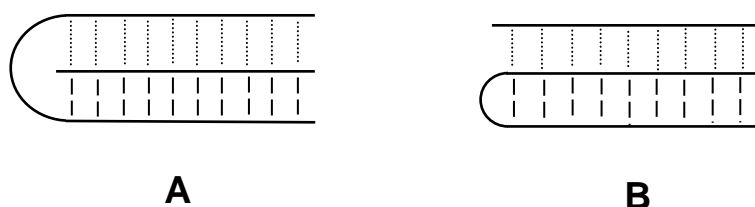
Tabela 8. Analiza BIAcore wyników hybrydyzacji 15-stu sekwencji z HER2PIN2 (RU – jednostka rezonansu)

Numer sekwencji	RU
9	154
1	152
15	150
3	149
10	141
13	139
8	118
14	116
12	110
5	104
11	88
2	57
6	56
7	39
4	35



Wykres 7. Krzywa topnienia oraz pierwsza pochodna struktury szpilkowej HER2PIN2 i T9

Analizując powyższy problem natrafiłam na prace Koola i współpracowników poświęcone kompleksom trypleksowym [180, 196]. Pozwoliły mi one spojrzeć na badany przez nas układ w nowy sposób. Kool i jego współpracownicy [196] wykorzystali do badań trypleksów układ dwucząsteczkowy, składający się z krótszego oligonukleotydu i ponad dwukrotnie dłuższego oligomeru. Krótszy oligomer był komplementarny do fragmentu dłuższego oligomeru tak, że pozostały fragment niekomplementarny dłuższego oligomeru, z założenia, tworzył strukturę szpilkową, a zarazem stanowił trzeci łańcuch trypleksu. Dla takiego kompleksu autorzy nie obserwowali niskotemperaturowego topnienia trypleksu. Natomiast dla tych samych sekwencji w układzie trójniciowym rejestrowali osobno topnienie struktury trypleksowej i dupleksowej. Autorzy doszli do wniosku, że zastąpienie w trypleksowej strukturze układu trójskładnikowego układem dwuskładnikowym prowadzi do znacznej stabilizacji trypleksu.



Rys. 18. Układy dwuskładnikowe wykorzystane do badań trypleksów: A – w zespole Koola; B – w Pracowni Chemii Biokoniugatów IChB PAN i przedstawiony w niniejszej pracy;

- - system oddziaływań Hoogsteena,
- - oddziaływania typu Warsona – Cricka.

Porównując badania Koola i współpracowników z problemem badanym przez nas (rys. 18) doszłam do wniosku, że obydwie badane struktury są topologicznie prawie identyczne. Różnica dotyczy jedynie połączenia dwóch z trzech nici składowych. W przypadku badanym przez Koola połączone (3'→5') są: jedna z nici podwójnej helisy z nicią przyłączoną systemem oddziaływań Hoogsteena do helisy dupleksu. W badanym przez nas przypadku połączone są nici heliakalnego dupleksu (HER2PIN2). Tym niemniej można moim zdaniem uznać takie układy za bardzo podobne i oczekiwać podobnych właściwości, a w przybliżeniu nawet uznać układy za identyczne.

Układ przedstawiony przez Koola oraz badane przeze mnie kompleksy tworzą struktury bardzo trwałe. A zatem aby osłabić oddziaływania wywołane obecnością struktury szpilkowej (rys. 19), „rozciąłam” ją, i dodałam po trzy jednostki nukleotydowe odpowiednio na 3'- i 5'-końcu zgodnie z naturalną sekwencją znaną w genomowym DNA [186] (rys. 20).

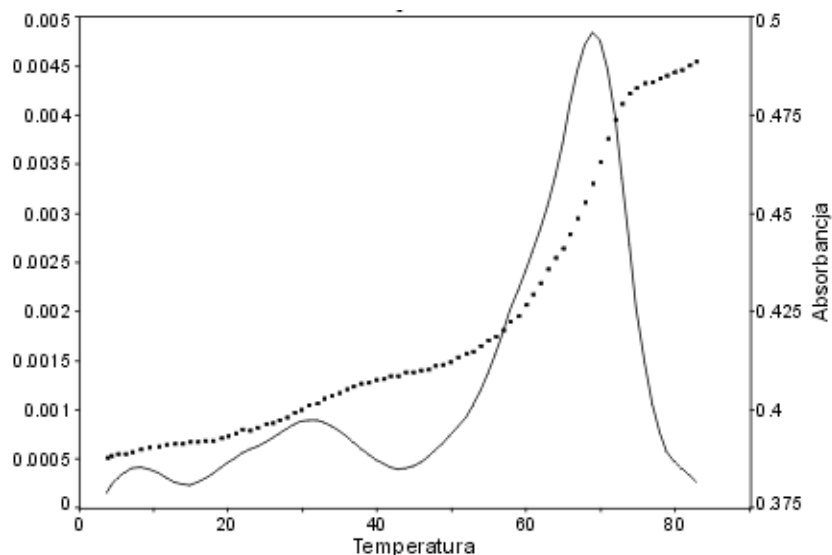


Rys. 19. Nieznakowana HER2PIN2 wykorzystana do pomiarów temperatury topnienia

Okazało się, że dla takich układów mogłam zaobserwować tworzenie się trypleksów z ośmioma z 15-stu piętnastomerów (tabela 9). Oligomer **T9** tworzył najtrwalszy kompleks (trypleks) podczas pomiaru temperatury topnienia, jak i analizy BIAcore [184]. Krzywą topnienia HER2 i **T9** przedstawia wykres 8.



Rys. 20. Sekwencja HER2 wykorzystana do pomiarów temperatury topnienia



Wykres 8. Krzywa topnienia oraz pierwsza pochodna struktury dwuniciowej HER2 i T9

Tabela 9. Temperatry topnienia trypleksów 2'-deoksyoligonukleotydów z HER2

	Sekwencja oligonukleotydu (5'-3')	Całkowita homologia [%]	Homologia w miejscu dopasowani [%]	T _{m1} (°C, 1 μM)	T _{m2} (°C, 1 μM)
T1	TTT GGG TTT GGG TTT	61	68	-	71,1
T2	GTG TTG TTT TTG TGT	80	80	-	70,2
T3	TTG TGT GGT TGT TGG	68	73	17,3	71,7
T4	GTT GGT GGG TGT GTT	64	73	14,6	71,8
T5	TTT TGT GGT GTT TGT	75	80	-	71,1
T6	GTT GTT GGT TTG GTT	70	80	-	71,7
T7	GGG TGT TGG TGT TGG	80	80	18,6	70,8
T8	GTT GGG TTT GGG TTT	58	71	-	71,8
T9	GTG GTG GGG TGT GGG	66	80	31,0	70,2
T10	GGT GGT GGT TGT GGT	100	100	14,1	70,3
T11	GTT TTT TGG TGG TTG	68	73	15,0	69,9
T12	TTG TTT TGG TTG GTT	75	75	-	71,5
T13	TTG TTG GGT GTG GGT	61	68	7,9	71,4
T14	TGT TGG TTG TGT TGT	70	70	-	70,1
T15	GTT TGT GGG TGT GGG	75	75	21,7	69,7

Postanowiłam wykorzystać modyfikacje poliaminonukleozydowe do zbadania dwóch spośród badanych kompleksów trypleksowych. Wybrałam sekwencje oligomerów **T9** i **T10**. Przy wyborze kierowałam się faktem, że oligonukleotyd **T9** wykazywał największą stabilność formy trypleksowej ($T_m=31,0^\circ\text{C}$). Kompleks oligomeru **T10** był mniej stabilny ($T_m=14,1^\circ\text{C}$), choć to właśnie ten oligonukleotyd ma sekwencję kanoniczną do sekwencji HER2. Postanowiłam wprowadzić po jednej modyfikacji poliaminowej do sekwencji **T9** i **T10**. Wykorzystałam do tego celu pochodną spermino-2'-deoksyguanozyny (dG^{SP}) i sperminotymidyny (T^{SP}). W wybranych sekwencjach modyfikacje poliaminowe umieszczone były w różnych pozycjach, blisko 3'- lub 5'-końca, albo pośrodku (tabela 10).

Tabela 10. Temperatury topnienia trypleksów z łańcuchem poliaminooligonukleotydowym

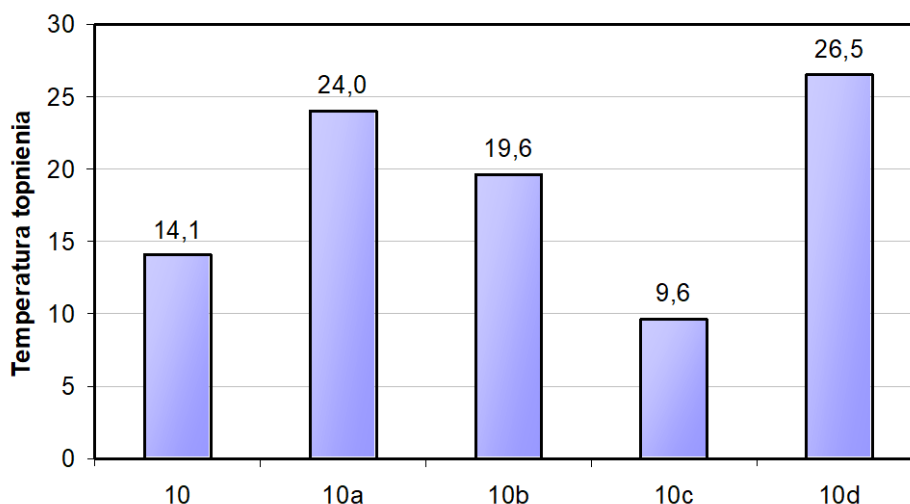
	Sekwencja oligonukleotydu (5'-3')	T_{m1} ($^\circ\text{C}$, 1 μM)	T_{m2} ($^\circ\text{C}$, 1 μM)
T9	GTG GTG GGG TGT GGG	31,0	70,2
T9a	G^{SP} GTG GTG GGG TGT GGG	29,5	69,8
T9b	G^{TSP} G GTG GGG TGT GGG	29,6	70,9
T9c	GTG GTG G^{SP} G TGT GGG	31,8	71,7
T9d	GTG GTG GGG T^{SP} GT GGG	27,7	71,3
T9e	GTG GTG GGG TGT G^{SP} G	28,0	70,4
T10	GGT GGT GGT TGT GGT	14,1	70,2
T10a	G^{SP} GT GGT GGT TGT GGT	24,0	71,5
T10b	GGT GGT G^{SP} T TGT GGT	19,6	70,8
T10c	GGT GGT G^{TSP} TGT GGT	9,6	70,0
T10d	GGT GGT GGT TGT G^{SP} T	26,5	70,2

Z doniesień literaturowych wynika, że spermino-2'-deoksyguanozyna stabilizuje kanoniczne struktury trypleksowe [179]. Również moje badania potwierdziły te informacje. W trypleksach HER2 z komplementarnymi oligomerami (**T10a,b,d**) posiadającymi modyfikację spermino-2'-deoksyguanozynową zaobserwowałam wzrost temperatury topnienia (wykres 9). Stabilizacja jest większa, jeśli modyfikowana spermino-2'-deoksyguanozyna znajduje się blisko 3'-końca lub na 5'-końcu oligonukleotydu (ΔT_m ok. 10°C). Umieszczenie modyfikacji dG^{SP} pośrodku łańcucha oligonukleotydu również

stabilizowało strukturę trypleksową, ale w mniejszym stopniu. Zmiana temperatury topnienia wynosiła ok. 5 °C.

Wprowadzenie do kanonicznej sekwencji **T10** jednostki sperminotymidyny (T^{SP}), wcześniej niewykorzystywanej do badań struktur trypleksowych, spowodowało destabilizację struktury trypleksowej: ΔT_m ok. -5 °C (wykres 9).

Okazało się, że w trypleksie HER2 z komplementarnym oligomerem **T10** obecność sperminotymidyny wyraźnie destabilizuje strukturę trójniciową. Temperatura topnienia trypleksu HER2 z **T10c** jest o 4,5 °C niższa niż dla niemodyfikowanego oligonukleotydu **T10**. Jeśli modyfikacja sperminowa znajdowała się w sąsiednim położeniu do T^{SP} (G^{SP}) obserwowaliśmy wzrost temperatury topnienia trypleksu (HER2·**T10b**) o 5,5 °C w porównaniu z trypleksem niemodyfikowanym.



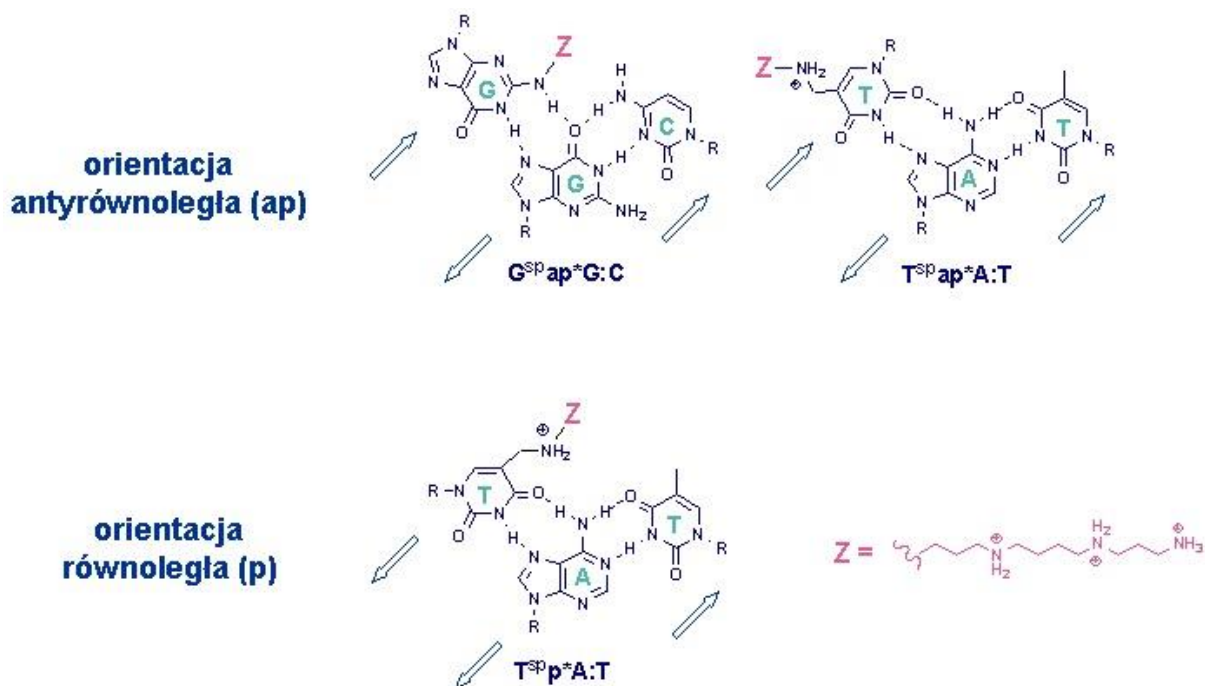
Wykres 9. Temperatury topnienia struktury trójniciowej HER2 i oligonukleotydów o komplementarnej sekwencji **T10** posiadających modyfikacje poliaminowe

Analiza trypleksu HER2·**T10c** pozwala wyciągnąć wnioski na temat wpływu modyfikacji poliaminowej w położeniu 5 tymidyny w antyrównoległej aranżacji trypleksu. Taki właśnie charakter ma badany przeze mnie trypleks HER2·**T10**. Jeśli spojrzymy na schemat triady $G^{SP}ap^*G:C$ z udziałem reszty 5-sperminotyminowej w aranżacji antyrównoległej (rys. 21), to widać, że łańcuch sperminy znajduje się w odmiennym położeniu niż w przypadku reszty sperminy w triadzie $G^{SP}ap^*G:C$. Z tak pobieżnej analizy trudno określić położenie reszty sperminy dokładniej. W tej sytuacji nie dziwi fakt, że i

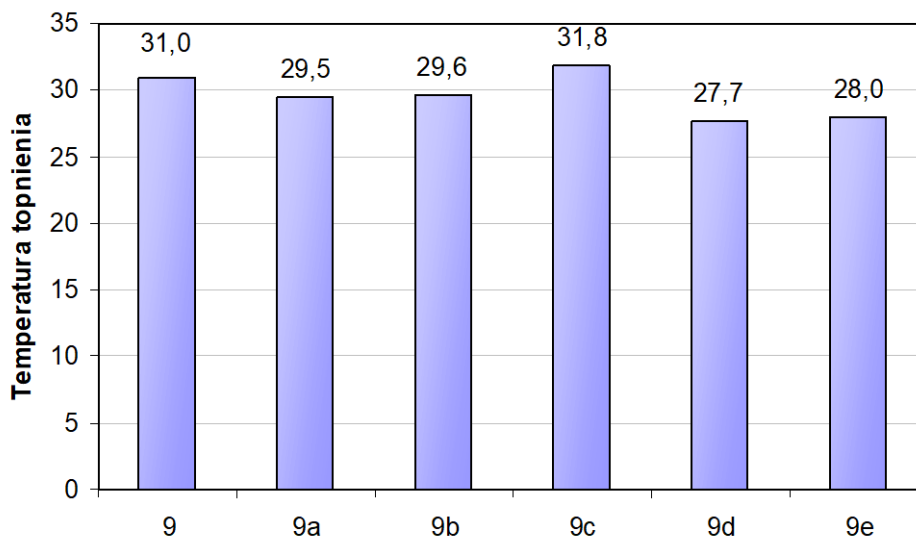
wpływ sperminy okazuje się destabilizujący w przypadku trypleksu o aranżacji antyrównoległej. Oligonukleotyd **T10**, a więc także **T10c**, może utworzyć kompleks trypleksowy z dupleksem HER2 tylko w aranżacji antyrównoległej.

Wpływ modyfikacji poliaminowej w położeniu 5 reszty tyminy może być jednak odmienny, jeśli będziemy analizowali kompleks trójniciowy w aranżacji równoległej. W triadzie $T^{SP}p^*A:T$, reszta poliaminowa znajdzie się w położeniu bardzo zbliżonym w sytuacji w triadzie $G^{SP}ap^*G:C$ (rys. 21), w której obserwuje się silny wpływ stabilizujący poliaminy. Można przewidywać, że jeśli sekwencja oddziałujących łańcuchów będzie narzucała aranżację równoległą w trypleksie, to modyfikacja poliaminowa T^{SP} będzie wyraźnie stabilizowała strukturę. Hipotezę powyższą należy oczywiście poddać weryfikacji.

W przypadku kompleksów HER2 z modyfikowanymi niekanonicznymi oligomerami **T9a-e** nie obserwowałam różnic temperatury topnienia otrzymanych kompleksów, zarówno dla oligonukleotydów z dG^{SP} , jak i T^{SP} . Obecność modyfikacji poliaminowych w niekanonicznym oligomerze **T9** nie ma wpływu na trwałość struktury trójniciowej (wykres 10). Stąd wniosek, że struktura ta ma inny charakter niż kanoniczny trypleks.



Rys. 21. Modele kanonicznych struktur trypleksowych pochodnych dG^{SP} i T^{SP}



Wykres 10. Temperaty topnienia struktury trójniciowej HER2 i oligonukleotydami o niekanonicznej sekwencji **T9** posiadających modyfikacje poliaminowe

Na podstawie badań opisanych powyżej można sądzić, że oligomery **T9** i **T10** tworzą z dupleksem HER2 kompleksy o odmiennej budowie, choć ich trwałość jest zbliżona.

Badania te wskazały moim zdaniem jeszcze jedną ważną cechę poliaminooligonukleotydów. Poliaminooligonukleotydy mogą służyć do strukturalnego „sondowania” kompleksów kwasów nukleinowych. Wprowadzenie modyfikacji pozwala odróżnić typowe struktury dupleksowe i trypleksowe od innych, niekonwencjonalnych. Badanie kompleksów z udziałem poliaminooligonukleotydów może być bardzo dobrym źródłem informacji poprzedzającym szczegółowe badania strukturalne.

Podsumowując badania dotyczące struktur trypleksowych skłaniam się do następujących wniosków:

- ↪ Kompleksy powstałe z piętnastoma oligonukleotydami, których sekwencje zostały znalezione z biblioteki kombinatorycznej zawierającej ponad 32 tysiące elementów, tworzą bardzo trwałe kompleksy ze strukturą szpilkową HER2PIN2.
- ↪ Otrzymane kompleksy nie ulegają topnieniu w niższych temperaturach typowych dla kompleksów trójniciowych.
- ↪ Wykorzystanie modyfikowanych poliaminooligonukleotydów pozwoliło na stwierdzenie odmiennego charakteru tworzonych kompleksów kanonicznych i niekanonicznych. Poliaminooligonukleotydy mogą znaleźć zastosowanie w

badaniach wstępnych, podczas określania struktury danego kompleksu, poprzedzających szczegółowe badania strukturalne. Szczególnie użyteczne mogą być obserwacje, że modyfikacja dG^{SP} stabilizuje strukturę kanoniczną trójniciową, a T^{SP} destabilizuje.

3.5.1. Dalsze perspektywy badania kompleksu HER2

Opisane przeze mnie badania kompleksów HER2 z oligonukleotydami wybranymi z biblioteki kombinatorycznej 15-merów dG/T pokazały, że kompleksy te są najprawdopodobniej inne niż kanoniczne struktury trypleksowe. Badania porównawcze kompleksu HER2·T10 i HER2·T9 wskazują inną strukturę tego ostatniego kompleksu, chociaż jest on trwalszy niż kanoniczny kompleks HER2·T10. Być może warto w przyszłości przeprowadzić bardziej szczegółowe badania strukturalne tego kompleksu za pomocą np. spektroskopii NMR. Wydaje się, że można byłoby je poprzedzić badaniami z wykorzystaniem modyfikacji o właściwościach fluorescencyjnych. Wprowadzenie sondy fluorescencyjnej i sondy wygaszającej fluorescencję, mogłoby ułatwić rozwiązanie struktury kompleksu HER2·T9. Podobne badania przeprowadził Darby i inni [197]. Do badania struktur dupleksowych, trypleksowych i kwadrupleksowych wykorzystali oni oligonukleotydy znakowane resztami fluorescencyjnymi i wygaszającymi fluorescencję. Kiedy obie modyfikacje znajdowały się w bliskim sąsiedztwie dochodziło do wygaszania fluorescencji. Różne rozmieszczenie sond w kompleksach pozwoliłoby na bliższe określenie badanej struktury. Mam nadzieję, że podobne badania uda się zrealizować w przyszłości w IChB PAN.

4. PODSUMOWANIE

W prowadzonych przeze mnie badaniach zajmowałam się dwoma zagadnieniami: syntezą chemiczną i badaniem właściwości poliaminooligonukleotydów.

- ↪ Opracowałam syntezę prekursorów poliamino-2'-*O*-metylorybonukleozydów dla adenozyiny i cytydyny. Reakcję metylowania prowadziłam na nieblokowanych nukleozydach. Jako czynnik metylujący wybrałam diazometan, mimo tworzenia się dwóch izomerów: 2'-*O*-metylo i 3'-*O*-metylonukleozydów. Mieszaninę izomerów poddałam reakcji z odczynnikiem Markiewicza [21]. Grupa TIPDSi w przypadku 2'-*O*-metylowanego izomeru przyłącza się do funkcji 5'- i 3'-hydroksylowych, natomiast w pochodnej 3'-*O*-metylowanej siliowaniu uległa tylko pozycja 5'-OH. Przez zastosowanie wspomnianej blokady otrzymałam pochodne, które mogłam łatwo oczyścić z wykorzystaniem chromatografii kolumnowej. Otrzymane związki przeprowadziłam w odpowiednie prekursory, wprowadzając pierścień triazolowy w pozycję *N*-6 pochodnej adenozyiny i grupę *p*-toluenosulfonową w pozycji *N*-4 pochodnej cytozyny. Z 5'-*O*-dimetoksytrytylowych prekursorów otrzymałam pochodne poliaminowe, a następnie ich 3'-amidofosforyny.
- ↪ Zoptymalizowałam syntezę poliamino-2'-deoksynukleozydów i 3'-amidofosforynów dla wszystkich czterech 2'-deoksynukleozydów przedstawionych w pracy doktorskiej Przemysława Godziny [183]. Szczególną uwagę poświęciłam reakcji utleniania 3',5'-di-*O*-acetylotymidyny do 5'-formylo-3',5'-di-*O*-acetylo-2'-deoksyurydyny. Wykonałam liczne eksperymenty mające na celu poprawienie wydajności, zmieniając między innymi następujące czynniki: czas reakcji, rodzaj rozpuszczalnika oraz obecność dodatkowego katalizatora. Grypa formylowa bierze udział podczas reakcji przyłączania poliaminy tworząc zasadę Schiffa. Próby poprawienia wydajności przez

zmianę rozpuszczalnika, wprowadzenie katalizatora przeniesienia fazowego (np.: siarczanu tetrabutylamonowego lub soli sodowej kwasu *p*-toluenosulfonowego) nie przyniosły oczekiwanych rezultatów.

↪ Z uzyskanych amidofosforinów otrzymałam poliamino-2'-deoksyoligonukleotydy, które wykorzystałam do badania właściwości poliaminooligonukleotydów. Zsyntetyzowałam również modelowe oligonukleotydy posiadające jednostki poliamino-2'-*O*-metyloadenozyny lub poliamino-2'-*O*-metylocytozyny.

Zastosowanie poliaminooligonukleotydów np.: w terapii antysensowej i antygenowej wymaga przeprowadzenia licznych badań, między innymi: trawień enzymatycznych i pomiaru trwałości termodynamicznej kompleksów zawierających jednostki poliaminonukleotydowe.

↪ Prowadziłam badania wpływu modyfikacji sperminy zasad nukleinowych DNA na ewentualne zwiększenie trwałości modyfikowanych DNA podczas hydrolizy za pomocą enzymów nukleolitycznych. Do trawień enzymatycznych wykorzystałam zarówno egzonukleazę trawiącą oligonukleotydy od końca 5', fosfodiesterazę I (PDE I) z jadu węża, jak i hydrolizującą od końca 3', fosfodiesterazę II (PDE II) ze śledziona wołowej. Stwierdziłam częściowy efekt ochronny niektórych modyfikacji, choć jest on stosunkowo niewielki i nie ma znaczenia praktycznego takiego jak np. modyfikowanie wiązania internukleotydowego.

↪ Określiłam trwałość dupleksów utworzonych z udziałem poliamino-2'-deoksyoligonukleotydów badanych wcześniej metodami chemii kombinatorycznej [108, 183]. Pomiar temperatury topnienia wykonałam dla biblioteki kombinatorycznej oktameru randomizowanej w czterech pozycjach pochodnymi 2'-deoksycytydyny lub poliamino-2'-deoksycytydyny (dC^{SP}). Każdy element biblioteki został osobno zsyntetyzowany i poddany hybrydyzacji z komplementarnym oligonukleotydem. Oligomery z jedną, dwiema i trzema modyfikacjami tworzyły struktury dwuniciowe. Stwierdziłam silnie stabilizujący wpływ jednej modyfikacji sperminą na trwałość struktur dupleksowych. Oligomery zawierające dwie modyfikacje wykazują efekt albo stabilizujący albo destabilizujący albo nie wpływają na trwałość dupleksu. Obecność trzech modyfikacji powodowała destabilizację dupleksu. Wyraźnie widoczny jest jednak wpływ stabilizujący trzech modyfikacji dC^{SP}

w roztworze o niższym stężeniu soli (0,1 M NaCl). Ten wzrost trwałości kompleksów jest zgodny zarówno z obserwacjami analizy całej biblioteki kombinatorycznej, jak i z kationowym charakterem poliaminooligonukleotydów. Oligonukleotyd z czterema modyfikacjami poliaminowymi nie tworzył struktury dupleksowej. Powyższe eksperymenty pokazały zasadność stosowania bibliotek kombinatorycznych podczas badania trwałości dupleksów modyfikowanych oligonukleotydów.

↪ Przeprowadziłam badania trwałości struktur trypleksowych DNA na podstawie pomiaru temperatury topnienia metodą UV. Do analizy struktury trypleksowej oligonukleotydów wykorzystywałam piętnastomery zdolne do tworzenia kompleksu z dsDNA zawierającym sekwencję promotora ludzkiego receptora czynnika wzrostu (HER2) [186]. Sekwencja ta była „wpisana” w jednoniciowy nieznakowany łańcuch tworzący strukturę szpilkową HER2PIN2, a także jako element dwuniciowy HER2. Zbadałam oddziaływania piętnastu oligomerów wyselekcjonowanych za pomocą znakowanej HER2PIN2 z biblioteki kombinatorycznej składającej się z ponad 32 tysięcy elementów (32678) [184, 185]. Powstałe kompleksy piętnastu oligomerów z nieznakowaną HER2PIN2 okazały się bardzo trwałe. Kompleksy te nie ulegały topnieniu w niskich temperaturach typowych dla trypleksów trójniciowych. Aby osłabić oddziaływania wywołane obecnością struktury szpilkowej, „rozciąłam” ją i dodałam po trzy jednostki nukleotydowe na 3'- i 5'-końcu zgodnie z naturalną sekwencją znaną w genomowym DNA, otrzymując dwuniciowy kompleks HER2. Trójskładnikowe kompleksy składające się z HER2 i 15-merów wykazywały niskotemperaturowy efekt topnienia.

↪ Wykonałam również analizę trwałości struktury trypleksowej z wykorzystaniem poliamino-2'-deoksyoligonukleotydów. Trwałość otrzymanych struktur oceniłam na podstawie pomiaru temperatury topnienia metodą UV. Do analizy porównawczej wykorzystywałam sekwencję **T10** tworzącą kanoniczny trypleks z sekwencją HER2 oraz sekwencję **T9** tworzącą najtrwalszy kompleks o nieznannej strukturze z dwuniciową HER2. Użyte poliaminooligonukleotydy posiadały po jednej modyfikacji poliaminowej: albo spermino-2'-deoksyguanozynę (dG^{SP}) albo sperminotymidynę (T^{SP}). Okazało się, że obecność sperminotymidyny destabilizuje kanoniczną strukturę trypleksową o aranżacji antyrównoległej. Moje badania potwierdziły efekt stabilizujący jednostki spermino-2'-deoksyguanozynowej. Wykazałam, że

modyfikacje poliaminowe, dG^{sp} jak i T^{sp} , nie wpływają na trwałość niekanonicznego trypleksu HER2 z oligomerem **T9**. Trypleks powstały z HER2 i niekomplementarnego oligonukleotydu **T9** musi mieć odmienną naturę niż trypleks HER2 z komplementarnym oligomerem **T10**. Innymi słowy wykorzystanie modyfikacji poliaminowych pozwoliło mi na określenie odmiennego charakteru trypleksów „kanonicznych” i „niekanonicznych”. Dlatego uważam, że poliaminooligonukleotydy mogą służyć do „sondowania” struktury kompleksów kwasów nukleinowych. Wykorzystanie oligonukleotydów modyfikowanych za pomocą reszt poliaminowych może być bardzo dobrym narzędziem poprzedzającym szczegółowe badania strukturalne innymi technikami badawczymi.

5. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

5.1. Odczynniki chemiczne

5.1.1. Rozpuszczalniki

W pracy doświadczalnej wykorzystano niżej podane rozpuszczalniki, przygotowane według zamieszczonych opisów. Rozpuszczalniki przechowywano nad sitami molekularnymi 3Å firmy Merck.

Nazwa rozpuszczalnika	Producent	Stopień czystości	Sposób oczyszczania
Acetonitryl	PCK Schwedt	cz.	Destylowano.
Acetonitryl	Baker, Romil	cz.d.a.	Użyto bezpośrednio.
Benzen	POCh Gliwice	cz.d.a.	Ogrzewano z wodorkiem wapnia (II) – CaH ₂ pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano; przechowywano nad sitami.
Bezwodnik octowy	POCh Gliwice	cz.	Destylowano; przechowywano nad sitami.
Chlorek etylenu	POCh Gliwice	cz.	Zasypywano tlenkiem fosforu (V) – P ₂ O ₅ ; następnego dnia destylowano znad P ₂ O ₅ .
Chlorek metylenu	Merck	cz.d.a.	Przechowywano nad sitami.
Chlorek metylenu	POCh Gliwice	cz.	Sączono przez kolumnę wypełnioną tlenkiem glinu (III) – Al ₂ O ₃ .
Eter dietylowy	POCh Gliwice	cz.d.a.	Destylowano znad CaH ₂ ; przechowywano nad sitami.
<i>N,N</i> -Dimetyloformamid (DMF)	POCh Gliwice	cz.d.a.	Destylowano pod zmniejszonym ciśnieniem; przechowywano nad sitami.
1,2-Dimetoksyetan	Aldrich	99%	Użyto bezpośrednio.
1,4-Dioksan	POCh Gliwice	cz.	Sączono przez kolumnę wypełnioną Al ₂ O ₃ , następnie ogrzewano z CaH ₂ pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano; przechowywano nad sitami.
Nitrometan	POCh Gliwice	cz.d.a.	Destylowano.
Octan etylu	POCh Gliwice	cz.d.a.	Ogrzewano z CaH ₂ pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano; przechowywano nad sitami.
Pirydyna	Loba Feinchemie	cz.d.a.	Destylowano znad P ₂ O ₅ , po czym ogrzewano z CaH ₂ pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano; przechowywano nad sitami.
Pirydyna	POCh Gliwice	cz.	Kilka dni przechowywano nad wodorotlenkiem potasu; pozostałe czynniki j. w.
Tetrahydrofuran (THF)	POCh Gliwice	cz.	Sączono przez kolumnę wypełnioną Al ₂ O ₃ , następnie ogrzewano z CaH ₂ pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i

			destylowano; przechowywano nad sitami.
Toluen	POCh Gliwice	cz.d.a.	Destylowano; przechowywano nad sitami.
Nitrometan	POCh Gliwice	cz.d.a.	Destylowano.

5.1.2. Reagenty

W pracy doświadczalnej wykorzystano następujące reagenty, które wcześniej zostały odpowiednio oczyszczone:

Nazwa reagenta	Producent	Stopień czystości	Sposób oczyszczania
Chlorek benzoilu	POCh Gliwice	cz.d.a.	Destylowano.
Chlorek tionylu	POCh Gliwice	cz.	Destylowano.
Chlorek trimetylosililu (TMSCl)	POCh Gliwice	cz.	Destylowano.
1H-Tetrazol	Flucka	cz.	Sublimowano.
Trietyloamina	Flucka	cz.d.a.	Ogrzewano z CaH ₂ pod chłodnicą zwrotną ok. 8 godz. i destylowano.

Niżej wymienione reagenty wykorzystano do reakcji bezpośrednio, bez wcześniejszego oczyszczania.

Nazwa reagenta	Producent	Stopień czystości
Adenozyna	Reanal Budapest	–
Akrylamid	Serva	cz.d.a.
Alkohol <i>tert</i> -butylowy	Merck	> 99%
Amoniak, wodny roztwór (32%)	Merck	cz.d.a.
Azodikarboksylan dietylu (DEAD)	Aldrich	97%
Azotan (III) sodu	POCh Gliwice	cz.d.a.
Bezwodnik trifluoroctowy	Fluka	> 98%
Błękit bromofenolowy	Aldrich	~ 95%
Błękit ksylencyjanolowy	Aldrich	~ 75%
Błękit metylenowy	POCh Gliwice	cz.d.a.
Chlorek cyny (II) dwuwodny	Aldrich	98%
Chlorek 4,4'-dimetoksytrytylu (DMTCl)	Ifotam Co. Ltd.	98%
Chlorek sodu	Fluka	–
Chlorek sodu	POCh Gliwice	cz.
Czteroboran sodu	POCh Gliwice	cz.d.a.
Cytozyna	Pharma Waldhof	–
2'-Deoksyadenozyna	Pharma Waldhof	97%
2'-Deoksycytydyna	Pharma Waldhof	97%
2'-Deoksyganozyna	Pharma Waldhof	97%
4-Dimetyloaminopirydyna (DMAP)	Fluka	> 98%
1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksan (TIPDSiCl ₂)	Ifotam Co. Ltd.	98%
Dwuwodorooortofosforan potasu	POCh Gliwice	cz.d.a.
Etylotiotetrazol	Ifotam Co. Ltd.	99%
Formamid	Loba Feinchemie	cz.
Heksametylodisilazan (HMDS)	POCh Gliwice	cz.
Jod sublimowany	Merck	>99,5%
Kokodylan sodu	Sigma	–
Kwas dichlorooctowy	Aldrich	99%
Kwas fluorowodorowy (70% w pirydynie)	Aldrich	–
Kwas ortofosforowy	POCh Gliwice	cz.d.a.
Kwas siarkowy	POCh Gliwice	–
Kwas solny (35%)	POCh Gliwice	–

2,6-Lutydyna	Aldrich	99%
<i>N,N'</i> -Metylenobisakrylamid	Serva	cz.d.a.
Metyloamina (41% wodny roztwór)	Fluka	–
<i>N</i> -Metyloimidazol	Aldrich	99%
<i>N</i> -Metylomocznik	Aldrich	97%
Mocznik	Promega, Aldrich	cz.d.a.
Nadsiarczan amonu (APS)	Aldrich	99,2%
Nadsiarczan potasu	POCh Gliwice	cz.d.a.
2-(4-Nitrofenylo)etanol	Fluka, Aldrich	> 98%
Octan amonu	Aldrich	cz.d.a.
1,4-Piperazynobis(etanosulfonian) sodu (PIPES)	Sigma	–
Polifluorowodorek poliwinylpirydyny (PVPHF)	Aldrich	–
Putrescyna	Aldrich	99%
Siarczan miedzi (II) pięciowodny	POCh Gliwice	cz.d.a.
Siarczan sodu bezw.	POCh Gliwice	cz.d.a.
Sól dwusodowa kwasu etylenodwuaminoczteroocowego (EDTA)	Fluka	–
Sól dwusodowa kwasu etylenodwuaminoczteroocowego (EDTA)	POCh Gliwice	cz.
Sól sodowa kwasu <i>p</i> -toluenosulfonowego	POCh Gliwice	cz.d.a.
Spermina	Fluka	≥ 99%
Sulfotlenek dimetylu (DMSO)	Ubichem	cz.
<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametyloetylenodiamina (TMEDA)	Sigma	99%
Trifenylofosfina	Organica	–
Tris(hydroksymetylo)aminometan (TRIS)	Loba Feinchemie	cz.
Tymidyna	Pharma Waldhof	97%
Woda amoniakalna	POCh Gliwice	cz. d. a.
Wodorooortofosforan sodu	POCh Gliwice	cz.
Wodorotlenek tetrabutylamonowy (40%)	Fluka	–
Wodorotlenek potasu	POCh Gliwice	cz.d.a.
Wodorowęglan sodu	POCh Gliwice	cz.
Wodzian hydrazyny (80%)	POCh Gliwice	cz.

Do trawienia oligonukleotydów użyto enzymy: (i) fosfodiesterazę I (PDE I) z jadu węża z firmy Biochemicals; (ii) fosfodiesterazę II (PDE II) ze śledziona wołowej z firmy Pharmacia.

5.2. Aparatura

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

Widma masowe FAB zostały zarejestrowane na spektrometrze AMD 402 firmy AMD Interactra (Niemcy).

Widma masowe ES zostały zarejestrowane na aparacie ZQ Waters Micromass (USA).

W celu usunięcia warstwy emulsyjnej tworzącej się w trakcie przerobu 5'-*O*-dimetoksytrytylowanych poliaminonukleozydów, wodno-organiczne mieszaniny poreakcyjne wirowano w wirówce firmy Beckman (USA) – model J2-21 – z prędkością 16 tys. obr. na minutę.

Oligonukleotydy syntetyzowano na automatycznym syntetyzerze DNA zaprojektowany i wykonany w Pracowni Chemii Biokoniugatów IChB PAN w Poznaniu.

Amoniakalne lub wodne frakcje oligonukleotydowe odparowywano w wirówce próżniowej Univapo 150H firmy UniEquip (Niemcy).

Pomiary trwałości termodynamicznej dupleksów i trypleksów prowadzone były na spektrofotometrze DU-640 firmy Beckman (USA) z termoprogramem. Pomiary absorpcji dokonywane były w zakresie 4 - 80°C, zmieniając temperaturę próbki o 1°C na minutę. Zmiany absorpcji mierzono przy długości 260 nm. Absorpcja każdej próbki była mierzona co 24 sekundy.

Widma UV wykonano przy użyciu spektrometru DU[®]-65 firmy Beckman (USA).

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

5.3. Techniki ogólne

5.3.1. Chromatografia cienkowarstwowa – TLC (ang. Thin Layer Chromatography)

Mieszaniny reakcyjne i związki chemiczne chromatografowano metodą wstępującą w cylindrycznych komorach szklanych, których ścianki wyłożono bibułą zanurzoną w eluencie w celu wysycenia atmosfery jego parami. Chromatogramy rozwijano i analizowano na płytkach analitycznych firmy Merck (Niemcy) pokrytych dwoma rodzajami adsorbentu: (I) żelem krzemionkowym 60 HF₂₅₄ stosując następujące eluenty:

- (A) chlorek metylenu / metanol (9:1, v/v);
- (B) chlorek metylenu / metanol (95:5, v/v);
- (C) chlorek metylenu / metanol (5:1, v/v);
- (D) octan etylu / toluen (3:1, v/v);
- (E) metanol / 40% wodny roztwór metyloaminy / woda (7:1:2, v/v);
- (F) octan etylu / trietyloamina (9:1, v/v)
- (G) octan etylu / heksan / trietyloamina (45:45:10, v/v)

oraz (II) żelem krzemionkowy 60 F₂₅₄ silanizowanym, stanowiącym tzw. fazę odwróconą (ang. *reverse phase*) stosując eluenty:

- (H) metanol / 40% wodny roztwór metyloaminy / woda (7:1:2, v/v);
- (I) aceton / woda (7:1, v/v).

5.3.2. Kolumnowa chromatografia cieczowa

Modyfikowane nukleozydy i ich 3'-amidofosforiny oczyszczano stosując technikę kolumnowej chromatografii cieczowej. Jako wypełnienia kolumn używano żel krzemionkowy (o uziarnieniu 0,040-0,063 i 0,063-0,200 mm) albo żel krzemionkowy silanizowany do tzw. fazy odwróconej. Wykorzystano żełe firmy Merck. Związki wymywano z kolumn stosując dwie metody: (I) metodę gradientową, polegającą na zmianie składu procentowego eluentu, a tym samym zmianie siły jego eluowania lub (II) metodą izokratyczną, w której skład procentowy eluentu nie ulega zmianie. Wykorzystano takie same elenty jak w przypadku chromatografii cienkowarstwowej.

5.3.3. Odczynniki do elektroforezy metodą PAGE (ang. Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Żel poliakrylamidowy 20% przygotowano rozpuszczając 420 g mocznika w 500 ml 40% akrylamidu, następnie dodawano 50 ml roztworu TBE (10×stęż.). Roztwór uzupełniano wodą do objętości 1 litra i sączono na pompce wodnej przez lejek zaopatrzony w bibułę Whatmana. Tak przygotowany roztwór polimeryzował po dodaniu 500 μ l 10% wodnego roztworu APS oraz 80 μ l TMEDA (w przeliczeniu na 100 ml żelu).

Analogicznie przygotowano 7 i 15% żel poliakryloamidowy. Żel wykorzystano do oczyszczania oligomerów dłuższych niż 20 jednostek nukleotydowych.

Aby sporządzić 40% akrylamid, 380 g akrylamidu i 20 g *N,N'*-metylenobisakrylamidu rozpuszczano w 800 ml wody, po czym roztwór dopełniano do objętości 1 litra.

Roztwór TBE (10×stęż.) przygotowano rozpuszczając 108 g TRIS, 55 g kwasu bornego i 7,7 g EDTA w 700 ml wody i dopełniając wodą do objętości 1 litra.

Bufor fosforanowy (pH = 5,0) wykorzystany do elektroforetycznego oczyszczania poliaminooligonukleotydów przygotowano analogicznie do buforu TBE, przy czym zamiast kwasu bornego użyto odpowiednią objętość kwasu ortofosforowego.

Barwnik do elektroforezy sporządzano rozpuszczając 5 mg błękitu bromofenolowego oraz 5 mg błękitu ksylenocyjanolowego w 4,75 ml formamidu i 0,25 ml buforu TBE (10×stęż.). Przed naniesieniem barwnika na żel rozcieńczano go pięciokrotnie w formamidzie. Błękit metylenowy przygotowano j.w.

5.3.4. Synteza i oczyszczanie oligodeoksynukleotydów

Oligonukleotydy otrzymywano zautomatyzowaną metodą amidofosforynową na podłożu stałym CPG (załadowanie 20 – 30 $\mu\text{mol/g}$) lub podłożu polistyrenowym Primer firmy Pharmacia LKB. Do syntezy wykorzystano program zamieszczony w tabeli 9.

Tabela 11. Opis syntezy oligodeoksynukleotydów i poliaminooligonukleotydów metodą amidofosforynową wykorzystaną w pracy

Etapy	Zastosowany odczynnik	Czas [s]	Przepływ [ml/min.]
Etap początkowy	CH ₃ CN (A)	10	2,0
Cykl wydłużania łańcucha	CH ₃ CN (A)	60	2,0
	Tetrazol	6	1,0
	Amidofosforyn	6	0,5
	Tetrazol	3	1,0
	CH ₃ CN (A)	6	2,0
	CH ₃ CN (A)	180	0,25
	CH ₃ CN (B)	18	2,5
	Roztwór „kapujący” (A)	2	2,5
	Roztwór „kapujący” (B)	2	2,5
	Roztwór „kapujący” (A)	2	2,5
	Roztwór „kapujący” (B)	2	2,5
	Roztwór „kapujący” (A)	2	2,5
	Roztwór „kapujący” (B)	2	2,5
	Roztwór „kapujący” (A)	2	2,5
	Roztwór „kapujący” (B)	2	2,5
	CH ₃ CN (B)	6	2,5
	CH ₃ CN (B)	30	0,25
	I ₂	6	2,5
	CH ₃ CN (B)	30	2,5
	C ₂ H ₄ Cl ₂	60	2,0
DCA	60	2,0	
C ₂ H ₄ Cl ₂	60	2,0	

CH₃CN (A) – acetonitryl cz.d.a. (Romil)

CH₃CN (B) – acetonitryl cz. destylowany (PCK Schwedt)

Roztwór „kapujący” (A) – 2,6-lutydyna / N-metyloimidazol / CH₃CN, 3:8:60 (v/v)

Roztwór „kapujący” (B) – bezwodnik octowy / CH₃CN, 3:60 (v/v)

Oligonukleotydy analizowano i oczyszczano elektroforetycznie na 15 lub 20% żelu akryloamidowym. Oligonukleotydy wizualizowano na płycie zawierającej fluorofor z użyciem lampy UV przy długości fali 254 nm. Oligomery wymywano wodą z wcześniej zmacerowanego żelu i po 24 godz. wodne roztwory sączono i zatężono w wirówce

próżniowej do objętości ok. 0,8 ml. Otrzymane roztwory nanoszono na kolumny NAP-25 firmy Pharmacia LKB wypełnione Sephadexem G-25, w celu odseparowania oligonukleotydu od związków niskocząsteczkowych. Zebrane frakcje odparowano do sucha w wirówce próżniowej.

5.3.5. Powtarzalne procedury laboratoryjne

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

Organiczne ekstrakty, otrzymywane w wyniku przerobu reakcji suszono nad bezwodnym siarczanem sodu.

Czyste produkty reakcji liofilizowano z 1,4-dioksanu lub benzenu. W tym celu związek rozpuszczano w niewielkiej ilości rozpuszczalnika. Otrzymany roztwór zamrażano w ciekłym azocie i prowadzono sublimację rozpuszczalnika na linii próżniowej przez kilka do kilkunastu godzin.

5.3.6. *N*-metylo-*N*-nitrozomocznik

Metylomocznik (11,9 g, 156 mmola) i azotan (III) sodu (21,5 g, 312 mmola) rozpuszczono w wodzie (78 ml) i dodano eteru dietylowego (156 ml). Mieszaninę reakcyjną mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego. Schłodzono do temp. 0 °C wykorzystując mieszaninę chłodzącą: woda - lód. Następnie wkraplano stęż. kwas solny (26,4 ml) przez 15 minut, tak aby temp. nie przekroczyła 5 °C. Po dodaniu całej ilości stęż. kwasu solnego mieszaninę reakcyjną jeszcze przez 30 min. mieszano i chłodzono. Wytrącony osad odsączono i przemyto wodą na lejku piankowym przy użyciu pompki wodnej i osuszono w eksykatorze nad P_2O_5 . Otrzymano 14,44 g *N*-metylo-*N*-nitrozomocznika; wyd.: 90%.

Przesącz rozdzielono w rozdzielaczu i warstwę organiczną dwukrotnie przemyto wodą (po 78 ml), a następnie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostawiono do wysuszenia na linii próżniowej. Otrzymano 1,13 g *N*-metylo-*N*-nitrozomocznik. Całkowita wydajność 97%.

5.3.7. Roztwór diazometanu w 1,2-dimetoksyetanie (CH_2N_2 / DME)

Reakcję prowadzono energicznie mieszając przy użyciu mieszadła magnetycznego, w temperaturze od -5 °C do 0 °C wykorzystując mieszaninę chłodzącą: lód - NaCl_{aq} . Naczynie reakcyjne schłodzono do temp. -5 °C i umieszczono w nim 40% roztwór KOH (11,3 ml) i 1,2-dimetoksyetan (17,1 ml). Stopniowo dodawano *N*-metylo-*N*-nitrozomocznik (3,4 g) przez

ok. 10 minut tak, aby temperatura nie przekroczyła 0°C. Reakcję prowadzono jeszcze przez 20 minut. Następnie mieszaninę reakcyjną rozdzielono w rozdzielaczu wcześniej schłodzonym w zamrażarce. Warstwę wodną dwukrotnie przemyto DME i połączone frakcje organiczne osuszono nad KOH. Roztwór przechowywano w zamrażarce.

5.3.8. 1,2-bis[(dimetyloamino)metyleno]hydrazyna

Do destylowanego DMF (225 ml, 2,9 mola) chłodzonego na łaźni lodowej (ok. 0 °C) wkroplono chlorek tionylu (43 ml, 0,59 mola) przez 5 minut. Po 2 godz. dodano porcjami roztwór 80% wodzianu hydrazyny (7,5 ml, 0,15 mola) w DMF (30 ml). Po 1,5 godz. dodano 100 ml acetonu. Wytrącony w czasie reakcji dichlorowodorek 1,2-bis[(dimetyloamino)metyleno]hydrazyny odsączono na lejku piankowym i przemyto dwukrotnie eterem dietylowym otrzymano po osuszeniu w eksykatorze 23,4 g związku; wyd.: 73%.

Dichlorowodorek 1,2-bis[(dimetyloamino)metyleno]hydrazyny (23,4 g, 0,1 mola) rozpuszczono w 54 ml H₂O i dodano Na₂CO₃ (11,8 g, 0,1 mola) rozpuszczony wcześniej w 54 ml H₂O. Warstwę wodną ekstrahowano ponad dwadzieścia razy eterem dietylowym, który odparował pod dygestorium w krystalizatorach. Otrzymano 14,6 g krystalicznej białej substancji; wyd.: 94%.

5.3.9. Azotyn *tert*-butylowy (TBN)

Roztwór 38 g (0,55 mola) NaNO₂ w 150 ml H₂O mieszano w kolbie na łaźni lodowej, aż temperatura roztworu osiągnęła 0°C. Oddzielnie przygotowano roztwór składający się z 10 ml H₂O, 13,6 ml stęż. H₂SO₄ oraz 42,6 ml (0,5 mola) alkoholu *tert*-butylowego również chłodząc go do temperatury 0 °C. Następnie roztwór ten przelano do wkraplacza i dodawano powoli pod powierzchnię roztworu azotynu sodu. Utrzymywano temperaturę ok. 0 °C. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na łaźni do momentu, gdy nastąpiło rozdzielenie roztworu na dwie warstwy. Obie warstwy przeniesiono do rozdzielacza pozostawiając na dnie kolby zdekantowany siarczan sodu. Dolną warstwę usunięto, a górną przemyto dwukrotnie 50 ml roztworu zawierającego 2 g NaHCO₃ i 25 g NaCl w 100 ml H₂O. Na koniec warstwę zawierającą TBN osuszono nad bezwodnym siarczanem sodu i przedestylowano otrzymując 33 ml; wyd. 56%.

5.3.10. Siarczan (VI) tetrabutylamonu

Do 80 μl 40% wodorotlenku tetrabutylamonu dodano ok. 50 μl 1 M kwasu siarkowego (VI) tak, aby pH otrzymanego roztworu było obojętne. Otrzymano ok. 130 μl 0,38 M roztworu siarczanu (VI) tetrabutylamonu.

5.4. Synteza pochodnej poliamino-2'-O-metyloadenozyny

5.4.1. 9-(β -D-erythro-pentofuranozylo)-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)puryna (**132**)

Do adenozyiny (2,715 g, 10 mmoli) dodano 1,2-bis[(dimetyloamino)metyleno]hydrazynę (1120 mg, 40 mmoli, 4 ekw.) i odparowano z bezwodną pirydyną (4 \times 10 ml). Ponownie rozpuszczono substrat w pirydynie (15 ml). Następnie, wstrzyknięto TMSCl (3,80 ml, 30 mmoli, 3 ekw.). Kolbę z mieszaniną reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temp. 100 °C korzystając z łaźni olejowej. Po 24 godzinach zakończono ogrzewanie i dodano kolejną porcję TMSCl (1,27 ml, 10 mmola, 1 ekw.). Po 20 min. mieszaninę reakcyjną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość ponownie odparowano z toluenem (2 \times 10 ml) i rozpuszczono w 250 ml chlorku metylenu schłodzonego w lodzie. Otrzymany roztwór przemyto następującymi mieszaninami również schłodzonymi w lodzie: jeden raz mieszaniną nasyconego roztworu NaCl (150 ml) i wody (90 ml) oraz dwa razy mieszaniną nasyconego roztworu NaCl (150 ml) i 1 M HCl (30 ml). Warstwę organiczną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość rozpuszczono w 150 ml metanolu i pozostawiono w temp. pokojowej przez noc. Wytrącił się częściowo osad, dodano 40% HF (1,5 ml, 30 mmoli, 3 ekw.). Po 0,5 godz. związek **132** został odsączony i przemyty benzenem oraz eterem dietylowym, po wysuszeniu otrzymano 2,68 g produktu; wyd.: 84%, $R_f(A) = 0,15$.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 9,66 (s, 2H, H-3, 5 od triazolu), 9,07 (s, 1H, H-8), 8,96 (s, 1H, H-2), 6,11 (d, 1H, J 5,4 Hz, H-1'), 5,63 (d, 1H, J 6,0 Hz, OH-2'), 5,42 (d, 1H, J 5,4 Hz, OH-3'), 5,15 (t, 1H, J 5,4 Hz, OH-5'), 4,64 (q, 1H, J 5,4 Hz, H-2'), 4,20-4,29 (m, 1H, H-3'), 4,00-4,04 (m, 1H, H-4'), 3,57-3,80 (m, 2H, H-5', 5'').

5.4.2. 9-[5'-(4,4'-dimetoksytrytylo)- β -D-erythro-pentofuranozylo]-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)puryna (**133**)

Substrat **132** (3,05 g, 9,6 mmola) odparowano z bezwodną pirydyną (4 \times 30 ml) i ponownie **132** rozpuszczono w bezwodnej pirydynie (40 ml), następnie dodano DMTCl (3,6 g, 10,6 mmola, 1,1 ekw.). Reakcja zaszła całkowicie po 2,5 godziny. Mieszaninę reakcyjną podzielono między nasycony roztwór NaHCO_3 (250 ml) i CH_2Cl_2 (250 ml). Fazę

wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (2×250 ml). Organiczne ekstrakty odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość naniesiono na kolumnę chromatograficzną. Jako eluent zastosowano chlorek metylenu / metanol z dodatkiem 0,2% pirydyny, produkt **133** wymyło przy stężeniu 3% metanolu. Frakcje odparowano i produkt liofilizowano z 1,4-dioksanu. Otrzymano 5,63 g ciała stałego w postaci białego proszku; wyd.: 94%. $R_f(A) = 0,47$.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 9,34 (s, 2H, H-3, 5 od triazolu), 8,76 (s, 1H, H-8), 8,41 (s, 1H, H-2), 6,76-7,32 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,25 (d, 1H, J 5,4 Hz, H-1'), 5,05 (t, 1H, J 5,4 Hz, H-2'), 4,59-4,61 (m, 1H, H-3'), 4,42-4,45 (m, 1H, H-4'), 3,74 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,41-3,53 (m, 2H, H-5', 5'').

5.4.3. 9-[3',5'-O-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-2'-O-metylo- β -D-erythro-pentofurano-zylo]-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)puryna (**138**) i 9-[5'-O-(tetraizopropylodisiloksano-3-ol-1-ylo)-3'-O-metylo- β -D-erythro-pentofuranozylo]-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)puryna (**139**)

Droga A. Związek **132** (319 mg, 1 mmola) rozpuszczono w pirydynie (20 ml). Dodano SnCl₂×2H₂O (20 mg, 0,088 mmola, 0,088 ekw.) i kolbę zamknięto gumowym korkiem zaopatrzonym w igłę odprowadzającą azot wytworzony w wyniku reakcji z diazometanem. Następnie stopniowo wstrzykiwano roztwór diazometanu w DME (otrzymany z 1 g *N*-metylo-*N*-nitrozomocznika). Reakcję prowadzono w temp. pokojowej. Po 1 godz. odparowano rozpuszczalniki. Otrzymany olej zawierał mieszaninę izomerów 2'- i 3'-*O*-metylowych: **136** i **137** migrujących razem na płycie TLC; $R_f(A) = 0,35$.

Pozostałość odparowano trzykrotnie z bezwodną pirydyną (3×5 ml) i rozpuszczono ponownie w bezwodnej pirydynie (4,4 ml). Dodano 1,3-dichloro-1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksan (319 μ l, 1mmol, 1 ekw.). Po 2 godz. ponownie wstrzyknięto TIPDSiCl₂ (40 μ l, 1,2 mmola, 1,2 ekw.). Reakcję przerwano po 1 godz. dodając nasycony roztwór NaHCO₃ (20 ml). Fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3×20 ml). Połączone frakcje organiczne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w tzw. fazie odwróconej. W tym celu wykorzystano silanizowany żel krzemionkowy. Kolumnę przygotowano w acetonitrylu. Następnie przemyto mieszaniną woda - aceton (7 : 3, v/v). Związek **138** wypłynął w 70% obj. acetonu. Otrzymano 82 mg produktu **138** w postaci białego proszku; wyd.: 14%. $R_f(I) = 0,35$. Również wyizolowano i scharakteryzowano związek **139**. $R_f(I) = 0,53$.

Droga B. Związek **133** (622 mg, 1 mmol) rozpuszczono w CH₂Cl₂ (20 ml), dodano SnCl₂×2H₂O (20 mg, 0,088 mmola, 0,088 ekw.) i kolbę zamknięto gumowym korkiem

zaopatrzonym w igłę odprowadzającą azot. Reakcję prowadzono również w pirydynie w temp. 0 °C i w DMF. Następnie stopniowo wstrzykiwano roztwór diazometanu w DME (otrzymany z 0,4 g *N*-metylo-*N*-nitrozomocznika). Reakcję prowadzono w temp. pokojowej. Po 20 min. analiza TLC wykazała całkowite przereagowanie substratu ($R_f(A) = 0,58$). Odparowano rozpuszczalniki, a pozostałość poddano przez 5 min. reakcji odtotylowania 2% CHCl_2COOH w CH_2Cl_2 (20 ml). Do mieszaniny reakcyjnej dodano nasycony roztwór NaHCO_3 (50 ml) i wielokrotnie przemywano CH_2Cl_2 (10×50 ml). Do frakcji wodnej dodano solanki (20 ml) i ponownie przemyto CH_2Cl_2 (3×70 ml). Połączone frakcje organiczne osuszono, zateżono i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Mieszaninę izomerów **136** i **137** wymyło 10% metanolem w CH_2Cl_2 z wyd.: 70%. $R_f(A) = 0,35$.

Pochodne **136** i **137** poddano reakcji z TIPDSiCl_2 j.w., otrzymując **138** i **139** odpowiednio z wydajnością: 15% ($R_f(I) = 0,35$) i 39% ($R_f(I) = 0,53$).

9-[3',5'-*O*-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-2'-*O*-metylo- β -*D*-erythro-pentofuranozylo]-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)puryna (**138**); $R_f(I) = 0,35$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 9,64 (s, 2H, H-3,5 od triazolu), 8,83 (s, 1H, H-8), 8,60 (s, 1H, H-2), 6,16 (s, 1H, H-1'), 4,63-4,69 (m, 1H, H-2'), 4,02-4,31 (m, 4H, H-3',4',5',5''), 3,75 (s, 3H, 2'- OCH_3), 1,00-1,13 (m, 28H, 4*x*i-Pr od TIPDSi).

9-[5'-*O*-(tetraizopropylodisiloksano-3-ol-1-ylo)-3'-*O*-metylo- β -*D*-erythro-pentofuranozylo]-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)puryna (**139**); $R_f(I) = 0,53$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 9,82 (s, 2H, H-3,5 od triazolu), 8,88 (s, 1H, H-8), 8,80 (s, 1H, H-2), 6,25 (d, 1H, J 4,8 Hz, H-1'), 4,75 (t, 1H, J 4,8 Hz, H-2'), 3,99-4,36 (m, 4H, H-3',4',5',5''), 3,53 (s, 3H, 3'- OCH_3), 1,00-1,11 (m, 28H, 4*x*i-Pr od grupy TIPDSi).

5.4.4. 6-*N*-benzoiloadenozyna (**140a**)

Adenozynę (1,47 g, 5 mmoli) odparowano trzykrotnie z bezwodną pirydyną (3×15 ml) i częściowo rozpuszczono w bezwodnej pirydynie (20 ml). Dodano TMSCl (3,8 ml, 30 mmoli, 6 ekw.). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej mieszając przy użyciu mieszadła magnetycznego, kolbę zaopatrzono w suszkę. Po 1 godz. i 45 min. dodano kolejną porcję TMSCl (1 ml, 7,9 mmola, 1,5 ekw.). Po godzinie schłodzono mieszaninę reakcyjną do temp. 0 °C w łaźni lodowej. Wstrzykiwano stopniowo destylowany chlorek benzoilu (870 μl , 7,5 mmola, 1,5 ekw.) i reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej. Po 2 godz. ponownie schłodzono mieszaninę reakcyjną do temp. 0 °C w łaźni lodowej i dodano wodę destylowaną (10 ml) w celu hydrolizy grup trimetylosililowych. Po 15 min. dodano stęż. amoniaku (4 ml) tak, aby otrzymany roztwór był 2 M. Po 2 godz. zateżono mieszaninę reakcyjną i podzielono

między octan etylu (35 ml) a wodę (35 ml). Otrzymany osad odsączono, przemyto wodą i suszono w eksykatorze nad P_2O_5 pod zmniejszonym ciśnieniem. Warstwę wodną zateżono i pozostawiono do wytrącenia produktu **140a**. Otrzymano 1818 mg związku **140a** w postaci białego proszku; wyd.: 99%. $R_f(A) = 0,30$.

1H NMR (DMSO): δ (ppm) 8,77 (s, 1H, H-8), 8,74 (s, 1H, H-2), 7,53-8,07 (m, 5H, CH- aromatyczne od Bz), 6,05 (d, 1H, J 5,7 Hz, H-1'), 4,66 (t, 1H, J 5,4 Hz, H-2'), 4,20 (t, 1H, J 4,8 Hz, H-3'), 3,97-4,03 (m, 1H, H-4'), 3,55-3,73 (m, 2H, H-5', 5'').

5.4.5. 6-*N*-benzoilo-5'-(4,4'-dimetoksytrylo)adenozyna (**140**)

Substrat **140a** (1818 mg, 4,9 mmoli) odparowano trzykrotnie z pirydyną (3×15 ml), rozpuszczono ponownie w bezwodnej pirydynie (70 ml) i dodano DMTCl (1694 mg, 5 mmoli, 1 ekw.). Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej w szczelnie zamkniętym naczyniu przy użyciu mieszadła magnetycznego. Po 3 godz. dodano kolejną porcję DMTCl (170 mg, 0,5 mmoli, 0,1 ekw.). Po 1 godz. analiza TLC pokazała całkowite przereagowanie substratu. Znaczną część pirydyny odparowano i pozostałość przerobiono między nasycony roztwór $NaHCO_3$ (100 ml) a chlorek metylenu (3×100 ml). Połączone frakcje organiczne osuszono nad bezwodnym Na_2SO_4 , odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Jako eluent wykorzystano mieszaninę chlorku metylenu i metanolu. Produkt **140** wymyło 2 – 4% metanolu. Otrzymano 2734 mg w postaci białej piany; wyd.: 82%. $R_f(A) = 0,59$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 8,72 (s, 1H, H-8), 8,26 (s, 1H, H-2), 7,5-8,3 (m, 5H, CH- aromatyczne od Bz), 6,7-7,3 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,07 (d, 1H, J 6,0 Hz, H-1'), 4,87-4,92 (m, 1H, H-2'), 4,40-4,49 (m, 2H, H-3', 4'), 3,27-3,48 (m, 2H, H-5', 5'').

5.4.6. 6-*N*-benzoilo-3',5'-*O*-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-2'-*O*-metyloadenozyna (**145**) i 6-*N*-benzoilo-5'-*O*-(tetraizopropylodisiloksano-3-ol-1-ylo)-3'-*O*-metyloadenozyna (**146**)

Reakcję prowadzono na związku **140** analogicznie jak w przypadku otrzymywania **138** i **139** drogą B. Otrzymano **145** z wydajnością 37%; $R_f(I) = 0,35$. Również scharakteryzowano pochodną **146**; $R_f(I) = 0,49$.

6-*N*-benzoilo-3',5'-*O*-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-2'-*O*-metyloadenozyna (**145**); $R_f(I) = 0,35$.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 8,81 (s, 1H, H-8), 8,34 (s, 1H, H-2), 7,5-8,1 (m, 5H, CH-aromatyczne od Bz), 6,10 (s, 1H, H-1'), 4,70-4,75 (m, 1H, H-2'), 4,01-4,28 (m, 4H, H-3',4',5',5''), 3,73 (s, 3H, 2'-OCH₃), 1,03-1,11 (m, 28H, 4×i-Pr od TIPDSi).

MS ES: [M+H]⁺ 628 obliczone dla C₃₀H₄₅N₅O₆Si₂ 627,88.

6-*N*-benzoilo-5'-*O*-(tetraizopropylodisiloksano-3-ol-1-yl)-3'-*O*-metyloadenozyna (**146**); R_f(I) = 0,49.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 8,85 (s, 1H, H-8), 8,78 (s, 1H, H-2), 7,5-8,1 (m, 5H, CH-aromatyczne od Bz), 6,20 (d, 1H, *J* 3,6 Hz, H-1'), 4,75 (t, 1H, *J* 4,2 Hz, H-2'), 3,94-4,33 (m, 4H, H-3',4', 5',5''), 3,50 (s, 3H, 3'-OCH₃), 1,02-1,08 (m, 28H, 4×i-Pr od grupy TIPDSi).

MS ES: [M+H]⁺ 646 obliczone dla C₃₀H₄₇N₅O₇Si₂ 645,89.

5.4.7. 2'-*O*-metylo-3',5'-*O*-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)adenozyna (**147**)

Adenozynę (802 mg, 3 mmola) odparowano z pirydyną (1×4 ml) i rozpuszczono częściowo w destylowanym metanolu (300 ml) z 0,5% pirydyny (1,5 ml). Dodano SnCl₂×2H₂O (59 mg, 0,26 mmola, 0,088 ekw.) i kolbę zamknięto gumowym korkiem zaopatrzoną w igłę odprowadzającą azot wytworzony w wyniku reakcji z diazometanem. Następnie stopniowo wstrzykiwano roztwór diazometanu w DME (teoretycznie 22 ekw.; otrzymany z 5,4 g *N*-metylo-*N*-nitrozomocznika). Reakcję prowadzono w temp. pokojowej. Po 1 godz. odparowano rozpuszczalniki. Otrzymano olej o zielonobrunatnym zabarwieniu zawierający mieszaninę izomerów: 2'-*O*-metyloadenozynę i 3'-*O*-metyloadenozynę migrujących razem na płycie TLC; R_f(C) = 0,46.

Pozostałość odparowano trzykrotnie z bezwodną pirydyną (3×20 ml) i rozpuszczono ponownie w bezwodnej pirydynie (60 ml). Dodano 1,3-dichloro-1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksan (1054 μl, 3,3 mmola, 1,1 ekw.). Po 1,5 godz. ponownie wstrzyknięto TIPDSiCl₂ (500 μl, 1,6 mmola, 0,5 ekw.). Reakcję przerwano po kolejnej 1,5 godz. dodając nasycony roztwór NaHCO₃ (150 ml). Fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3×150 ml). Połączone frakcje organiczne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej w tzw. fazie odwróconej. W tym celu wykorzystano silanizowany żel krzemionkowy. Kolumnę przygotowano w acetonitrylu. A następnie przemyto mieszaniną woda - aceton (7 : 3, v/v). Związek **147** wypłynął w 70% obj. acetonu. Otrzymano 650 mg produktu **147** w postaci białego proszku; wyd.: 41%. R_f(I) = 0,33.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 8,33 (s, 1H, H-8), 8,12 (s, 1H, H-2), 6,08 (s, 1H, H-1'), 5,71 (bs, 2H, C(6)-NH₂), 4,68-4,76 (m, 1H, H-2'), 3,98-4,28 (m, 4H, H-3', 4', 5', 5''), 3,71 (s, 3H, 2'-OCH₃), 1,01-1,13 (m, 28H, 4×i-Pr od TIPDSi).

MS ES: [M+H]⁺ 524 obliczone dla C₂₃H₄₁N₅O₅SI₂ 523,77.

Również scharakteryzowano 3'-izomer **148**; R_f(I) = 0,48.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 9,01 (s, 1H, H-8), 8,34 (s, 1H, H-2), 6,21 (s, 1H, H-1'), 5,83 (bs, 2H, C(6)-NH₂), 4,68-4,76 (d, 1H, *J* 3,3 Hz, H-2'), 4,26-4,40 (m, 2H, H-3', 4'), 3,98-3,09 (m, 2H, 5', 5''), 3,37 (s, 3H, 3'-OCH₃), 0,90-1,14 (m, 28H, 4×i-Pr od grupy TIPDSi).

5.4.8. 9-(2'-*O*-metylo-β-D-erythro-pentofuranozylo)-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)puryna (**150**)

Substrat **147** (553 mg, 1,05 mmola) rozpuszczono w pirydynie (8 ml) i dodano 32% amoniaku (4 ml). Szczelnie zamknięte naczynie wstawiono do suszarki nastawionej na 70 °C. Reakcję odsililowania prowadzono przez 3 dni. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną zatężono i suszono w eksykatorze nad P₂O₅.

Do surowej 2'-*O*-metyloadenozyny (**28a**) dodano 1,2-bis[(dimetyloamino)-metyleno]hydrazynę (596 mg, 4,2 mmola, 4 ekw.) i odparowano z bezwodną pirydyną (4×3 ml). Ponownie rozpuszczono substrat w 2,5 ml bezwodnej pirydyny. Następnie, wstrzyknięto TMSCl (267 μl, 2,1 mmola, 2 ekw.). Kolbę z mieszaniną reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temp. 100 °C korzystając z łaźni olejowej. Po 24 godzinach zakończono ogrzewanie i dodano kolejną porcję TMSCl (267 μl, 2,1 mmola, 2 ekw.). Po 30 min. ponownie dodano porcję TMSCl (267 μl, 2,1 mmola, 2 ekw.). Po 1 godz. mieszaninę reakcyjną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość odparowano z toluenem (2×2 ml) i rozpuszczono w 26 ml chlorku metylenu schłodzonego w lodzie. Otrzymany roztwór przemyto następującymi mieszaninami również schłodzonymi w lodzie: jeden raz mieszaniną nasyconego roztworu NaCl (10,5 ml) i nasyconego roztworu NaHCO₃ (5,6 ml) oraz dwa razy mieszaniną nasyconego roztworu NaCl (10,5 ml) i 1 M HCl (3,8 ml). Warstwę organiczną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość rozpuszczono w 4,7 ml metanolu i pozostawiono w temp. pokojowej przez noc. Związek **150** wykrystalizował i został przesączony. Osad przemyto benzenem (1×2 ml) i eterem dietylowym (2×2 ml), po wysuszeniu otrzymano 133 mg produktu; wyd.: 38%, R_f(A) = 0,26.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 9,65 (s, 2H, H-3,5 od triazolu), 9,09 (s, 1H, H-8), 8,99 (s, 1H, H-2), 6,23 (d, 1H, *J* 4,8 Hz, H-1'), 5,37 (d, 1H, *J* 5,38 Hz, OH-3'), 5,20 (t, 1H, *J* 5,38 Hz, OH-5'), 4,35-4,45 (m, 2H, H-2', 3'), 4,03 (q, 1H, *J* 3,59 Hz, H-4'), 3,58-3,78 (m, 2H, H-5', 5''), 3,39 (s, 3H, 2'-OCH₃).

MS ES: $[M+H]^+$ 334 obliczone dla $C_{13}H_{15}N_7O_4$ 333,30.

5.4.9. 9-[5'-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-2'-O-metylo- β -D-erythro-pentofuranozylo]-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)puryna (**134**)

Substrat **150** (190 mg, 0,57 mmola) odparowano z bezwodną pirydyną (3×3 ml) i ponownie **150** rozpuszczono w bezwodnej pirydynie (3 ml), następnie dodano DMTCI (213 mg, 0,63 mmola, 1,1 ekw.). Po 3 godz. dodano DMTCI (28 mg, 0,08 mmola, 0,1 ekw.). Reakcja zaszła całkowicie po 3,5 godziny. Mieszaninę reakcyjną podzielono między nasycony roztwór $NaHCO_3$ (20 ml) i CH_2Cl_2 (20 ml). Fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3×20 ml). Organiczne ekstrakty odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a pozostałość naniesiono na kolumnę chromatograficzną. Jako eluent zastosowano chlorek metylenu / metanol z dodatkiem 0,2% pirydyny, produkt **134** wymyto przy stężeniu metanolu 1 do 4%. Frakcje odparowano i produkt liofilizowano z 1,4-dioksanu. Otrzymano 358 mg produktu **134** w postaci lekko żółtej piany; wyd.: 98%. $R_f(B) = 0,35$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 9,62 (s, 2H, H-3, 5 od triazolu), 8,80 (s, 1H, H-8), 8,46 (s, 1H, H-2), 7,22-7,46 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,28 (d, 1H, J 3,6 Hz, H-1'), 4,54-4,61 (m, 1H, H-3'), 4,40-4,45 (m, 1H, H-2'), 4,22-4,28 (m, 1H, H-4'), 3,79 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,63 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3,45-3,61 (m, 2H, H-5', 5'').

MS ES: $[M+H]^+$ 636 obliczone dla $C_{34}H_{33}N_7O_6$ 635,67.

5.4.10. 6-N-(4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-O-metyloadenozyna (**186**)

Związek **134** (358 mg, 0,55 mmola) rozpuszczono w 7 ml pirydyny. Po dodaniu sperminy (1133 mg, 5,6 mmola, 10 ekw.) kolbę reakcyjną szczelnie zamknięto i umieszczono w suszarce (70°C). Reakcję zakończono po 8 godzinach. Pirydynę odparowano i otrzymany olej podzielono między wodę (20 ml) a chlorek metylenu (20 ml). Warstwę organiczną ekstrahowano wodą (2×20 ml). Każdorazowo w trakcie mieszania się obu warstw powstawała emulsja. Aby usunąć emulsję mieszaninę przelewano do plastikowych probówek (pojemność ok. 40 ml) i wirowano przez 10 min. (16 tys. obr./min. w temp. 4 °C). Połączone warstwy organiczne zatężono i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Czysty produkt wypłynął w fazie od 78 : 2 : 20 do 75 : 5 : 20. Uzyskano 380 mg związku **186**; wyd.: 88%. $R_f(E) = 0,66$.

1H NMR ($DMSO-d_6$): δ (ppm) 8,26 (s, 1H, H-8), 8,18 (s, 1H, H-2), 6,79-7,28 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,05 (d, 1H, J 4,2 Hz, H-1'), 4,41-4,48 (m, 2H, H-2', 3'), 4,03-4,09 (m, 1H, H-4'), 3,73 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,67 (s, 3H, 2'-OCH₃), 2,28-3,5 (m, 14H,

H-5', 5'', CH₂-1, 3, 5, 8, 10, 12 od reszty sperminy), 1,40-1,88 (m, 8H, CH₂-2, 6, 7, 11 od reszty sperminy).

MS ES: [M+H]⁺ 769 obliczone dla C₄₂H₅₆N₈O₆ 768,94.

5.4.11. 6-*N*-[Tris(*N,N',N''*-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-*O*-metyloadenozyna (**192**)

Związek **186** (370 mg, 0,48 mmole) trzykrotnie odparowano z bezwodną pirydyną (3×6 ml) i rozpuszczono w bezwodnej pirydynie (6 ml). Kolbę zamknięto gumowym korkiem, schłodzono w łaźni lodowej i wstrzyknięto bezwodnik kwasu trifluorooctowego (334 μl, 2,4 mmola, 5 ekw.). Po 20 min. zakończono reakcję przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej nasyconego roztworu NaHCO₃ (30 ml). Następnie warstwę wodną trzykrotnie przemyto CH₂Cl₂ (3×30 ml). Po ekstrakcji fazy organiczne zatężono na wyparce. Surowy produkt **192** oczyszczono na kolumnie chromatograficznej, stosując chlorek metylenu – metanol z dodatkiem 0,2% pirydyny jako eluent. Czysty produkt wypłynął przy 3% do 4% metanolu. Otrzymano 223 mg produktu w postaci kremowo - białej piany; wyd. 44%. R_f(A) = 0,65.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 8,52-8,58 (m, 1H, C(6)-NH), 8,26 (2×s, 1H, H-8), 7,97 (s, 1H, H-2), 6,72-7,29 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,08 (t, 1H, *J* 3,4 Hz, H-1'), 4,42-4,48 (m, 1H, H-3'), 4,26-4,32 (m, 1H, H-2'), 4,08-4,15 (m, 1H, H-4'), 3,71-3,72 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,51 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3,20-3,70 (m, 14H, H-5', 5'', CH₂-1, 3, 5, 8, 10, 12 od reszty sperminy), 1,50-2,04 (m, 8H, CH₂-2, 6, 7, 11 od reszty sperminy).

MS ES: [M+H]⁺ 1057 obliczone dla C₄₈H₅₆F₉N₈O₉ 1056,97.

5.5. Synteza pochodnej poliamino-2'-*O*-metylocytydyny

5.5.1. 4-*N-p*-Toluenosulfonylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyna (**154**)

Do cytydyny (1,216 g, 5 mmoli) rozpuszczonej w bezwodnej pirydynie (20 ml) dodano TMSCl (3,8 ml, 30 mmoli, 6 ekw.) i całość mieszano przez 1 godzinę. Po czym mieszaninę reakcyjną zatężono, odparowując bez dostępu wilgoci do 3/4 objętości, czyli do ok. 22 ml i dodano chlorek *p*-toluenosulfonylu (1,91 g, 10 mmoli, 2 ekw.). Reakcję prowadzono w szczelnie zamkniętym naczyniu w temp. 60 °C w suszarce przez 20 godzin. Analiza TLC wykazała całkowite zajście reakcji. Mieszaninę reakcyjną przerobiono dodając 60 ml nasyconego NaHCO₃ i 50 ml CH₂Cl₂. Warstwę wodną ekstrahowano dwa razy chlorkiem metylenu (2×50 ml). Połączone ekstrakty zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem, pozostałość rozpuszczono w pirydynie (15 ml) i dodano stężonego amoniaku (15 ml). Reakcję

odsililowania przerwano po 2,5 godz. przez odparowanie amoniaku i pirydyny. Otrzymaną surową 4-*N-p*-toluenosulfonylocytydynę (**153**) osuszono przez odparowanie z pirydyną (4×40 ml). R_f surowego produktu **153** wynosi $R_f(A) = 0,32$.

Ponownie rozpuszczono ją w 20 ml bezwodnej pirydyny. Dodano DMTCl (1,86 g, 5,5 mmoli, 1,1 ekw.). Reakcja trytylowania zaszła ilościowo po ok. 2,5 godziny, co wykazała analiza TLC. Reakcję przerobiono dodając CH₂Cl₂ (50 ml) i nasyconego roztworu NaHCO₃ (50 ml). Warstwę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (2×50 ml). Zebrane warstwy organiczne odparowano i uzyskany w postaci oleju surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Jako eluent zastosowano roztwór metanolu w chlorku metylenu z dodatkiem 0,2% pirydyny. Produkt wymyło przy 1 do 3% metanolu. Otrzymano 2,443 g czystego produktu **154** w postaci lekko żółtej piany, całkowita wyd.: 70%; $R_f(B) = 0,30$.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,95 (d, 1H, *J* 8,1 Hz, H-6), 7,73-7,79 (m, 2H, 2×CH aromatyczne od grupy Ts), 6,8-7,4 (m, 16H, H-5, 2×CH aromatyczne od grupy Ts, aromatyczne od DMT), 5,83 (d, 1H, *J* 3,0 Hz, H-1'), 3,38-4,44 (m, 1H, H-2'), 4,32-4,37 (m, 1H, H-4'), 4,17-4,22 (m, 1H, H-3'), 3,78 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,40-3,56 (m, 2H, H-5', 5''), 2,39 (s, 3H, CH₃ od grupy Ts).

5.5.2. Metylowanie 4-*N-p*-Toluenosulfonylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyny

4-*N-p*-Toluenosulfonylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynę (**154**) (1 mg, 1,4 mmol) rozpuszczono w acetonitrylu (35 ml) i dodano SnCl₂×2H₂O (14 mg, 0,044 ekw.). Reakcję prowadzono w temp. 0 °C korzystając z łaźni lodowej i energicznie mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego. Do schłodzonej mieszaniny reakcyjnej stopniowo wstrzykiwano (ok. 5 min.) roztwór diazometanu w DME (3,5 ml, zakładając stęż. 1M, 2,5 ekw.) tak, aby temperatura nie przekroczyła +5 °C. Reakcję prowadzono jeszcze przez 20 min. i mieszaninę rozpuszczalników odparowano. Oczyszczono pozostałość na kolumnie chromatograficznej przygotowanej w mieszaninie toluenu i octanu etylu (1 : 1, v/v). Scharakteryzowano niżej wymienione produkty.

4-*N-p*-toluenosulfonylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-*O*-metylocytydyna (**155**), 247 mg, wyd.: 25%; $R_f(D) = 0,49$.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 8,43 (d, 1H, *J* 78 Hz, H-6), 7,52-7,58 (m, 2H, 2×CH aromatyczne od grupy Ts), 6,8-7,4 (m, 15H, 2×CH aromatyczne od grupy Ts, aromatyczne od DMT), 6,56 (d, 1H, *J* 7,8 Hz, H-5), 5,97 (s, 1H, H-1'), 4,36-4,47 (m, 1H, H-3'), 3,94-4,00 (m, 1H, H-2'), 3,82 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,74-3,79 (m, 1H, H-4'), 3,71 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3,54-3,62 (m, 2H, H-5', 5''), 2,41 (s, 3H, CH₃ od grupy Ts).

4-*N*-*p*-toluenosulfonylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-3'-*O*-metylocytydyna (**156**);

$R_f(D) = 0,33$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 8,1 (m, 1H, H-6), 7,53-7,59 (m, 2H, 2×CH aromatyczne od grupy Ts), 6,8-7,4 (m, 15H, 2×CH aromatyczne od grupy Ts, aromatyczne od DMT), 6,68 (d, 1-H, J 8,1 Hz, H-5), 5,87 (d, 1H, J 2,3 Hz, H-1'), 4,23-4,28 (m, 1H, H-2'), 4,12-4,18 (m, 1H, H-4'), 3,96-4,01 (m, 1H, H-3'), 3,82 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,52-3,66 (m, 2H, H-5', 5''), 3,46 (s, 3H, 3'-OCH₃), 2,41 (s, 3H, CH₃ od grupy Ts).

4-*N*-metylo-4-*N*-*p*-toluenosulfonylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-*O*-metylocytydyna (**157**), 278 mg, wyd.: 27%; $R_f(D) = 0,66$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 8,15 (d, 1H, J 8,1 Hz, H-6), 7,74-7,88 (m, 2H, 2×CH aromatyczne od grupy Ts), 6,8-7,4 (m, 15H, 2×CH aromatyczne od grupy Ts, aromatyczne od DMT), 6,53 (d, 1-H, J 8,4 Hz, H-5), 5,93 (s, 1H, H-1'), 4,38-4,47 (m, 1H, H-3'), 3,96-4,01 (m, 1H, H-2'), 3,83 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,70-3,74 (m, 1H, H-4'), 3,66 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3,54-3,58 (m, 2H, H-5', 5''), 3,39 (s, 3H, C(4) N-CH₃), 2,40 (s, 3H, CH₃ od grupy Ts).

4-*N*-metylo-4-*N*-*p*-toluenosulfonylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-3'-*O*-metylocytydyna (**158**), 130 mg, wyd.: 13%; $R_f(D) = 0,57$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 7,92 (d, 1H, J 8,1 Hz, H-6), 7,76-7,82 (m, 2H, 2×CH aromatyczne od grupy Ts), 6,8-7,4 (m, 15H, 2×CH aromatyczne od grupy Ts, aromatyczne od DMT), 6,68 (d, 1-H, J 8,1 Hz, H-5), 5,91 (d, 1H, J 3,3 Hz, H-1'), 4,22-4,28 (m, 1H, H-2'), 4,14-4,19 (m, 1H, H-4'), 3,94-4,00 (m, 1H, H-3'), 3,83 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,54-3,60 (m, 1H, H-5'), 3,42 (s, 3H, 3'-OCH₃), 3,39 (s, 3H, C(4) N-CH₃), 3,36-3,40 (m, 1H, H-5''), 2,41 (s, 3H, CH₃ od grupy Ts).

5.5.3. 4-*N*-[(*N*-trifluoroacetylo)-5-azapentano-1-ylo]-5'-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-*O*-metylocytydyna (**160**)

Związek dimetylowy **157** (90 mg, 0,124 mmola) rozpuszczono w pirydynie (1,3 ml) i dodano putrescynę (125 μl). Kolbę reakcyjną szczelnie zamknięto i umieszczono na noc w suszarce w temp. 70 °C. Reakcja zaszła ilościowo. Po 17 godz. odparowano pirydynę i do oleistej pozostałości dodano chlorek metylenu (11 ml) i wodę (11 ml). Warstwę wodną dwukrotnie wytrząsnięto z CH_2Cl_2 (2×11 ml). Połączone frakcje organiczne zatężono i czterokrotnie odparowano z bezwodną pirydyną (4×2 ml). Surową 4-*N*-(5-azapentano-1-ylo)-5'-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-*O*-metylocytydynę (**159**) rozpuszczono w pirydynie (1,3 ml) i wstrzyknięto $(\text{CF}_3\text{CO})_2\text{O}$ (52 μl , 3 ekw.). Reakcję przerwano po 20 min. dodając nasycony

roztwór NaHCO_3 (10 ml) i trzykrotnie przemyto CH_2Cl_2 (3×10 ml). Frakcję organiczną odparowano, a pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej stosując jako eluent chlorek metylenu / metanol. Otrzymano 37 mg czystego produktu **160** w postaci lekko żółtej piany, wyd.: 43%; $R_f(\text{A}) = 0,43$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 7,82 (d, 1H, J 8,7 Hz H-6), 6,82-7,42 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 5,96 (s, 1H, H-1'), 5,20 (d, 1H, J 8,4 Hz, H-5), 4,42-4,52 (m, 1H, H-2'), 3,93-4,00 (m, 1H, H-3'), 3,80 (s, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$ od DMT), 3,72-3,77 (m, 1H, H-4'), 3,67 (s, 3H, 2'- OCH_3), 3,18-3,64 (m, 6H, H-5', 5'', CH_2 -1, 4 od reszty putrescyny), 1,5-1,8 (m, 4H, CH_2 -2, 3 od reszty putrescyny).

5.5.4. 6-*N*-benzoilocytydyna (**160a**)

Reakcję prowadzono na cytydynie (1,22 g, 5 mmoli) analogicznie do otrzymywania 6-*N*-benzoiloadenozyny (**140a**). Otrzymano 1,69 g związku **160a** w postaci białego proszku, wyd.: 97%. $R_f(\text{A}) = 0,27$.

5.5.5. 6-*N*-benzoilo-5'-(4,4'-dimetoksytrylo)cytydyna (**160b**)

Reakcję prowadzono na związku **160a** (1,69 g, 5 mmoli) analogicznie do otrzymywania związku **140**. Otrzymano 2,61 g związku **160b**, wyd.: 80%. $R_f(\text{A}) = 0,65$

5.5.6. Metylowanie 6-*N*-benzoilo-5'-(4,4'-dimetoksytrylo)cytydyny

Reakcję prowadzono na związku **160b** analogicznie do metylowania **140**. Otrzymanych prawdopodobnie izomerów 2'- i 3'-*O*-metylowych, odpowiednio $R_f(\text{D}) = 0,32$ i $R_f(\text{D}) = 0,26$, nie udało się rozdzielić na kolumnie chromatograficznej z wykorzystaniem roztworu toluenu i octanu etylu.

5.5.7. 3',5'-*O*-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-2'-*O*-metylocytydyna (**161**)

Cytydynę (2 g, 8,2 mmola) rozpuszczono częściowo w destylowanym metanolu (480 ml). Dodano $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (82 mg, 0,36 mmola, 0,044 ekw.) i kolbę zamknięto gumowym korkiem zaopatrzonym w igłę odprowadzającą azot wytworzony w wyniku reakcji z diazometanem. Następnie stopniowo wstrzykiwano roztwór diazometanu w DME (teoretycznie 11 ekw.; otrzymany z 6,8 g *N*-metylo-*N*-nitrozomocznika). Reakcję prowadzono w temp. pokojowej. Po 1 godz. odparowano rozpuszczalniki. Otrzymano mieszaninę izomerów: 2'-*O*-metylocytydynę i 3'-*O*-metylocytydynę migrujących razem na płytce TLC; $R_f(\text{C}) = 0,20$.

Pozostałość odparowano trzykrotnie z bezwodną pirydyną (3×15 ml) i rozpuszczono ponownie w bezwodnej pirydynie (36 ml). Dodano 1,3-dichloro-1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksan (2,620 ml, 8,2 mmole, 1 ekw.). Po 2 godz. reakcja zaszła całkowicie. Roztwór podzielono między nasycony roztwór NaHCO₃ (120 ml) a CH₂Cl₂ (120 ml). Wodną fazę ekstrahowano chlorkiem metylenu (2×120 ml). Połączone frakcje organiczne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Związek **161** wypłynął w 1,5% do 6% roztworze MeOH w CH₂Cl₂. Otrzymano 2,718 g produktu **161** w postaci białej piany; wyd.: 66%. R_f(A) = 0,48.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 8,01 (d, 1H, *J* 7,2 Hz, H-6), 5,81 (s, 1H, H-1'), 5,63 (d, 1H, *J* 7,5 Hz, H-5), 4,20-4,29 (m, 1H, H-2'), 4,09-4,28 (m, 2H, H-5',5''), 3,92-4,00 (m, 1H, H-3'), 3,74-3,79 (m, 1H, H-4'), 3,71 (s, 3H, 2'-OCH₃), 0,97-1,12 (m, 28H, 4×i-Pr od TIPDSi).

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 165,53 (C-4), 155,32 (C-2), 141,20 (C-6), 93,63 (C-5), 88,91 (C-2'), 83,66 (C-1'), 81,42 (C-4'), 77,03 (C-3'), 68,03 (C-5'), 59,36 (2'-OCH₃), 17,03-17,51 (8× CH₃ od grupy TIPDSi), 12,35-13,46 (4× CH od grupy TIPDSi).

FAB MS: [M+H]⁺ 500,2 obliczone dla C₂₂H₄₁N₃O₆Si₂ 499,75.

5.5.8. 4-*N-p*-Toluenosulfonylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-*O*-metylocytydyna (**155**)

3',5'-*O*-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-2'-*O*-metylocytydynę (**161**) (2,718 g, 5,4 mmola) odparowano trzykrotnie z bezwodną pirydyną (3×15 ml) i ponownie rozpuszczono w bezwodnej pirydynie (22 ml). Dodano chlorek *p*-toluenosulfonowy (2,059 g, 10,8 mmola, 2 ekw.). Szczelnie zamknięte naczynie reakcyjne wstawiono do suszarki nastawionej na 70 °C i pozostawiono na noc. Analiza TLC wykazała całkowite zajście reakcji. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczyto nasyconym roztworem NaHCO₃ (65 ml) i trzykrotnie przemyto CH₂Cl₂ (3×65 ml). Połączone frakcje organiczne osuszono nad bezwodnym Na₂SO₄ i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymano surową 4-*N-p*-toluenosulfonylo-3',5'-*O*-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-2'-*O*-metylocytydynę (**163**), R_f(A) = 0,85. Wcześniej oczyszczony związek **163** scharakteryzowano za pomocą analizy NMR i MS.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 8,64-8,67 (m, 1H, C(4)-NH), 7,93 (d, 1H, *J* 7,8 Hz, H-6), 7,80-3,90 (m, 2H, 2×CH aromatyczne od grupy Ts), 7,34-7,42 (m, 1H, H-5), 7,26-7,32 (m, 2H, 2×CH aromatyczne od grupy Ts), 5,73 (s, 1H, H-1'), 5,73 (s, 1H, H-5), 4,21-4,25 (m, 1H, H-2'), 4,10-4,20 (m, 2H, H-5',5''), 3,92-4,00 (m, 1H, H-3'), 3,68 (m, 1H, H-4'), 3,66 (s, 3H, 2'-OCH₃), 2,42 (s, 3H, CH₃ od grupy Ts), 1,10-1,13 (m, 28H, 4×i-Pr od TIPDSi).

¹³C NMR (CDCl₃): δ (ppm) 148,25 (C-4), 143,54 (C-2), 139,79 (C-6), 137,68 (CS od grupy Ts), 129,55 (2×CH w pozycji meta od Ts), 126,67 (2×CH w pozycji orto od Ts), 124,34 (C-

5), 88,70 (C-2'), 83,77 (C-1'), 81,81 (C-4'), 77,04 (C-3'), 68,20 (C-5'), 59,31 (2'-OCH₃), 21,57 (CH₃ od grupy Ts), 16,80-17,49 (8× CH₃ od grupy TIPDSi), 12,37-13,48 (4× CH od grupy TIPDSi).

FAB MS: [M+H]⁺ 654,4 obliczone dla C₂₉H₄₇N₃O₈SSi₂ 653,93.

Surowy związek **163** poddano reakcji odsililowania. W tym celu do **163** dodano wcześniej przygotowany roztwór HF w pirydynie (5,4 ml 40% HF w 21,6 ml pirydyny). Po 1 godz. i 10 min. przerwano reakcję dodając nasycony roztwór NaHCO₃ (180 ml). Następnie mieszaninę przemyto trzykrotnie CH₂Cl₂ (3×150 ml), osuszono nad bezwodnym Na₂SO₄ i zateżono. Otrzymano surową 4-*N-p*-toluenosulfonylo-2'-*O*-metylocytydynę (**164**), R_f(A) = 0,45. Pochodną **164** wcześniej oczyszczoną scharakteryzowano za pomocą analizy MS.

MS ES: [M+H]⁺ 412 obliczone dla C₁₇H₂₁N₃O₇S 411,43.

W ostatnim etapie związek **164** poddano dimetoksytrytylowaniu. Surowy **164** odparowano trzykrotnie z bezwodną pirydyną (3×10 ml) i ponownie rozpuszczono w bezwodnej pirydynie (22 ml), po czym wsypano DMTCl (2,013 g, 5,94 mmola, 1,1 ekw.). Reakcję zakończono przez zneutralizowanie nasyconym roztworem NaHCO₃ (55 ml) i trzykrotnie przemyto CH₂Cl₂ (3×55 ml). Połączone frakcje organiczne osuszono nad bezwodnym Na₂SO₄, zateżono i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Jako eluent stosowano chlorek metylenu – metanol z dodatkiem 0,2% pirydyny. Czysty produkt wypłynął przy 1% do 5% metanolu. Otrzymano 2,587 g związku **155** w postaci lekko żółtej piany; całkowita wyd.: 67%; R_f(B) = 0,46.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 8,1 (m, 1H, H-6), 7,8 (m, 3H, H-5, 2×CH aromatyczne od grupy Ts), 6,8-7,4 (m, 15H, 2×CH aromatyczne od grupy Ts, aromatyczne od DMT), 5,92 (s, 1H, H-1'), 4,41-4,49 (m, 1H, H-3'), 3,96-4,01 (m, 1H, H-2'), 3,80 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,74-3,79 (m, 1H, H-4'), 3,64 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3,55 (m, 2H, H-5', 5''), 2,42 (s, 3H, CH₃ od grupy Ts).

5.5.9. 4-*N*-(4,9,13-Triazatridekano-1-ylo)-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-*O*-metylocytydyna (**187**)

Do roztworu **155** (2,108 g, 2,95 mmola) w pirydynie (29 ml) dodano sperminę (5,959 g, 29,5 mmoli, 10 ekw.). Kolbę reakcyjną szczelnie zamknięto i umieszczono na noc w suszarce w temp. 70°C. Reakcja zaszła ilościowo. Po 17 godz. odparowano pirydynę i do oleistej pozostałości dodano chlorek metylenu (110 ml) i wodę (110 ml). Po wytrząśnięciu powstała emulsja. W celu rozdzielenia faz mieszaninę wirowano w wirówce (16 tys. obr./min.

w temp. 4°C) przez 15 min. Fazę organiczną ponownie ekstrahowano wodą (110 ml) i wirowano 35 min. Nie doszło do rozdzielenia faz, dlatego odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem mieszaninę rozpuszczalników.

Część surowego produktu, 4-*N*-(3,9,13-triazatridekano-1-ylo)-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-*O*-metylocytydynę (**187**) (0,29 mmola) oczyszczono na kolumnie chromatograficznej, stosując mieszaninę metanolu, 40% wodnego roztworu metyloaminy i wody jako eluent. Czysty produkt wypłynął w fazie od 78 : 2 : 20 do 76 : 4 : 20. Uzyskano 162 mg czystego **187** w postaci białej piany; wyd.: 75%. $R_f(H) = 0,39$.

1H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,9 (m, 1H, H-6), 6,7-7,5 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,04 (bs, 1H, H-1'), 5,1 (m, 1H, H-5), 4,30-4,45 (m, 1H, H-2'), 3,90-4,05 (m, 1H, H-3'), 3,78 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,72 (s, 3H, 2'-OCH₃), 1,4-3,7 (m, 23H, H-4', 5', 5'', CH₂-1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12 od reszty sperminy).

FAB MS: [M+H]⁺ 745,5 obliczone dla C₄₁H₅₇N₆O₇ 744,92.

5.5.10. 4-*N*-[Tris(*N,N,N*'-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-*O*-metylocytydyna (**194**)

Surowy związek **187** (2,55 mmola z **155**) odparowano z bezwodną pirydyną (3×20 ml) i ponownie rozpuszczono w 29 ml pirydyny, dodano bezwodnik trifluoroctowy (1173 μ l, 12,75 mmoli, 5 ekw.). Podczas wstrzykiwania bezwodnika kolba reakcyjna była umieszczona w łaźni lodowej. Po 20 min. zakończono reakcję. Roztwór podzielono między nasycony roztwór NaHCO₃ (180 ml), a CH₂Cl₂ (180 ml). Warstwę wodną ekstrahowano porcjami chlorku metylenu (2×180 ml), które potem odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany olej naniesiono na kolumnę chromatograficzną. Czysty produkt **194** wymyło 3% do 6% roztworem MeOH w CH₂Cl₂. Otrzymano 1,803 g produktu **194**; całkowita wydajność reakcji przyłączenia sperminy i trifluoroacetylowania funkcji aminowych wynosi 66%. Wydajność reakcji trifluoroacetylowania wynosi 88%. $R_f(A) = 0,56$.

1H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 8,05 (d, 1H, J 7,5 Hz, H-6), 6,8-7,5 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,00 (s, 1H, H-1'), 5,2-5,3 (m, 1H, H-5), 4,36-4,48 (m, 1H, H-2'), 3,94-4,03 (m, 1H, H-3'), 3,79 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,72-3,78 (m, 1H, H-4'), 3,68 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3,28-3,66 (m, 14H, H-5', 5'', CH₂-1, 3, 5, 8, 10, 12 od reszty sperminy), 1,56-2,02 (m, 8H, CH₂-2, 6, 7, 11 od reszty sperminy).

FAB MS: [M+H]⁺ 1033,1 obliczone dla C₄₇H₅₄F₉N₆O₁₀ 1032,94.

5.6. Synteza pochodnej poliamino-2'-deoksyadenozyny

5.6.1. 9-(2'-Deoksy- β -D-erythro-pentofuranozylo)-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)puryna (**167**)

Do 2'-deoksyadenozyny (845 mg, 3,4 mmola) dodano 1,2-bis[(dimetyloamino)metyleno]hydrazynę (1910 mg, 13,4 mmoli, 3,9 ekw.) i odparowano z bezwodną pirydyną (4×10 ml). Ponownie rozpuszczono substrat w pirydynie (8 ml). Następnie, wstrzyknięto TMSCl (850 μ l, 6,7 mmoli, 2 ekw.). Kolbę z mieszaniną reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temp. 100 °C korzystając z łaźni olejowej. Po 24 godzinach zakończono ogrzewanie i dodano kolejną porcję TMSCl (340 μ l, 2,7 mmola, 1,3 ekw.). Po 20 min. mieszaninę reakcyjną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość ponownie odparowano z toluenem (2×4 ml) i rozpuszczono w 85 ml chlorku metylenu schłodzonego w lodzie. Otrzymany roztwór przemyto następującymi mieszaninami również schłodzonymi w lodzie: jeden raz mieszaniną nasyconego roztworu NaCl (34 ml) i nasyconego roztworu NaHCO₃ (20 ml), oraz dwa razy mieszaniną nasyconego roztworu NaCl (34 ml) i 1 M HCl (12 ml). Warstwę organiczną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Oleistą pozostałość rozpuszczono w 14 ml metanolu i pozostawiono w temp. pokojowej przez noc. Związek **167** wykrystalizował i został przesączony. Osad przemyto benzenem i eterem dietylowym, po wysuszeniu otrzymano 798 mg produktu; wyd.: 77%, R_f(A) = 0,14.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 9,65 (s, 2H, H-3, 5 od triazolu), 9,02 (s, 1H, H-8), 8,95 (s, 1H, H-2), 6,54 (t, 1H, *J* 6,3 Hz, H-1'), 5,42 (bs, 1H, OH-3'), 5,03 (bs, 1H, OH-5'), 4,44-4,54 (m, 1H, H-3'), 3,90-3,96 (m, 1H, H-4'), 3,52-3,70 (m, 2H, H-5', 5''), 2,76-2,86 (m, 1H, H-2'), 2,38-2,48 (m, 1H, H-2'').

5.6.2. 9-[5-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-2'-deoksy- β -D-erythro-pentofuranozylo]-6-(1,2,4-triazolo-4-ylo)-puryna (**87**)

Substrat **167** (606 mg, 2 mmole) odparowano z bezwodną pirydyną (3×12 ml) i ponownie **167** rozpuszczono w bezwodnej pirydynie (36 ml), następnie dodano DMTCl (745 mg, 2,2 mmole, 1,1 ekw.). Po 3 godz. dodano DMTCl (80 mg, 0,2 mmola, 0,1 ekw.). Reakcja zaszła całkowicie po 3,5 godziny. Mieszaninę reakcyjną podzielono między nasycony roztwór NaHCO₃ (60 ml) i CH₂Cl₂ (60 ml). Fazę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3×60 ml). Organiczne ekstrakty odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem a pozostałość naniesiono na kolumnę chromatograficzną. Jako eluent zastosowano chlorek metylenu / metanol z dodatkiem 0,2% pirydyny, produkt **87** wymyło przy stężeniu metanolu 1 do 4%. Frakcje odparowano i produkt liofilizowano z 1,4-dioksanu. Otrzymano 1111 mg ciała stałego w postaci białego proszku; wyd.: 92%. R_f(A) = 0,47.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 9,65 (s, 2H, H-3, 5 od triazolu), 8,91 (s, 1H, H-8), 8,84 (s, 1H, H-2), 6,68-7,32 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,56 (t, 1H, J 6,6 Hz, H-1'), 5,45 (d, 1H, J 4,5 Hz, OH-3'), 4,49-4,59 (m, 1H, H-3'), 4,02-4,12 (m, 1H, H-4'), 3,68 i 3,64 ($2\times$ s, 6H, $2\times$ OCH₃ od DMT), 3,14-3,28 (m, 2H, H-5', 5''), 2,94-3,04 (m, 1H, H-2'), 2,39-2,47 (m, 1H, H-2'').

5.6.3. 6-*N*-[Tris(*N,N,N'*-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyadenozyna (**193**)

Związek **87** (100 mg, 0,165 mmola) rozpuszczono w 1,7 ml pirydyny. Po dodaniu sperminy (334 mg, 1,65 mmola, 10 ekw.) kolbę reakcyjną szczelnie zamknięto i umieszczono w suszarce (70 °C). Reakcję zakończono po 18 godzinach. Pirydynę odparowano i otrzymany olej podzielono między wodę (10 ml) a chlorek metylenu (10 ml). Warstwę organiczną ekstrahowano wodą ($2\times$ 10 ml). Każdorazowo w trakcie mieszania się obu warstw powstawała emulsja. Aby usunąć emulsję mieszaninę przelewano do plastikowych probówek (pojemność ok. 40 ml) i wirowano 10 min. po pierwszym wytrząśnięciu (16 tys. obr./min. w temp. 4°C). Po drugim i trzecim wytrząśnięciu odpowiednie warstwy rozdzielono w rozdzielaczu. Połączone warstwę organiczną zateżono, trzykrotnie odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem z bezwodną pirydyną ($3\times$ 3 ml) i pozostawiono na linii próżniowej przez noc. $R_f(\text{H}) = 0,66$.

Związek **188** w stanie surowym rozpuszczono w 1,7 ml bezwodnej pirydyny. Kolbę zamknięto gumowym korkiem i wstrzyknięto bezwodnik kwasu trifluorooctowego (115 μ l, 0,825 mmola, 5 ekw.). Po 10 min. dodano ponownie bezwodnik kwasu trifluorooctowego (58 μ l, 0,41 mmola, 2,5 ekw.). Po kolejnych 5 min. przerwano reakcję przez wlanie do mieszaniny reakcyjnej nasycony NaHCO₃ (10 ml). Następnie warstwę wodną trzykrotnie przemyto CH₂Cl₂ ($3\times$ 10 ml). Po ekstrakcji fazy organiczną zateżono na wyparce. Surowy produkt **193** oczyszczono na kolumnie chromatograficznej, stosując chlorek metylenu – metanol z dodatkiem 0,2% pirydyny jako eluent. Czysty produkt wypłynął przy 1% do 1,5% metanolu. Otrzymano 107 mg produktu w postaci lekko kremowej piany; wyd. 63%. $R_f(\text{A}) = 0,49$.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 9,43-9,56 (m, 1H, NH-13 od reszty sperminy), 8,24 (s, 1H, H-8), 8,16 (s, 1H, H-2), 7,82-7,96 (m, 1H, C(6)-NH), 6,75-7,34 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,38 (t, 1H, J 6,3 Hz, H-1'), 5,37 (d, 1H, J 4,5 Hz, OH-3'), 4,48-4,55 (m, 1H, H-3'), 3,97-4,03 (m, 1H, H-4'), 3,72 (s, 6H, $2\times$ OCH₃ od DMT), 3,14-3,52 (m, 14H, H-5', 5''),

CH₂-1, 3, 5, 8, 10, 12 od reszty sperminy), 2,84-2,94 (m, 1H, H-2'), 2,32-2,42 (m, 1H, H-2''), 1,46-1,98 (m, 8H, CH₂-2, 6, 7, 11 od reszty sperminy).

5.7. Synteza pochodnej poliamino-2'-deoksycydydyny

5.7.1. 4-*N-p*-Toluenosulfonylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycydydina (**172**)

Do chlorowodoru 2'-deoksycydydyny (2,64 g, 10 mmoli) rozpuszczonego w bezwodnej pirydynie (40 ml) dodano TMSCl (5 ml, 40 mmoli, 4 ekw.) i całość mieszano przez 1 godzinę. Po czym mieszaninę reakcyjną zateżono, odparowując bez dostępu wilgoci do $\frac{3}{4}$ objętości, czyli do ok. 30 ml i dodano chlorek *p*-toluenosulfonylu (3,8 g, 20 mmoli, 2 ekw.). Reakcję prowadzono w szczelnie zamkniętym naczyniu w temp. 60°C w suszarce przez noc. Analiza TLC wykazała całkowite zajście reakcji. Mieszaninę reakcyjną przerobiono dodając 120 ml nasyconego NaHCO₃ i 100 ml CH₂Cl₂. Warstwę wodną ekstrahowano dwa razy chlorkiem metylenu (2×100 ml). Połączone ekstrakty zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem i dodano wcześniej przygotowany roztwór HF w pirydynie (12,5 ml 40% HF i 50 ml pirydyny). Reakcję odsililowania przerwano po 1 godz. i 40 min. przez zneutralizowanie HF nasyconym roztworem NaHCO₃ (450 ml). Fazę wodną przemyto trzykrotnie chlorkiem metylenu (3×400 ml). Warstwy organiczne osuszono nad bezwodnym Na₂SO₄. Następnie mieszaninę reakcyjną zateżono pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymaną surową 4-*N-p*-toluenosulfonylo-2'-deoksycydydnę (**171**) osuszono przez odparowania z pirydyną (4×40 ml). R_f surowego produktu **171** wynosi R_f(A) = 0,33.

Ponownie rozpuszczono ją w 40 ml bezwodnej pirydyny. Dodano DMTCl (3,4 g, 10 mmoli, 1 ekw.). Reakcja trytylowania zaszła ilościowo po ok. 2,5 godzinach, co wykazała analiza TLC. Reakcję przerobiono dodając CH₂Cl₂ (100 ml) i nasyconego roztworu NaHCO₃ (100 ml). Warstwę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (2×100 ml). Zebrane warstwy organiczne odparowano i uzyskany w postaci oleju surowy produkt oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Jako eluent zastosowano roztwór metanolu w chlorku metylenu z dodatkiem 0,2% pirydyny. Produkt wymyto przy 0,6 do 2,5% metanolu. Czysty **172** w postaci piany odparowano z benzenem (3×20 ml) i ponownie rozpuszczono w benzenie (25 ml), po czym zamrożono i zliofilizowano na linii próżniowej otrzymując 4,65 g białego ciała stałego; całkowita wyd.: 68%, R_f(B) = 0,38.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,8 (m, 3H, H-6, 2×CH aromatyczne od grupy Ts), 6,8-7,4 (m, 15H, 2×CH aromatyczne od grupy Ts, aromatyczne od DMT), 6,24 (t, 1H, *J* 8,8 Hz, H-1'), 5,68 (bs, 1H, H-5), 4,55 (m, 1H, H-3'), 4,03 (m, 1H, H-4'), 3,78 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT),

3,44 (dq, 2H, J 3 i 10 Hz, H-5', 5''), 2,48 (m, 1H, H-2'), 2,39 (s, 3H, CH₃ od grupy Ts), 2,26 (m, 1H, H-2'').

5.7.2. 4-*N*-(4,9,13-Triazatridekano-1-ylo)-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydyna (**189**)

Do roztworu **172** (2 g, 2,9 mmola) w pirydynie (29 ml) dodano sperminę (5,858 g, 29 mmoli, 10 ekw.). Kolbę reakcyjną szczelnie zamknięto i umieszczono na noc w suszarce w temp. 70°C. Reakcja zaszła ilościowo. Odparowano pirydynę i do oleistej pozostałości dodano chlorek metylenu (260 ml) i wodę (260 ml). Po wytrząśnięciu powstała emulsja. W celu rozdzielenia faz mieszaninę wirowano w wirówce (16 tys. obr./min. w temp. 4 °C) przez 15 min. Fazę organiczną ponownie ekstrahowano wodą (260 ml). Pierwszą frakcję wodną wytrząśnięto z chlorkiem metylenu (2×200 ml). Drugą frakcję wodną wraz z emulsją przemyto chlorkiem metylenu z dodatkiem metanolu w celu rozpuszczenia emulsji. Pierwszą fazę organiczną również doprowadzono do klarownego roztworu przez dodanie metanolu, aby oddzielić pozostałość wody. Surowy produkt, 4-*N*-(3,9,13-triazatridekano-1-ylo)-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydynę (**189**) oczyszczono na kolumnie chromatograficznej, stosując początkowo 20% roztwór MeOH w CH₂Cl₂ z dodatkiem 0,2% pirydyny, a następnie układ metanolu, 40% wodnego roztworu metyloaminy i wody. Czysty produkt wypłynął w fazie od 78 : 2 : 20 do 76 : 4 : 2. Uzyskano 1,878 g białej piany czystego **189**; wyd.: 90%. $R_f(\text{H}) = 0,41$.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 7,74 (d, 1H, J_{5-6} 7,2 Hz, H-6), 6,81-7,41 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,3 (m, 1H, H-1'), 5,37 (d, 1H, J_{5-6} 7,5 Hz, H-5), 4,43-4,46 (m, 1H, H-3'), 4,01 (m, 1H, H-4'), 3,78 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,3 (m, 2H, H-5', 5''), 3,16 (m, 1H, H-2'), 2,49-2,76 (m, 12H, CH₂-1, 3, 5, 8, 10, 12 od reszty sperminy), 2,13-2,2 (m, 1H, H-2''), 1,44-1,73 (m, 8H, CH₂-2, 6, 7, 11 od reszty sperminy).

5.7.3. 4-*N*-[Tris(*N,N,N*'-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydyna (**195**)

Związek **189** (357 mg, 0,5 mmola) odparowano z bezwodną pirydyną (3×5 ml) i ponownie rozpuszczono w 8 ml pirydyny, dodano bezwodnik trifluoroocetowy (358 μl, 2,5 mmoli, 5 ekw.). Po 5 min. reakcja zaszła całkowicie. Roztwór podzielono między nasycony roztwór NaHCO₃ (30 ml), a CH₂Cl₂ (30 ml). Warstwę wodną ekstrahowano porcjami chlorku metylenu (2×30 ml), które potem odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskany olej naniesiono na kolumnę chromatograficzną. Czysty produkt **195** wymyło 5% roztworem MeOH w CH₂Cl₂. Po odparowaniu frakcji zawierających produkt,

195 rozpuszczono w 1,4-dioksanie, zamrożono i zliofilizowano na linii próżniowej. Otrzymano 435 mg białego ciała stałego; wydajność 87%. $R_f(B) = 0,28$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 7,79 (d, 1H, J 7,5 Hz, H-6), 6,77-7,41 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,26-6,34 (m, 1H, H-1'), 5,82-5,88 (m, 1H, OH-3'), 5,35-5,42 (m, 1H, H-5), 4,52 (m, 1H, H-3'), 4,05 (m, 1H, H-4'), 3,79 (s, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$ od DMT), 3,31-3,54 (m, 14H, H-5', 5''), CH_2 -1, 3, 5, 8, 10, 12 od reszty sperminy), 2,47-2,55 (m, 1H, H-2'), 2,15-2,21 (m, 1H, H-2''), 1,63-1,91 (m, 8H, CH_2 -2, 6, 7, 11 od reszty sperminy).

5.8. Synteza pochodnej poliamino-2'-deoksyguanozyny

5.8.1. 6-O-2-(4-Nitrofenylo)etylo-2'-deoksyguanozyna (**176**)

2'-Deoksyguanozynę (2,670 g, 10 mmoli) rozpuszczono częściowo w 60 ml suchego DMF. Kolbę wcześniej wypełniono argonem. Mętny roztwór mieszano za pomocą mieszadła magnetycznego i po kilku minutach dodano heksametylodisilazan (HMDS) (4 ml, 40 mmol, 4 ekw.). Po 20 min. nadmiar HMDS oraz rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Do otrzymanej pochodnej 3',5'-di-*O*-trimetylosililo-2'-deoksyguanozyny (**174**) dodano 80 ml suchego 1,4-dioksanu. Do mieszanego roztworu dodano 2-(4-nitrofenylo)etanol (2,675 g, 16 mmoli, 1,6 ekw.), trifenylofosfinę (6,296 g, 24 mmole, 2,4 ekw.) i DEAD (3,778 ml, 24 mmola, 2,4 ekw.). Po 5 godz. reakcję zakończono i dioksan odparowano uzyskując czerwony olej. Ostatnim etapem syntezy było usunięcie grup trimetylosililowych z pierścienia cukrowego przy użyciu HF w pirydynie, który przygotowano rozcieńczając 5 ml 40% wodnego roztworu HF w 400 ml pirydyny. Otrzymany roztwór odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości ok. 200 ml i rozpuszczono w nim 6-*O*-2-(4-nitrofenylo)etylo-3',5'-bis-*O*-trimetylosililo-2'-deoksyguanozynę (**175**). Reakcję prowadzono przez 1,5 godziny. Mieszaninę przerobiono standardowo (250 ml NaHCO_3 i 250 ml CH_2Cl_2). Wodną warstwę ekstrahowano chlorkiem metylenu (2×250 ml). Organiczne ekstrakty odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Czysty produkt **176** eluowano 3 - 5% roztworem MeOH w CH_2Cl_2 otrzymując 2,694 g nieznacznie żółtej piany; wyd. całkowita 65%. $R_f(A) = 0,35$.

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm) 8,14-8,17 (m, 2H, $2 \times \text{CH}$ aromatyczne od grupy NPE), 8,04 (s, 1H, H-8), 7,33-7,36 (m, 2H, $2 \times \text{CH}$ aromatyczne od grupy NPE), 6,17 (dd, 1H, $J_{1'-2',2''}$ 7,8 Hz, H-1'), 5,45 (dd, 1H, J 4,8 Hz, OH-3'), 5,45 (d, 1H, J 3,6 Hz, OH-5'), 4,32-4,38 (m, 1H, H-3'), 4,04 (t, 2H, J 6,6 Hz, CH_2 alifatyczne od grupy NPE), 4,00-4,10 (m, 1H, H-4'), 3,48-3,66 (m, 2H, H-5', 5''), 2,91 (t, 2H, J 6,6 Hz, CH_2 alifatyczne od grupy NPE), 2,50-2,60 (m, 1H, H-2'), 2,06-2,16 (m, 1H, H-2'').

5.8.2. 6-O-2-(4-Nitrofenylo)etylo-3',5'-O-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-2'-deoksyguanozyna (**177**)

6-O-2-(4-Nitrofenylo)etylo-2'-deoksyguanozynę (**176**) (1,6 g, 3,8 mmole) odparowano z bezwodną pirydyną (3×15 ml). Następnie **176** rozpuszczono w 15 ml bezwodnej pirydyny i dodano 1,3-dichloro-1,1,3,3-tetraizopropylodisiloksan (1,821 ml, 4,7 mmole, 1,5 ekw.). Po 3 godz. reakcja zaszła całkowicie. Roztwór podzielono między 0,1 M NaHCO₃ (100 ml), a CH₂Cl₂ (100 ml). Wodną fazę ekstrahowano chlorkiem metylenu (2×100 ml). Połączone frakcje organiczne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Związek **177** wypłynął w 1% roztworze MeOH w CH₂Cl₂. Otrzymano 2,172 g produktu **177** w postaci blado żółtej piany; wyd. 87%. R_f(A) = 0,71.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8,16-8,19 (m, 2H, 2×CH aromatyczne od grupy NPE), 8,02 (s, 1H, H-8), 7,59-7,63 (m, 2H, 2×CH aromatyczne od grupy NPE), 6,17 (dd, 1H, *J*_{1'-2',2''} 7,8 Hz i 4,2 Hz, H-1'), 4,72-4,78 (m, 1H, H-3'), 4,60-4,65 (m, 2H, CH₂ alifatyczne od grupy NPE), 3,78-3,96 (m, 3H, H-4', 5', 5''), 2,20-3,25 (m, 2H, CH₂ alifatyczne od grupy NPE), 2,69-2,79 (m, 1H, H-2'), 2,44-2,54 (m, 1H, H-2''), 0,94-1,10 (m, 28H, 4×i-Pr od grupy TIPDSi).

5.8.3. 2-Fluoro-6-O-2-(4-nitrofenylo)etylo-2'-deoksyinozyna (**179**)

Do polipropylenowego naczynia wypełnionego argonem wsypano PVPHF (5,837 g) i wlano bezwodny toluen (35 ml). Naczynie zaopatrzone w gumowy korek szczelnie zamknięto i umieszczono w łaźni chłodzącej (lód - NaCl_{aq}), aby schłodzić do temp. -10 °C. Następnie wstrzyknięto do naczynia związek **177** (2,170 g, 3,3 mmola) rozpuszczony w 22 ml bezwodnego toluenu i azotyn *tert*-butylu (1,367 ml, 6,6 mmole, 2 ekw.). W trakcie reakcji przepuszczano argon przez naczynie polipropylenowe. Po 2,5 godz. mieszania przy użyciu mieszadła magnetycznego w temp. od -5 do 0 °C, roztwór przesączono przez lejek piankowy, aby usunąć PVPHF. Reagent fluorujący przemyto dwukrotnie toluenem i dwukrotnie octanem etylu. Następnie, przesącz podzielono między 0,1 M NaHCO₃ (150 ml) i octan etylu (100 ml). Warstwę wodną przemyto dwukrotnie octanem etylu (2×150 ml). Połączone warstwy organiczne osuszono nad bezwodnym Na₂SO₄ i zateżono. Otrzymano olej składający się głównie z 2-fluoro-6-O-2-(4-nitrofenylo)etylo-3',5'-O-(tetraizopropylodisiloksano-1,3-diylo)-2'-deoksyinozyny (**178**).

W kolejnym etapie surowy **178**, poddano reakcji z HF w pirydynie aby usunąć grupę TIPDSi. W tym celu przygotowano wodny roztwór HF w pirydynie (18 ml 40% HF w 72 ml pirydyny). Surowy **178** rozpuszczono w 90 ml przygotowanego roztworu HF w pirydynie. Po 2 godz. reakcję zakończono dodając 0,5 M NaHCO₃ (260 ml) i CH₂Cl₂ (180 ml). Warstwę

wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (2×220 ml). Organiczne ekstrakty odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem i uzyskany olej oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Jako eluent zastosowano metanol w chlorku metylenu. Produkt wypłynął przy 2,5% metanolu. Otrzymano 765 mg czystego **179**; wyd.: 56%; $R_f(A) = 0,47$.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8,57 (s, 1H, H-8), 8,17-8,22 (m, 2H, 2×CH aromatyczne od grupy NPE), 7,61-7,68 (m, 2H, 2×CH aromatyczne od grupy NPE), 5,36 (d, 1H, $J_{1'-2',2''}$ 4,5 Hz, H-1'), 5,94 (d, 1H, J 4,8 Hz, OH-3'), 5,45 (t, 1H, J 5,4 Hz, OH-5'), 4,83 (t, 2H, J 6,6 Hz, CH₂ alifatyczne od grupy NPE), 4,36-4,45 (m, 1H, H-3'), 3,84-3,90 (m, 1H, H-4'), 3,46-3,65 (m, 2H, H-5', 5''), 3,28-3,34 (m, 2H, CH₂ alifatyczne od grupy NPE), 2,61-2,72 (m, 1H, H-2'), 2,26-2,36 (m, 1H, H-2'').

$^{19}\text{F NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 25,219 (s, C(2)-F).

5.8.4. 2-Fluoro-6-O-2-(4-nitrofenylo)etylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyinozyna (**180**)

Substrat **179** (665 mg, 1,59 mmola) odparowano trzykrotnie z bezwodną pirydyną (3×10 ml) i ponownie rozpuszczono w 11 ml pirydyny. Dodano DMTCl (539 mg, 1,75 mmola, 1,1 ekw.). Po 1 godz. i 40 min. ponownie dodano DMTCl (70 mg, 0,2 mmola, 0,1 ekw.). Reakcję zakończono po 3 godz. i 40 min. dodając nasyconego roztworu NaHCO₃ (75 ml). Otrzymaną mieszaninę trzykrotnie przemyto chlorkiem metylenu (3×75 ml). Połączone warstwy organiczne osuszono nad bezwodnym Na₂SO₄ i zateżono. Surowy produkt **180** oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Jako eluent zastosowano metanol w chlorku metylenu. Produkt wypłynął przy 1 do 2% metanolu. Otrzymano 1,021 g czystego **180** w postaci nieznacznie żółtej piany; wyd.: 89%. $R_f(B) = 0,46$.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 8,45 (s, 1H, H-8), 8,14-8,22 (m, 2H, 2×CH aromatyczne od grupy NPE), 7,59-7,67 (m, 2H, 2×CH aromatyczne od grupy NPE), 6,71-7,32 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,36 (t, 1H, $J_{1'-2',2''}$ 6,6 Hz, H-1'), 5,40 (d, 1H, J 4,8 Hz, OH-3'), 4,90-4,99 (m, 1H, OH-5'), 4,78-4,86 (m, 2H, CH₂ alifatyczne od grupy NPE), 4,41-4,50 (m, 1H, H-3'), 3,86-4,06 (m, 1H, H-4'), 3,70 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,10-3,35 (m, 4H, CH₂ alifatyczne od grupy NPE i H-5', 5''), 2,77-2,88 (m, 1H, H-2'), 2,32-2,42 (m, 1H, H-2'').

$^{19}\text{F NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 25,327 (s, C(2)-F).

5.8.5. 2-N-[Tris(*N,N,N'*-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-6-O-2-(4-nitrofenylo)etylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyguanozyna (**198**)

Związek **180** (1,010 g, 1,39 mmola) rozpuszczono w pirydynie (14 ml) i dodano sperminę (2,813 g, 13,9 mmola, 10 ekw.). Reakcję prowadzono w temp. pokojowej przez

2 godz. i 50 min. Następnie pirydynę odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a oleistą pozostałość wytrząsnięto między wodę (100 ml) i CH₂Cl₂ (100 ml). Warstwę organiczną ekstrahowano wodą (2×100 ml) w celu usunięcia nadmiaru sperminy. Każdorazowo w trakcie mieszania obu warstw powstawała emulsja. Dlatego po każdym wytrząśnięciu przelewano mieszaninę do odpowiednich pojemników i wirując ją (3×20 min., 16 tys. obr./min., temp. 4 °C) usuwano emulsję. Następnie warstwę organiczną zateżono na wyparce. Otrzymano surową 2-*N*-(4,9,13-Triazatridekano-1-ylo)-6-*O*-2-(4-nitrofenylo)etylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyguanozynę (**190**), R_f(H) = 0,51.

Surowy **190** trzykrotnie odparowano z bezwodną pirydyną (3×10 ml) i ponownie rozpuszczono w bezwodnej pirydynie (16 ml). Kolbę reakcyjną zamknięto gumowym korkiem i umieszczono w mieszaninie chłodzącej (lód – woda) temp. 0 °C. Następnie wstrzyknięto bezwodnik kwasu trifluorooctowego (1,106 ml, 7,95 mmola, 5,7 ekw.). Po 15 min. kolbę wyjęto z łaźni. Reakcję zakończono po kolejnych 15 min. przez dodanie nasyconego roztworu NaHCO₃ (130 ml). Otrzymaną mieszaninę wytrząsnięto trzykrotnie z chlorkiem metylenu (3×130 ml). Połączone frakcje organiczne osuszono nad bezwodnym Na₂SO₄ i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuszczono w 10 ml mieszaniny chlorku metylenu i metanolu w stosunku objętościowym: 35% : 65%. Po 6,5 godz. odparowano mieszaninę rozpuszczalników i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. Jako eluent wykorzystano mieszaninę CH₂Cl₂ i metanolu z dodatkiem 0,2% pirydyny. Produkt wypłynął przy 2% metanolu. Otrzymano w postaci lekko żółtej piany 1,348 g **198**, całkowita wyd.: 81%, R_f(A) = 0,62.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 8,53 (s, 1H, H-8), 8,14-8,22 (m, 2H, 2×CH aromatyczne od grupy NPE), 7,58-7,68 (m, 2H, 2×CH aromatyczne od grupy NPE), 6,71-7,38 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,36 (t, 1H, *J*_{1'-2',2''} 6,6 Hz, H-1'), 4,78-4,86 (m, 2H, CH₂ alifatyczne od grupy NPE), 4,42-4,49 (m, 1H, H-3'), 3,84-4,05 (m, 1H, H-4'), 3,70 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,10-3,6 (M, 16H, CH₂ alifatyczne od grupy NPE, H-5',5'', CH₂-1, 3,5, 8, 10, 12 od reszty sperminy), 2,77-2,88 (m, 1H, H-2'), 2,33-2,43 (m, 1H, H-2''), 1,47-1,90 (m, 8H, CH₂-2, 6, 7, 11 od reszty sperminy).

5.9. Synteza pochodnej poliaminotymidyny

5.9.1. 3',5'-Di-*O*-acetylotymidyna (**182**)

Tymidynę (484 mg, 2 mmoli) odparowano trzykrotnie z bezwodną pirydyną (3×3 ml) i rozpuszczono w 4 ml bezwodnej pirydyny mieszając przy wykorzystaniu mieszadła magnetycznego i ogrzewając roztwór. Następnie dodano bezwodnik kwasu octowego (755 μl,

8 mmoli, 4 ekw.). Reakcję zakończono po 3 godz. przez dodanie 50 ml nasyconego roztworu NaHCO_3 . Warstwę wodną trzykrotnie ekstrahowano chlorkiem metylenu (3×50 ml), po czym część organiczną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem uzyskując 640 mg czystego produktu **182** w postaci białej piany; wyd.: 98%. $R_f(\text{A}) = 0,67$.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 11,39 (bs, 1H, NH-3), 7,50 (d, 1H, J 1,2 Hz, H-6), 6,14-6,22 (dd, 1H, J 6,2 Hz, H-1'), 5,14-5,22 (m, 1H, H-3'), 4,21-4,27 (m, 2H, H-5',5''), 4,12-4,17 (m, 1H, H-4'), 2,38-2,48 (m, 1H, H-2'), 2,22-2,32 (m, 1H, H-2''), 2,07 (s, 6H, $2 \times \text{OCH}_3$), 1,80 (d, 3H, J 1,2 Hz, CH_3 od grup Ac).

5.9.2. 5-Formylo-3',5'-di-O-acetylo-2'-deoksyurydyna (**109**)

Surowy związek **182** (2 mmole) rozpuszczono w CH_3CN (7,8 ml) i dodano 2,6-lutydynę (874 μl , 7,5 mmoli, 3,5 ekw.). Kolbę umieszczono na łaźni olejowej (temp. ok. 65°C) i zaopatrzone w chłodnicę zwrotną. Po 5 min. dodano przygotowany wcześniej roztwór $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (1081 mg, 4 mmole, 2 ekw.) i $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (200 mg, 0,8 mmoli, 0,4 ekw.) w 7,8 ml wody. W celu całkowitego rozpuszczenia soli w wodzie mieszaninę ogrzewano. Reakcję prowadzono w temp. ok. 65°C pod chłodnicą zwrotną. Cały zestaw umieszczono na mieszadle magnetycznym. Po 2 godz. mieszaninę zatężono odparowując CH_3CN . Do pozostałości dodano wodę (20 ml) i octan etylu (30 ml), a następnie wytrząsnięto. Warstwę organiczną ekstrahowano dwukrotnie wodą (2×30 ml) i raz 5% roztworem EDTA (30 ml). Na koniec połączone warstwy wodne ekstrahowano z CH_2Cl_2 (3×100 ml). Osuszone warstwy organiczne odparowano, a pozostałość naniesiono na kolumnę chromatograficzną. Produkt **109** wymyło w 1,5 do 2,5% roztworze MeOH w CH_2Cl_2 . Otrzymano 318 mg związku **109** w postaci białej piany; wyd. 47%. $R_f(\text{A}) = 0,67$.

W związku z przypuszczalną obecnością odacetylowanej pochodnej **109** postanowiono pozostałość z warstwy wodnej poddać reakcji doacetylowania. Frakcję wodną zatężono, odparowano z pirydyną (3×15 ml), a następnie z toluenem (1×15 ml). Otrzymaną pozostałość poddano reakcji z $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{O}$ analogicznie jak w przypadku związku **181**. Otrzymano po oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej 62 mg produktu **109**, wyd.: 9%. Całkowita wydajność reakcji 56%.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 11,87 (bs, 1H, NH-3), 9,80 (s, 1H, C(5)-CHO), 8,36 (s, 1H, H-6), 6,12 (t, 1H, J 6,6 Hz, H-1'), 5,18-5,24 (m, 1H, H-3'), 4,30-4,35 (m, 1H, H-4'), 4,22-4,27 (m, 2H, H-5',5''), 2,40-2,52 (m, 1H, H-2',2''), 2,08 (d, 6H, J 7,2 Hz, $2 \times \text{CH}_3$ od grup Ac).

FAB MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ 341,1 obliczone dla $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ 340,29.

Również wyizolowano i scharakteryzowano 5-hydroksymetylo-3',5'-di-*O*-acetylo-2'-deoksyurydynę (**185**) ; wyd.: 21%. $R_f(A) = 0,42$.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 11,43 (bs, 1H, NH-3), 7,55 (s, 1H, H-6), 6,18-6,25 (m, 1H, H-1'), 5,16-5,24 (m, 1H, H-3'), 4,20-4,24 (m, 3H, C(5)-CH₂, H-4'), 4,15-4,19 (m, 2H, H-5',5''), 2,29-2,37 (m, 1H, H-2',2''), 2,08 (d, 3H, J 3,9 Hz, CH₃ od grup Ac).

FAB MS: $[M+H]^+$ 343,1 obliczone dla C₁₄H₁₈N₂O₈ 342,30.

5.9.3. Próby utleniania 3',5'-di-*O*-acetylotymidyny

1) Reakcja prowadzona analogicznie do otrzymywania 5-formylo-3',5'-di-*O*-acetylo-2'-deoksyurydyny (**109**) w obecności siarczanu (VI) tetrabutylamonu jako katalizatora. Początkowo dodano 20 μl 0,38 M wodnego roztworu soli, natomiast po 1 godz. dodano jeszcze 30 μl (sumarycznie 0,02 mmola, 0,1 ekw.). Otrzymano pochodną **109**, wyd.: 35%.

2) Reakcja prowadzona analogicznie do otrzymywania 5-formylo-3',5'-di-*O*-acetylo-2'-deoksyurydyny (**109**) w obecności soli sodowej kwasu *p*-toluenosulfonowego jako katalizatora. Zamiast acetonitrylu, rozpuszczalnikiem wykorzystanym w reakcji był DMF. Widmo $^1\text{H NMR}$ identyczne z widmem związku **182**.

3) Reakcja prowadzona analogicznie do otrzymywania 5-formylo-3',5'-di-*O*-acetylo-2'-deoksyurydyny (**109**). Zamiast acetonitrylu wykorzystano nitrometam. Widmo $^1\text{H NMR}$ z mieszaniny reakcyjnej pokazało w 10% otrzymanie **109**.

5.9.4. Utlenianie 5-hydroksymetylo-3',5'-di-*O*-acetylo-2'-deoksyurydyny (**185**)

Związek **185** (100 mg, 0,3 mmola) rozpuszczono w CH₃CN (1,2 ml) i dodano 2,6-lutydynę (116 μl , 1 mmol, 3,5 ekw.). Kolbę umieszczono na łaźni olejowej (temp. ok. 65°C) i zaopatrzone w chłodnicę zwrotną. Po 5 min. dodano przygotowany wcześniej roztwór K₂S₂O₈ (162 mg, 0,6 mmola, 2 ekw.) i CuSO₄·5H₂O (30 mg, 0,1 mmola, 0,4 ekw.) w 1,2 ml wody. W celu całkowitego rozpuszczenia soli w wodzie mieszaninę ogrzewano. Reakcję prowadzono w temp. ok. 65°C pod chłodnicą zwrotną. Cały zestaw umieszczono na mieszadle magnetycznym. Po 2 godz. mieszaninę zatężono odparowując CH₃CN. Do pozostałości dodano wodę (6 ml) i octan etylu (6 ml), a następnie wytrząsnięto. Warstwę organiczną ekstrahowano dwukrotnie wodą (2×6 ml) i raz 5% roztworem EDTA (6 ml). Na koniec połączone warstwy wodne ekstrahowano z CH₂Cl₂ (3×100 ml). Osuszone warstwy organiczne odparowano, a pozostałość naniesiono na kolumnę chromatograficzną. Produkt **109** wymyło w 1,5 do 2% roztworze MeOH w CH₂Cl₂. Otrzymano 30 mg związku **109** w postaci białej piany; wyd.: 30%. $R_f(A) = 0,67$.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 11,87 (bs, 1H, NH-3), 9,80 (s, 1H, C(5)-CHO), 8,36 (s, 1H, H-6), 6,12 (t, 1H, J 6,6 Hz, H-1'), 5,18-5,24 (m, 1H, H-3'), 4,30-4,35 (m, 1H, H-4'), 4,22-4,27 (m, 2H, H-5', 5''), 2,40-2,52 (m, 1H, H-2', 2''), 2,08 (d, 6H, J 7,2 Hz, $2\times\text{CH}_3$ od grup Ac).

5.9.5. 5-Formylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydyna (**184**)

Substrat **109** (1,726 g, 5,1 mmola) rozpuszczono w 50 ml 0,9 M roztworu TEA w mieszaninie wody i metanolu (7:1). Reakcję zakończono po 0,5 godziny. Roztwór odparowano na wyparce otrzymując surową 5-formylo-2'-deoksyurydynę (**183**), $R_f(\text{A}) = 0,20$.

Nie oczyszczoną 5-formylo-2'-deoksyurydynę (**183**), otrzymaną po etapie odacetylowania, (5,1 mmol) odparowano czterokrotnie z suchą pirydyną (4×20 ml) i ponownie rozpuszczono w 24 ml pirydyny. Następnie dodano DMTCl (1,897 g, 5,6 mmola, 1,1 ekw.). Po 1,5 godz. reakcję zakończono rozcieńczając mieszaninę reakcyjną nasyconym roztworem NaHCO_3 (100 ml). Warstwę wodną ekstrahowano chlorkiem metylenu (3×100 ml). Zebrane frakcje organiczne odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a oleistą pozostałość naniesiono na kolumnę chromatograficzną. Jako eluent wykorzystano mieszaninę CH_2Cl_2 i metanolu z dodatkiem 0,2% pirydyny. Produkt wypłynął przy 0,5 – 2,5% metanolu. Uzyskano 2,256 g **184** w postaci lekko żółtej piany; wyd.: 78%; $R_f(\text{A}) = 0,53$.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ (ppm) 11,84 (s, 1H, NH-3), 9,59 (s, 1H, C(5)-CHO), 8,33 (s, 1H, H-6), 6,85-7,42 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,07 (t, 1H, J 6,3 Hz, H-1'), 5,37 (d, 1H, J 4,8 Hz, OH-3'), 4,15-4,24 (m, 1H, H-3'), 3,94-3,01 (m, 1H, H-4'), 3,73 (s, 6H, $2\times\text{OCH}_3$ od grupy DMT), 3,16-3,27 (m, 2H, H-5', 5''), 2,27-2,34 (m, 2H, H-2', 2'').

5.9.6. 5-(2,6,11,15-Tetraazapentadekano-1-ylo)-2'-deoksyurydyna (**119**)

Substrat **184** (1,122 g, 2,02 mmola) rozpuszczono w pirydynie (36 ml) i rozcieńczono destylowanym metanolem (36 ml). Następnie dodano sperminę (4,04 g, 20 mmoli, 10 ekw.). Reakcję prowadzono w zamkniętym naczyniu w temperaturze pokojowej. Po 2 godz. kolbę z mieszaniną reakcyjną przeniesiono do łaźni lodowej umieszczonej na mieszkadle magnetycznym i w temperaturze 0 do 5 °C dodawano porcjami w ciągu 5 min. NaBH_4 (161 mg, 4,24 mmola, 2,1 ekw.). Reakcję prowadzono przez 2 godz. podnosząc temperaturę do pokojowej. Po tym czasie przerwano reakcję przez dodanie wody destylowanej (150 ml). Mieszaninę wytrząsnęto z chlorkiem metylenu. Każdorazowo powstawała emulsja, aby

rozdzielić fazy, mieszaninę wirowano w odpowiednich pojemnikach (2×20 min., 16 tys. obr./min., temp. 4°C). Połączone warstwy organiczne zatężono i oczyszczono na kolumnie chromatograficznej. W tym celu pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu i naniesiono na kolumnę. Nieprzereagowany **184** wymyło mieszaniną chlorku metylenu i metanolu (99,5% : 0,5%). Następnie przemyło kolumnę mieszaniną CH₂Cl₂ i metanolu (9 : 1) oraz metanolem, do powyższych eluentów dodawano 0,2% pirydyny. Produkt wymyło mieszaniną metanol / metyloamina / woda (7 : 1 : 2). Otrzymano 624 mg produktu **119**; wyd.: 41%; R_f(E) = 0,80.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 7,48 (s, 1H, H-6), 6,82-7,42 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,20 (t, 1H, *J* 6,3 Hz, H-1'), 5,14-5,25 (m, 1H, OH-3'), 4,22-4,30 (m, 1H, H-3'), 3,85-3,90 (m, 1H, H-4'), 3,73 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 2,9-3,8 (m, 16H, H-5', 5'', C(5)-CH₂-1, CH₂-3, 5, 7, 10, 12, 14 od reszty sperminy), 2,10-2,30 (m, 2H, H-2', 2''), 1,20-1,66 (m, CH₂-4, 8, 9, 13 od reszty sperminy).

5.9.7. 5-[Tetrakis(*N,N',N'',N'''*-trifluoroacetylo)-2,6,11,15-tetraazapentadekano-1-ylo]-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydyna (**196**)

Substrat **119** (648 mg, 0,81 mmola) odparowano trzykrotnie z bezwodną pirydyną (3×10 ml) i ponownie rozpuszczono w bezwodnej pirydynie (6,4 ml). Kolbę zamknięto gumowym korkiem i wstrzyknięto bezwodnik kwasu trifluorooctowego (667 μl, 4,8 mmola, 6 ekw.). Po 15 min. dodano ponownie bezwodnik kwasu trifluorooctowego (222 μl, 1,6 mmola, 2 ekw.). Po kolejnych 15 min. przerwano reakcję przez wlanie do mieszaniny reakcyjnej nasycony NaHCO₃ (50 ml). Następnie warstwę wodną trzykrotnie przemyło CH₂Cl₂ (3×50 ml). Po ekstrakcji połączone fazy organiczne zatężono na wyparce. Surowy produkt **196** oczyszczono na kolumnie chromatograficznej, stosując chlorek metylenu – metanol z dodatkiem 0,2% pirydyny jako eluent. Czysty produkt wypłynął przy 2% do 5% metanolu. Otrzymano 455 mg produktu **196**, wyd.: 50%; R_f(A) = 0,67.

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ (ppm) 11,54-11,61 (m, 1H, NH-3), 9,40-9,55 (m, 1H, NH-15 od reszty sperminy), 7,66-7,67 (m, 1H, H-6), 6,82-7,42 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,08-6,16 (m, 1H, H-1'), 5,35-5,36 (m, 1H, OH-3'), 4,15-4,18 (m, 1H, H-3'), 4,02-4,08 (m, 1H, H-4'), 3,82-3,98 (m, 2H, H-5', 5''), 3,72 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,12-3,37 (m, 14H, C(5)-CH₂-1, CH₂-3, 5, 7, 10, 12, 14 od reszty sperminy), 2,10-2,30 (m, 2H, H-2', 2''), 1,44-1,90 (m, CH₂-4, 8, 9, 13 od reszty sperminy).

5.10. Synteza 3'-amidofosforynów poliamino-2'-O-metylonukleozydów i poliamino-2'-deoksynukleozydów

5.10.1. 3'-Amidofosforyn 6-*N*-[tris(*N,N,N'*-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-*O*-metyloadenozyiny (**199**)

Związek **192** (165 mg, 0,154 mmola) oraz 1-*H*-tetrazol (11 mg, 0,154 mmola, 1 ekw.) suszono w eksykatorze próżniowym przez ok. 20 godzin. Bis(*N,N*-diizopropylamino)(2-cyjanoetoksy)fosfinę (49 μ l, 0,154 mmola, 1 ekw.) wstrzyknięto do rozpuszczonego **192** w bezwodnym chlorku metylenu (1 ml). Następnie dodano wcześniej odważoną porcję 1-*H*-tetrazolu, który był konsumowany w trakcie reakcji. Reakcja zaszła ilościowo po czasie 1 godz. i całość odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy związek oczyszczono chromatograficznie na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym, stosując jako eluent 10% roztwór trietyloaminy w octanie etylu. Odpowiednie frakcje odparowano i **199** zliofilizowano z benzenu otrzymując 135 mg białego ciała stałego; wyd. 70%. $R_f(F) = 0,36$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 8,33 (t, 1H, J 3,7 Hz, H-8), 8,05 (s, 1H, H-2), 6,8-7,5 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,11-6,16 (m, 1H, H-1'), 4,10-4,75 (m, 3H, H-2',3',4'), 3,81 (s, 6H, 2 \times OCH₃ od DMT), 3,51 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3,30-3,78 (m, 16H, 2 \times CH od grup *i*-Pr, CH₂-1, 3, 5, 8, 10, 12 od reszty sperminy, H-5', 5''), 2,68 (t, 2H, J 6,3 Hz, CH₂-OP), 2,41 (t, 2H, J 6,3 Hz, CH₂-CN), 1,60-2,05 (m, 8H, CH₂-2, 6, 7, 11 od reszty sperminy), 1,1-1,3 (m, 12H, 4 \times CH₃ od grup *i*-Pr).

$^{31}\text{P NMR}$ (CH_3CN): δ (ppm) 150,154, 150,659.

MS ES: $[\text{M-H}]^-$ 1256 obliczone dla $\text{C}_{57}\text{H}_{70}\text{F}_9\text{N}_{10}\text{O}_{10}\text{P}$ 1257,19.

5.10.2. 3'-Amidofosforyn 4-*N*-[tris(*N,N,N'*-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-*O*-metylocytydiny (**200**)

Reakcję przeprowadzono na związku **194** (1,445 g, 1,4 mmola) analogicznie do otrzymywania amidofosforynu **119**. Otrzymano 1,378 g produktu **200**; wyd.: 80%. $R_f(F) = 0,38$, $R_f(G) = 0,47$.

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) 8,05 (m, 1H, H-6), 6,8-7,5 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,0 (m, 1H, H-1'), 5,2-5,3 (m, 1H, H-5), 4,31-4,63 (m, 1H, H-3'), 4,19-4,28 (m, 2H, H-2', 4'), 3,80 (s, 6H, 2 \times OCH₃ od DMT), 3,61 (s, 3H, 2'-OCH₃), 3,33-3,64 (m, 18H, CH₂-OP, 2 \times CH od grup *i*-Pr, CH₂-1, 3, 5, 8, 10, 12 od reszty sperminy, H-5', 5''), 2,34-2,01 (m, 2H, CH₂-CN), 1,60-1,96 (m, 8H, CH₂-2, 6, 7, 11 od reszty sperminy), 1,10-1,20 (m, 12H, 4 \times CH₃ od grup *i*-Pr).

$^{31}\text{P NMR}$ (CH_3CN): δ (ppm) 150,003, 150,486.

FAB MS: $[M+H]^+$ 1233,0 obliczone dla $C_{56}H_{71}F_9N_8O_{11}$ 1233,16.

5.10.3. 3'-Amidofosforyn 6-*N*-[tris(*N,N',N''*-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyadenozyny (**201**)

Reakcję przeprowadzono na związku **193** (107 mg, 0,1 mmola) analogicznie do otrzymywania amidofosforynu **199**. Otrzymano 65 mg produktu **201**; wyd.: 53%. $R_f(B) = 0,71$, $R_f(F) = 0,36$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 8,32 (d, 1H, J 4,5 Hz, H-8), 7,94-8,00 (m, 1H, H-2), 6,75-7,43 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,42-6,47 (m, 1H, H-1'), 4,70-4,80 (m, 1H, H-3'), 4,24-4,32 (m, 1H, H-4'), 3,78 (s, 6H, $2 \times OCH_3$ od DMT), 3,25-3,75 (m, 16H, $2 \times CH$ od grup *i*-Pr, CH_2 -1, 3, 5, 8, 10, 12 od reszty sperminy, H-5', 5''), 2,58-2,68 (m, 2H, CH_2 -OP), 2,42-2,49 (t, 2H, J 6,3 Hz, CH_2 -CN), 1,94-2,10 (m, 2H, H-2', 2''), 1,55-1,92 (m, 8H, CH_2 -2, 6, 7, 11 od reszty sperminy), 1,08-1,32 (m, 12H, $4 \times CH_3$ od grup *i*-Pr).

^{31}P NMR (CH_3CN): δ (ppm) 148,601, 148,539.

5.10.4. 3'-Amidofosforyn 4-*N*-[tris(*N,N',N''*-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksytydyny (**101**)

Reakcję przeprowadzono na związku **195** (200 mg, 0,2 mmola) analogicznie do otrzymywania amidofosforynu **199**. Otrzymano 207 mg produktu **101**, wyd.: 85%. $R_f(B) = 0,53$, $R_f(F) = 0,39$.

1H NMR ($CDCl_3$): δ (ppm) 7,79-7,88 (m, 1H, H-6), 6,81-7,42 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,29-6,32 (m, 1H, H-1'), 5,29-5,35 (m, 1H, H-5), 4,63-4,64 (m, 1H, H-3'), 4,1-4,15 (m, 1H, H-4'), 3,79 (s, 6H, $2 \times OCH_3$ od DMT), 3,29-3,64 (m, 18H, CH_2 -OP, $2 \times CH$ od grup *i*-Pr, CH_2 -1, 3, 5, 8, 10, 12 od reszty sperminy, H-5', 5''), 2,39-2,66 (m, 3H, CH_2 -CN, H-2'), 2,21-2,25 (m, 1H, H-2''), 1,63-2,07 (m, 8H, CH_2 -2, 6, 7, 11 od reszty sperminy), 1,03-1,28 (m, 12H, $4 \times CH_3$ od grup *i*-Pr).

^{31}P NMR (CH_3CN): δ (ppm) 148,628, 148,973.

5.10.5. 3'-Amidofosforyny 2-*N*-[tris(*N,N',N''*-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-6-*O*-2-(4-nitrofenylo)etylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyguanozyny (**103**)

Reakcję przeprowadzono na związku **198** (1,348 g, 1,13 mmola) analogicznie do otrzymywania amidofosforynu **199**. Otrzymano 1,236 g lekko kremowego produktu **103**; wyd.: 79%. $R_f(F) = 0,58$, $R_f(G) = 0,50$.

1H NMR ($DMSO-d_6$): δ (ppm) 8,12-8,20 (m, 2H, $2 \times CH$ aromatyczne od grupy NPE), 8,09 (d, 1H, J 4,8 Hz, H-8), 7,58-7,64 (m, 2H, $2 \times CH$ aromatyczne od grupy NPE), 6,68-7,38 (m,

13H, aromatyczne od DMT), 6,24-6,32 (m, 1H, H-1'), 4,62-4,73 (m, 3H, H-3', CH₂ alifatyczne od grupy NPE), 4,00-4,12 (m, 1H, H-4'), 3,70 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,10-3,69 (m, 22H, H-5', 5'', CH₂ alifatyczne od grupy NPE, 2×CH od grup i-Pr, CH₂ – 3, 5, 7, 10, 12, 14 od reszty sperminy, CH₂-OP, CH₂-CN), 2,72-2,78 (m, 1H, H-2'), 2,58-2,65 (m, 1H, H-2''), 1,4-1,9 (m, 8H, CH₂ – 4, 8, 9, 13 od reszty sperminy), 1,04-1,20 (m, 12H, 4× CH₃ od grup i Pr).

³¹P NMR (CH₃CN): δ (ppm) 148,119, 148,623.

5.10.6. 3'-Amidofosforyn 5-[tetrakis(*N,N',N'',N'''*-trifluoroacetylo)-2,6,11,15-tetraazapentadekano-1-ylo]-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydyny (**202**)

Reakcję przeprowadzono na związku **196** (406 mg, 0,36 mmola) analogicznie do otrzymywania amidofosforynu **199**. Natomiast surowy produkt **202** oczyszczono na kolumnie chromatograficznej przygotowanej w mieszaninie heksanu i octanu etylu (65% : 30%) z 5% dodatkiem trietyloaminy, produkt wypłynął przy 60 do 70 % octanu etylu, otrzymano 334 mg **202** białego liofilizatu; wyd. 70%. R_f(F) = 0,50, R_f(G) = 0,40.

¹H NMR (CDCl₃): δ (ppm) 11,56 (bs, 1H, NH-3), 9,45-9,52 (m, 1H, NH-15 od reszty sperminy), 7,68 (m, 1H, H-6), 6,83-7,40 (m, 13H, aromatyczne od DMT), 6,08-6,14 (m, 1H, H-1'), 4,39-4,48 (m, 1H, H-3'), 4,09 (m, 1H, H-4'), 3,97-4,00 (m, 2H, H-5', 5''), 3,72 (s, 6H, 2×OCH₃ od DMT), 3,19-3,68 (m, 16H, 2×CH od grup i-Pr, C(5)-CH₂- 1, CH₂- 3, 5, 7, 10, 12, 14 od reszty sperminy), 2,61-2,76 (m, 4H, CH₂-OP, CH₂-CN), 2,27-2,44 (m, 2H, H-2', 2''), 1,53-1,90 (m, 8H, CH₂- 4, 8, 9, 13 od reszty sperminy), 0,94-1,16 (m, 12H, 4×CH₃ od grup i-Pr).

³¹P NMR (CH₃CN): δ (ppm) 148,249, 148,822.

5.11. Synteza i oczyszczanie poliaminooligonukleotydów

Liofilizaty 3'-amidofosforynów poliaminonukleozydów rozpuszczono w acetonitrylu i zasypiano sitami 3Å na dzień przed wykonaniem syntez poliaminooligonukleotydów. Standardowe 3'-amidofosforyny rozpuszczono i zasypiano sitami na godzinę przed rozpoczęciem syntezy. Syntezy prowadzono w skali 0,2 μmola. W przypadku każdej kondensacji podawano taką samą ilość amidofosforynu i nie przedłużano czasu kondensacji na etapie przyłączania modyfikowanej jednostki. Syntezę prowadzono według programu zamieszczonego w tabeli 9. Natomiast podczas wprowadzania modyfikacji poliamino-2'-O-metylonukleotydowych w oligomerach **M1** i **M2**, wykorzystano dwukrotną ilość odpowiednich amidofosforynów oraz zwiększono czas kondensacji z 2 do 14 minut.

Otrzymane poliaminooligonukleotydy poddano typowej procedurze odblokowania, czyli działaniu 32% wodnego roztworu NH_3 . Natomiast oligomery zawierające pochodną poliaminoguanozyny odblokowywano 40% wodnym roztworem metyloaminy.

Jeżeli całkowity ładunek (q) oligomeru należał do przedziału $q \in \langle -2, +2 \rangle$ roztwory wodne poliaminooligonukleotydów przepuszczano tylko przez NAP-25. W przypadku, gdy całkowity ładunek był $q \leq -2$ oczyszczano tak jak niemodyfikowane oligonukleotydy, natomiast $q \geq +2$ (dla $\text{C}^{\text{sp}}\text{C}^{\text{sp}}\text{C}^{\text{sp}}\text{C}^{\text{sp}}\text{TTTT}$) stosowano bufor fosforanowy i elektroforezę prowadzono w przeciwnym kierunku.

5.12. Hydroliza enzymatyczna poliaminooligonukleotydów

Poliaminooligonukleotydy poddano trawieniu enzymatycznemu stosując enzymy: PDE I z jadu węża i PDE II ze ślędzionicy wołowej. Do trawień pobierano po 0,5 O.D. oligonukleotydu. Następnie dodawano roztwór enzymu i dopełniano wodą do objętości 125 μl . Ilość dodawanego enzymu przeliczano na 1 μmol wiązania fosfodiesterowego. Inkubację prowadzono w temp. 37 °C przez 3 godz. dla PDE I i 0,5 godz. dla PDE II, następnie dezaktywowano enzym w temp. 75 °C przez 15 min. i umieszczano próbki w lodzie na kolejne 15 min. Wizualizację produktów i substratów wykonywano za pomocą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym.

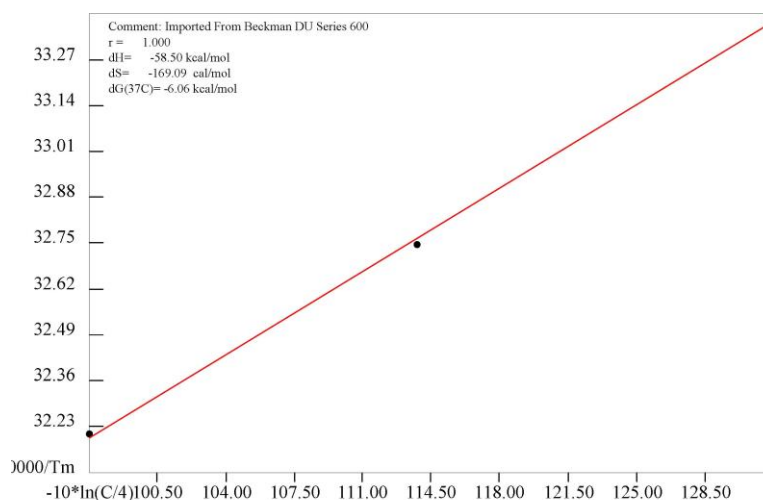
5.13. Pomiar temperatur topnienia struktur dupleksowych

Pomiar prowadzony był dla trzech różnych stężeń oligonukleotydów w kuwetkach o długości optycznej 0,1 cm (obj. 35 μl), 0,5 cm (obj. 150 μl), 1 cm (300 μl). W czwartej, referencyjnej kuwecie znajdował się bufor. Stosowano dwa bufony o $\text{pH} = 7$:

1 M NaCl, 20 mM kokodylan sodu, 0,5 mM wersenian sodu;

0,1 M NaCl, 20 mM kokodylan sodu, 0,5 mM wersenian sodu.

Otrzymane krzywe topnienia dupleksów analizowano przy pomocy programu MeltWin 3.5. Program ten pozwala analizować krzywe topnienia i wyznaczyć parametry termodynamiczne: entalpię (ΔH°), entropię (ΔS°), i energię swobodną (ΔG°_{37}) na dwa sposoby. Pierwsza metoda opiera się na dopasowaniu eksperymentalnych krzywych topnienia z krzywymi teoretycznymi. W drugiej metodzie parametry termodynamiczne obliczone są z wykresu zależności odwrotności temperatury ($1/T_m$) od logarytmu stężenia oligonukleotydu. Dla dupleksów zależność ta jest liniowa (rys. 22). Raport uzyskany programem Melt.Win przedstawia rysunek 23.



Rys. 22. Zależność $1/T_m$ od $\ln C_T$ otrzymany w programie MeltWin 3.5

Full Analysis
Date: 29 Aug 2002 Comment: Imported From Beckman DU Series 600

Melt Curve Results				
Concentration (M)	dH (kcal/mol)	dS (cal/K·mol)	dG (kcal/mol, 37°C)	Tm (°C)
2.449e-04	-45.34	-126.76	-6.03	37.33
4.571e-05	-50.82	-143.82	-6.22	32.22
7.563e-06	-55.43	-158.89	-6.15	26.35
Averages:	-50.53	-143.16	-6.13	31.97

Analysis of Melt Curve Fits/Errors			
dH (kcal/mol)	dS (cal/K·mol)	dG (kcal/mol, 37°C)	Tm (°C, 1.0e-4M)
-50.53 ± 5.050	-143.16 ± 16.073	-6.13 ± 0.097	34.6

Analysis of Tm Dependence/Errors			
dH (kcal/mol)	dS (cal/K·mol)	dG (kcal/mol, 37°C)	Tm (°C, 1.0e-4M)
-58.50 ± 1.757	-169.09 ± 5.765	-6.06 ± 0.032	34.5

Rys. 23. Przykład raportu końcowego otrzymanego w programie MeltWin 3.5 uzyskującego zestawienie parametrów termodynamicznych

Przyjmuje się, że jeśli rozbieżności parametrów termodynamicznych obliczonych według obu metod są mniejsze niż 15%, to topnienie danego dupleksu odbywa się według modelu dwustanowego.

5.14. Pomiar temperatur topnienia struktur trypleksowych

Pomiar prowadzony był dla 1 μ M stężenia oligonukleotydów w kuwetce o długości optycznej 1 cm (300 μ l). W referencyjnej kuwetce znajdował się bufor. Stosowano dwa bufory o pH 7:

10 mM TRIS*HCl, 20 mM MgCl₂, 100mM NaCl;

10 mM PIPESNa, 10 mM MgCl₂, 100mM NaCl.

Otrzymane krzywe analizowano przy pomocy programu TableCurve 2D 5.0, do odczytu wartości temperatury topnienia trypleksu z pierwszej pochodnej wykorzystano funkcję: *LS B- Spline opt* (parametry *order* 3 i *knot* 10). Zastosowana funkcja umożliwiła wyeliminowanie szumów.

6. LITERATURA

1. Zon, G. *Pharm.Research* **1988**, 5(9), 539.
2. Stein, C. A.; Cohen, J. S. *Cancer Research* **1988**, 48, 2659.
3. Calabretta, B. *Cancer Research* **1991**, 51, 4505.
4. Thoung, N. T.; Helene, C. *Angew.Chem., Int.Ed.Engl.* **1993**, 32, 666-690.
5. Stec, W. J. *Biotechnologia* **1994**, 4(27), 5-15.
6. Stec, W. J.; Guga, P. *Biotechnologia* **1996**, 4(35), 91-107.
7. Hall, R. H. *The Modified Nucleosides in Nucleic Acids* **1971**, Columbia University Press, New York.
8. Lamond, A. I.; Sproat, B. S.; Ryder, U. *Cell* **1989**, 58, 383-390.
9. Blencowe, B. J.; Sproat, B. S.; Ryder, U.; Barbino, S.; Lamond, A. I. *Cell* **1989**, 59, 531-539.
10. Beigelman, L.; McSwiggen, J. A.; Draper, K. G.; Gonzalez, C.; Jensen, K.; Karpeisky, A.; Modak, A. S.; Matulic-Adamic, J.; DiRenzo, A. B.; Haeberli, P.; Sweedler, D.; Tracz, D.; Grimm, S.; Wincott, F. E.; Trackray, V. G.; Usman, N. *J.Biol.Chem.* **1995**, 270, 25702-25708.
11. Haines, A. H. *Tetrahedron* **1973**, 29, 2807-2810.
12. Chavis, C.; Dumont, F.; Wightman, J. C.; Ziegler, J. C.; Imbach, J. L. *J.Org.Chem.* **1982**, 47, 202-206.
13. Haines, A. H.; Lundie, P. R. *J.Chem.Soc.(C)* **1970**, 1691-1693.
14. Chavis, C.; Dumont, F.; Imbach, J. L. *J.of Carbohydrates, Nucleosides & Nucleotides* **1978**, 5(2), 133-147.
15. Ness, R. K.; Fletcher, H. G. *Am.Chem.Soc.* **1956**, 78, 4710-4714.
16. Ross, B. S.; Springer, R. H.; Vasquez, G.; Andrews, R. S.; Cook, P. D.; Acevedo, O. L. *J.Heterocycl.Chem.* **1994**, 31, 765-769.

17. Arnarp, J.; Kenne, L.; Lindberg, B.; Lonngren, J. *Carbohydr.Res.* **1975**, *44*, C5.
18. Bangs, J. D.; Crain, P. F.; Hashizume, T.; McCloskey, J.; Boothroyd, C. *J.Biol.Chem.* **1992**, *267*, 9805.
19. Vorbrüggen, H.; Krolkiewicz, K.; Bärbel, B. *Chem.Ber.* **1981**, *144*, 1234-1255.
20. Parmentier, G.; Schmitt, G.; Dolle, F.; Luu, B. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 5361-5368.
21. Markiewicz, W. T. *J.Chem.Res.(S)* **1979**, 24-25.
22. Beigelman, L.; Karpeisky, A.; Matulic-Adamic, J.; Usman, N. *Nucleosides & Nucleotides* **1995**, *14*, 421-424.
23. Reichman, U.; Watanabe, K. A.; Fox, J. J. *Carbohydr.Res.* **1975**, *42*, 233-240.
24. Broom, A. D.; Robins, R. K. *J.Am.Chem.Soc.* **1965**, *87*, 1145-1151.
25. Gin, J. B.; Dekker, C. A. *Biochemistry* **1968**, *7*, 1413-1419.
26. Martin, D. M. G.; Reese, C. B.; Stephenson, G. F. *Biochemistry* **1968**, *7*, 1406-1412.
27. Khwaija, T. A.; Robins, R. K. *J.Am.Chem.Soc.* **1966**, *88*, 3640-3643.
28. Robins, M. J.; Naik, S. R. *Biochemistry* **1971**, *10*, 3591.
29. Kusmeirek, J. T.; Giziewicz, J.; Shugar, D. *Biochemistry* **1973**, *12*, 194-200.
30. Kusmeirek, J. T.; Darzynkiewicz, E.; Shugar, D. *Biochemistry* **1976**, *15*, 2735-2740.
31. Yamauchi, K.; Kinoshita, M. *J.Chem.Soc., Perkin Trans.1* **1978**, 762-767.
32. Hisanaga, Y.; Tanabe, T.; Yamauchi, K. *Bull.Chem.Soc.Jpn.* **1981**, *54*, 1569-1570.
33. Pettit, G. R.; Yamauchi, K.; Einck, J. J. *Synth.Commun.* **1980**, *10*(1), 25-35.
34. Yamauchi, K.; Nakamura, K.; Kinoshita, M. *J.Org.Chem.* **1978**, *43*(8), 1593-1595.
35. Yano, J.; Kan, L. S.; Ts'O, P. O. P. *Biochim.Biophys.Acta* **1980**, *629*, 178-183.
36. Wagner, E.; Oberhauser, B.; Holzner, A.; Brunar, H.; Issakides, G.; Schaffner, G. F.; Cotten, M.; Knoll Muller, M.; Noe, R. C. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*(21), 5965-5971.
37. Beigelman, L.; Haerberli, P.; Sweedler, D.; Karpeisky, A. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1047-1056.
38. Hodge, R. P.; Sinha, N. D. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2933-2936.
39. Robins, M. J.; Naik, S. R.; Lee, A. S. K. *J.Org.Chem.* **1974**, *39*, 1891-1899.
40. Markiewicz, W. T.; Wiewiórowski, M. *Nucleic Acids Res.* **1975**, *2*(6), 951-960.

41. Robins, M. J.; Hansske, F.; Bernier, S. E. *Can.J.Chem.* **1981**, *59*, 3360-3364.
42. Kusmierek, J. T.; Shugar, D. *Nucleic Acids Res.Spec.Publ.* **1978**, *4*, 73.
43. Ekborg, G.; Garegg, P. *J.of Carbohydrates, Nucleosides & Nucleotides* **1980**, *7*, 57-60.
44. Heikkila, J.; Bjorkman, S.; Oberg, B.; Chattopadhyaya, J. *Acta Chem.Scand.* **1982**, *B36*, 715-717.
45. Cramer, H.; Pfleiderer, W. *Helv.Chim.Acta* **1996**, *79*, 2114-2136.
46. Leonard, T. E.; Bhan, P.; Miller, P. S. *Nucleosides & Nucleotides* **1992**, *11*, 1201-1204.
47. Wagner, D.; Verhyden, J. P. H.; Moffatt, J. G. *J.Org.Chem.* **1974**, *39*, 24-30.
48. Pathak, T.; Chattopadhyaya, J. *Chem.Scr.* **1986**, *26*, 135-139.
49. Yamauchi, K.; Nakagima, T.; Kinoshita, M. *J.Org.Chem.* **1980**, *45*, 3865-3868.
50. Yamauchi, K.; Nakagima, T.; Kinoshita, M. *Bull.Chem.Soc.Jpn.* **1986**, *59*, 2947-2949.
51. Nyilas, A.; Chattopadhyaya, J. *Acta Chem.Scand.* **1986**, *B40*, 826-830.
52. Inoue, H.; Hayase, Y.; Imura, A.; Iwai, S.; Miura, K.; Ohtsuka, E. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 6131-6148.
53. Vaghefi, M. M.; Hogrefe, R. I. *Nucleosides & Nucleotides* **1993**, *12*, 1007-1013.
54. Sproat, B. S.; Beijer, B.; Iribarren, A. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 41-49.
55. Grotli, M.; Douglas, M.; Beijer, B.; Eritja, R.; Sproat, B. S. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **1997**, *7*, 425-428.
56. Sekine, M.; Peshakova, L. S.; Hata, T.; Yokoyama, S.; Miyazawa, Y. *J.Org.Chem.* **1988**, *52*, 5060-5061.
57. Zavgorodny, S.; Polianski, M.; Besidsky, E.; Kriukov, V.; Sanin, A.; Pokrovskaya, M.; Gurskaya, G.; Lonnerberg, H.; Azhayev, A. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *31*, 7593-7596.
58. Mc Gee, D. P. C.; Zhai, Y. *Nucleosides & Nucleotides* **1996**, *15*, 1797-1803.
59. Divakar, K. J.; Reese, C. B. *J.Chem.Soc., Perkin Trans.1* **1982**, 1171.
60. Ross, B. S.; Springer, R. H.; Tortorici, Z.; Dimock, S. *Nucleosides & Nucleotides* **1987**, *16*, 1641-1644.
61. Roy, S.;Tang, J. T. US Patent 5,739,314.
62. Sund, C.; Puri, N.; Chattopadhyaya, J. B. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 12275-12290.

63. Sund, C.; Puri, N.; Chattopadhyaya, J. B. *Nucleosides & Nucleotides* **1997**, *16*(5-6), 755-760.
64. Wachter, L.; Jablonski, J. A.; Ramachandran, K. L. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 7985-7994.
65. Beck, S.; O'Keeffe, T.; Coull, J. M.; Köster, H. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 5115-5123.
66. Bonfils, E.; Depierreux, C.; Midoux, P.; Thuong, N. T.; Monsigny, M.; Roche, A. C. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 4621-4629.
67. De Vos, M. J.; Cravador, A.; Lenders, J. P.; Houard, S.; Bollen, A. *Nucleosides & Nucleotides* **1990**, *9*, 259-273.
68. Cook, P. D. US Patent 5,138,045.
69. Cook, P. D.; Guinasso, Ch. J. US Patent 5,218,105.
70. Tung, C. H.; Breslauer, K. J.; Stein, S. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 5489-5494.
71. Bigey, P.; Pratviel, G.; Meunier, B. *J.Chem.Soc., Chem.Commun.* **1995**, (181), 182.
72. Jäger, A.; Levy, M. J.; Hecht, S. M. *Biochemistry* **1988**, *27*, 7237-7246.
73. Agarwal, S.; Tang, J. Y. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 1543-1546.
74. Murakami, A.; Nakaura, M.; Nakatsuji, Y.; Nagahara, S.; Tran-Cong, Q.; Makino, K. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 4097-4102.
75. Horn, T.; Chaturvedi, S.; Balasubramaniam, T. N.; Letsinger, R. L. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 743-746.
76. Chaturvedi, S.; Horn, T.; Letsinger, R. L. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 2318-2323.
77. Endo, M.; Azuma, Y.; Saga, Y.; Kuzuya, A.; Kawai, G.; Komiyama, M. *J.Org.Chem.* **1997**, *62*, 846-852.
78. Cosstick, R.; Douglas, M. E. *J.Chem.Soc., Perkin Trans. I* **1991**, 1035-1040.
79. Ogilvie, K. K. *Can.J.Chem.* **1973**, *51*, 3799.
80. Nair, V.; Richardson, S. G. *J.Org.Chem.* **1980**, *45*, 3969.
81. Takeda, T.; Ikeda, K.; Mizuno, Y.; Ueda, T. *Chem.Pharm.Bull.* **1987**, *35*(9), 3558-3567.
82. Gibson, K. J.; Benkovic, S. J. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *16*, 6455.
83. Eckstein, F.; Imazawa, M. *J.Org.Chem.* **1979**, *44*, 2039.
84. Ferentz, A. E.; Verdine, G. L. *J.Am.Chem.Soc.* **1991**, *113*, 4000-4002.

85. Ferentz, A. E.; Verdine, G. L. *Nucleosides & Nucleotides* **1992**, *11*(10), 1749-1763.
86. MacMillan, A. M.; Verdine, G. L. *J.Org.Chem.* **1990**, *55*(24), 5931-5933.
87. MacMillan, A. M.; Verdine, G. L. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2603-2616.
88. Seela, F.; Herdering, W.; Kehne, A. *Helv.Chim.Acta* **1987**, *70*, 1649.
89. Prakash, T. P.; Ganesh, K. N. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **1994**, *3*(4), 689-692.
90. Singh, D.; Kumar, V.; Ganesh, K. N. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3393-3347.
91. Tamm, C.; Strazewski, P. *Angew.Chem.Int.Ed.Eng.* **1990**, *29*, 36-57.
92. Markiewicz, W. T.; Godzina, P.; Markiewicz, M. *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*(6-7), 1449-1455.
93. Godzina, P.; Adrych-Rożek, K.; Markiewicz, W. T. *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*(11-12), 2397-2414.
94. Gillam, I. C.; Tener, G. M. *Anal.Biochem.* **1986**, *157*, 199.
95. Telser, J.; Cruickshank, K. A.; Morrison, L. E.; Netzel, T. L. *J.Am.Chem.Soc.* **1989**, *111*, 6966-6976.
96. Telser, J.; Cruickshank, K. A.; Schanze, K. S.; Netzel, T. L. *J.Am.Chem.Soc.* **1989**, *111*, 7221-7226.
97. Kierzek, R.; Markiewicz, W. T. *Nucleosides & Nucleotides* **1987**, *6*, 403-405.
98. Sproat, B. S.; Lamond, A. I.; Beijer, B.; Neuner, P.; Ryder, U. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 3373-3386.
99. Iribarren, A. M.; Sproat, B. S.; Neuner, P.; Sulston, I.; Ryder, U.; Lamond, A. I. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1990**, *87*, 7747-7751.
100. Roget, A.; Bazin, H.; Teoule, R. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 7643-7651.
101. Prakash, T. P.; Barawkar, D. A.; Kumar, V.; Ganesh, K. N. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **1994**, *4*, 1733-1738.
102. Meyer, A.; Morvan, F.; Rayner, B.; Imbach, J. L. *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*(6-7), 1631-1632.
103. Zhou, X. X.; Chattopadhyaya, J. *Tetrahedron* **1986**, *42*, 5149-5156.
104. Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. *Tetrahedron* **1993**, *49*(10), 1925-1963.
105. Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. *Tetrahedron* **1993**, *49*(46), 10441-10488.
106. Sinha, N. D.; Biernut, J.; Mc Manus, J.; Köster, H. *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 4539-4557.

107. Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. *Tetrahedron* **1992**, *48*(12), 2223-2311.
108. Markiewicz, W. T.; Godzina, P.; Markiewicz, M.; Astriab, A. *Nucleosides & Nucleotides* **1998**, *17*(9-11), 1871-1880.
109. Schmid, N.; Behr, J. P. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1447-1450.
110. Adib, A.; Potier, P. F.; Doronina, S.; Huc, I.; Behr, J. P. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*(17), 2989-2992.
111. Potier, P.; Adib, A.; Kochkine, A.; Huc, I.; Behr, J. P. *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, *18*(6-7), 1467-1468.
112. Pfeleiderer, W.; Schwarz, M.; Schirmeister, H. *Chemica Scr.* **1986**, *26*(157).
113. Pfeleiderer, W.; Himmelsbach, F.; Charubala, R.; Schirmeister, H.; Beiter, A.; Schulz, B.; Trichtinger, T. *Nucleosides & Nucleotides* **1985**, *4*, 81.
114. Himmelsbach, F.; Schulz, B. S.; Trichtinger, T.; Charubala, R.; Pfeleiderer, W. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 59.
115. Schirmeister, H.; Himmelsbach, F.; Pfeleiderer, W. *Helv.Chim.Acta* **1993**, *76*, 385.
116. Aviño, A.; Eritja, R. *Nucleosides & Nucleotides* **1994**, *13*, 2059.
117. Alul, R. H.; Singman, C. N.; Zhang, G.; Letsinger, R. L. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 1527.
118. Aviño, A.; Güimil-Garcia, R.; Diaz, A.; Albericio, F.; Eritja, R. *Nucleosides & Nucleotides* **1996**, *15*, 1871.
119. Diaz, A. R.; Eritja, R.; Garcia, R. G. *Nucleosides & Nucleotides* **1997**, *16*, 2035-2051.
120. Weber, H.; Khorana, H. G. *J.Mol.Biol.* **1972**, *72*, 219.
121. Miller, P. S.; Reddy, M. P.; Murakami, A.; Blake, K. R.; Lin, S.; Agris, C. H. *Biochemistry* **1986**, *25*, 5092.
122. Hogrefe, R. I.; Vaghefi, M. M.; Reynolds, M. A.; Young, K. M.; Arnold, L. J. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2031.
123. Reddy, M. P.; Hanna, N. B.; Farooqui, F. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 4311.
124. Hovinen, J.; Guzaev, A.; Azhayev, A.; Lönnberg, H. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 7203.
125. Manoharan, M.; Ramasamy, K. S.; Mohan, V.; Cook, P. D. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *27*(43), 7675-7678.
126. Ramasamy, K. S.; Zounes, M.; Gonzalez, D.; Freier, S. M.; Lesnik, E. A.; Cummins, L. L.; Griffey, R. H.; Monia, B. P.; Cook, P. D. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 215-218.
127. Cook, P. D.; Ramasamy, K. S.; Manoharan, M. US Patent **5,459,255**.

128. Ikeda, K.; Hisaka, A.; Misu, Y. *Abstract of Papers, 103rd Annual Meeting of Pharmaceutical Society of Japan, Sendai* **1984**, 221.
129. Bhatt, M. V.; Perumal, P. T. *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 2605.
130. Ono, A.; Okamoto, T.; Inada, M.; Nara, H.; Matsuda, A. *Chem.Pharm.Bull.* **1994**, 42(11), 2231-2237.
131. Stawiński, J.; Hozumi, T.; Narang, S. A.; Bahl, C. P.; Wu, R. *Nucleic Acids Res.* **1977**, 4, 353.
132. Efimov, V. A.; Reverdatto, S. V.; Chakhmakhcheva, O. G. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 961.
133. Miyoshi, K.; Arentzen, R.; Huang, T.; Itakura, K. *Nucleic Acids Res.* **1980**, 8, 5507.
134. Godzina, P.; Markiewicz, W. T. *Collect.Czech.Chem.Communic., wyd.spec.* **1999**, 2, 79-82.
135. Nara, H.; Ono, A.; Matsuda, A. *Bioconjugate Chem.* **1995**, 6, 54-61.
136. Haginoya, N.; Ono, A.; Nomura, Y.; Ueno, Y.; Matsuda, A. *Bioconjugate Chem.* **1997**, 8, 271-280.
137. Nomura, Y.; Ueno, Y.; Matsuda, A. *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25(14), 2784-2791.
138. Ono, A.; Haginoya, N.; Kiyokawa, M.; Minakawa, N.; Matsuda, A. *Biomed.Chem.Lett.* **1993**, 4, 361-366.
139. Ueno, Y.; Mikawa, M.; Matsuda, A. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* **1997**, 7, 2863-2866.
140. Ueno, Y.; Mikawa, M.; Matsuda, A. *Bioconjugate Chem.* **1998**, 9(1), 33-39.
141. Ito, T.; Ueno, Y.; Komatsu, Y.; Matsuda, A. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31(10), 2514-2523.
142. Ozaki, H.; Nakamura, A.; Arai, M.; Endo, M.; Sawai, H. *Bull.Chem.Soc.Jpn.* **1995**, 68, 1981-1987.
143. Ozaki, H.; Ogawa, Y.; Mine, M.; Sawai, H. *Nucleosides & Nucleotides* **1998**, 17(5), 911-923.
144. Shinozuka, K.; Matsukura, M.; Okamoto, T.; Sawai, H. *Nucleosides & Nucleotides* **1998**, 17(9-11), 2081-2084.
145. Felsenfeld, G.; Davies, R. D.; Rich, A. *J.Am.Chem.Soc.* **1957**, 79, 2023-2024.
146. Le Doan, T.; Perrouault, L.; Praseuth, D.; Habhoub, N.; Decout, J. L.; Thoung, N. T.; Lhomme, J.; Helene, C. *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 7749-7760.
147. Moser, H. E.; Dervan, P. B. *Science* **1987**, 238, 645-650.

148. Helene, C.; Toulme, J. J. *Oligonucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression* **1989**, McMillan Press, London.
149. Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171*, 737-738.
150. Felsenfeld, G.; Rich, A. *Biochem.Biophys.Acta* **1957**, *26*, 457-468.
151. Hoogsteen, K. *Acta Crystallographica* **1959**, *12*, 822-823.
152. Beal, P. A.; Dervan, P. B. *Science* **1991**, *251*, 1360-1363.
153. Wells, R. D.; Harvey, S. C. *Unusual DNA Structures* **1988**, Springer-Verlag, New York.
154. Frank-Kamenetski, M. D. *Methods in Enzymology* **1992**, *211*, 180-191.
155. Soyfer, V. N.; Potaman, V. N. *Triple Helical Acids* **1996**, Springer-Verlag, New York.
156. Helene, C. *Anti-Cancer Drug Design* **1991**, *6*, 569-584.
157. Thomas, T. J.; Bloomfield, V. A. *Biopolymers* **1984**, *23*, 1295-1306.
158. Bloomfield, V. A. *Biopolymers* **1991**, *31*, 1471-1481.
159. Stevans, C. L.; Felsenfeld, G. *Biopolymers* **1964**, *2*, 293-314.
160. Tabor, H. *Biochemistry* **1962**, *1*, 496-501.
161. Maher, L. J. I.; Dervan, P. B.; Wold, B. J. *Biochemistry* **1990**, *29*, 8820-8826.
162. Hampel, K. J.; Crosson, P.; Lee, J. S. *Biochemistry* **1991**, *30*, 4455-4459.
163. Thomas, T.; Thomas, T. J. *Biochemistry* **1993**, *32*, 14068-14074.
164. Frank-Kamenetski, M. D. *Biopolymers* **1964**, *2*, 293-314.
165. Manning, G. S. *Q. Rev.Biophys.* **1978**, *11*, 179-249.
166. Record, M. T. Jr.; Anderson, C. F.; Lohmann, T. M. *Q. Rev.Biophys.* **1978**, *11*, 103-178.
167. Roberts, R. W.; Crothers, D. M. *Science* **1992**, *258*, 1463-1466.
168. Rougee, M.; Faucon, B.; Mergny, J. L.; Barcelo, F.; Giovannangeli, C.; Garestier, T.; Helene, C. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9269-9278.
169. Xodo, L. E.; Alunni-Fabbroni, M.; Manzini, G.; Quadrifoglio, F. *Eur.J.Biochem.* **1993**, *212*, 395-401.
170. Tibanyenda, N.; De Bruin, S. H.; Van Boom, J. H.; Haasnoot, C. A. G.; Vander, M. G. A.; Hilbers, C. *Eur.J.Biochem.* **1984**, *139*, 19-27.

171. Horne, D.; Dervan, P. B. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 4963-4965.
172. Hausheer, F. H.; Singh, U. C.; Saxe, J. D.; Flory, J. P.; Tuffo, K. B. *J.Am.Chem.Soc.* **1992**, *114*, 5356-5362.
173. Singleton, S. F.; Dervan, P. B. *Biochemistry* **1992**, *31*, 10995-11003.
174. Froehler, B. C.; Ricca, D. J. *J.Am.Chem.Soc.* **1992**, *114*, 8320-8322.
175. Drew, H. R.; Dickerson, R. E. *J.Mol.Biol.* **1981**, *151*, 535-556.
176. Campos, J. L.; Subirana, J. A. *J.Biomol.Struct.Dyn.* **1987**, *5*, 15-19.
177. Mohan, V.; Smith, P. E.; Pettitt, B. M. *J.Am.Chem.Soc.* **1993**, *115*(9297), 9298.
178. Radhakrishnan, I.; Patel, D. J. *Structure* **1994**, *2*, 395-405.
179. Ganesh, K. N.; Rajeev, K. G.; Pallan, P. S.; Rana, V. S.; Barawkar, D. A.; Kumar, V. *Nucleosides & Nucleotides* **1997**, *16*(7-9), 1271-1278.
180. Wang, S.; Kool, E. T. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*(7), 1157-1164.
181. Samanto, V.; Miles, R. W.; Robins, M. J. *J.Am.Chem.Soc.* **1994**, *116*, 9331-9332.
182. Miles, R. W.; Samanto, V.; Robins, M. J. *J.Am.Chem.Soc.* **1995**, *117*, 5951-5957.
183. Godzina, P. *Praca Doktorska* **1999**.
184. Astriab, A. *Praca Doktorska* **1997**.
185. Markiewicz, M.; Astriab, A.; Markiewicz, W. T. *Collect.Czech.Chem.Comm.* **1996**, *61*, 315-318.
186. Milligan, J. F.; Krawczyk, S. H.; Wadwani, S.; Matteucci, M. D. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 327-333.
187. Markiewicz, W. T.; Groger, G.; Rosch, R.; Zebrowska, A.; Markiewicz, M.; Klotz, M.; Hinz, M.; Godzina, P.; Seliger, H. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3672-3680.
188. Mitsunobu, O. *Synthesis* **1981**, 1-28.
189. Trichtinger, T.; Charubala, R.; Pfleiderer, W. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 211.
190. Matsukura, M.; Shinozuka, K.; Zon, G.; Mitsuya, H.; Reitz, M.; Cohen, J. S.; Broder, S. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **1987**, *84*, 7706-7711.
191. Agrawal, S.; Goodchild, J. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 3539-3542.
192. Letsinger, R. L.; Singman, C. N.; Hestand, G.; Salunkhe, M. *J.Am.Chem.Soc.* **1988**, *110*, 4470-4471.
193. Johnsson, U.; Malmquist, M. *BioTechniques* **1991**, *11*, 620-627.

194. Fageastam, L. G.; Karrlson, R.; Frostell-Karrlson, A. *J.Chromatography* **1992**, 597, 397-410.
195. Malmquist, M. *Nature* **1993**, 361, 186-187.
196. Vo, T.; Wang, S.; Kool, E. T. *Nucleic Acids Res.* **1995**, 23(15), 2937-2944.
197. Darby, R. A. J.; Sollogoub, M.; McKeen, C.; Brown, L.; Risitano, A.; Brown, N.; Barton, C.; Brown, T.; Fox, K. R. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30(9), 39-46.