



ANNA RULKA

Rozprawa doktorska

**SEKWENCJONOWANIE OLIGONUKLEOTYDÓW
BIBLIOTEK KOMBINATORYCZNYCH ZA POMOCĄ
SPEKTROMETRII MAS**

przedstawiona

Radzie Naukowej

Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu

w celu uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych

Promotor: **prof. dr hab. W. T. Markiewicz**

Poznań 2010

Chciałabym złożyć podziękowania:

Promotorowi, prof. dr hab. W. T. Markiewiczowi, za wskazanie tematu pracy,
nieocenioną pomoc w czasie jej wykonywania, a także życzliwość i
cierpliwość,

Wszystkim koleżankom i kolegom z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN za
niezwykłe sympatyczną atmosferę pracy,

Ale przede wszystkim Rodzicom...

SPIS TREŚCI

KOMUNIKATY KONFERENCYJNE DOTYCZĄCE PRACY	4
WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	5
I PRZEGLĄD LITERATUROWY	7
1. Klasyfikacja bibliotek kombinatorycznych	8
2. Synteza bibliotek kombinatorycznych	9
3. Metody „czytania” struktury wyselekcjonowanych elementów bibliotek kombinatorycznych	10
3.1. Metody pośrednie	10
3.1.1. Bezpośrednie czytanie struktury kopii elementu	10
3.1.2. Dekonwolucja rekurencyjna	11
3.1.3. Sekwencjonowanie etykiet kodujących	12
3.1.4. „Odczytywanie” struktury etykiet kodujących	13
3.1.5. „Czytanie” binarnych etykiet kodujących	16
3.1.6. Spektralna analiza etykiet kodujących	18
3.1.7. Etykiety niechemiczne	19
3.2. Metody bezpośrednie	20
3.2.1. Pozycyjne kodowanie	20
3.2.2. Bezpośrednie sekwencjonowanie	20
3.2.3. Metody spektralne	21
3.2.3.1. Analiza jonów fragmentarycznych – biblioteki peptydowe	21
3.2.3.2. Kontrolowane generowanie krótszych sekwencji	23
3.2.3.3. Analiza jonów fragmentarycznych - oligonukleotydy	25
3.2.3.4. Analiza fragmentów powstałych w wyniku trawienia enzymatycznego	27
3.2.3.5. Modyfikowane oligonukleotydy	31
3.2.3.6. Analiza fragmentów powstałych w wyniku chemicznej syntezy oligonukleotydu	33
3.2.3.7. Metody mieszane	34
3.2.3.8. Fosforanotriestry oligonukleotydów	35
4. Łączniki do syntezy na podłożu stałym	36
4.1. Łączniki fotolabilne	37
II SPEKTROMETRIA MAS MALDI-TOF	42
1. Wprowadzenie	42
2. Mechanizm powstawania jonów	43
3. Analizator mierzący czas przelotu (TOF)	44
4. Analiza kwasów nukleinowych	46
4.1. Matryce	46
4.2. Stabilność jonów i fragmentacja	48
4.3. Przygotowanie próbki do analizy MALDI	51
5. Podsumowanie	52
III WYNIKI I DYSKUSJA	53
1. Wstęp	53
2. Wybór metody analizy oligonukleotydów	54
3. Analiza fosfortriestrów oligonukleotydów za pomocą spektrometrii mas MALDI-TOF	54
4. Synteza i badanie właściwości „fotolabilnego podłoża”	57
4.1. Synteza i zastosowanie łącznika Raynera	57
4.1.1. Analiza MALDI-TOF fosfortriestrów oligonukleotydów związanych z podłożem poprzez łącznik fotolabilny	58
4.2. Synteza i badanie właściwości „fotolabilnego podłoża”	61
4.2.1. Opracowanie warunków analizy MALDI fosforanotriestrów oligonukleotydów związanych z „podłożem fotolabilnym”	63

4.2.3. Warunki odblokowania oligonukleotydu związanego z „podłożem fotolabilnym”	67
4.2.3. Określenie zakresu fragmentacji oligonukleotydów związanych z podłożem poprzez łącznik fotolabilny	69
4.2.4. Badanie trwałości połączeń podłoże-łącznik fotolabilny oraz łącznik-oligonukleotyd w roztworze	73
5. Synteza układu <i>cis</i>-diolowego jako łącznika do syntezy oligonukleotydu i badanie jego właściwości	76
5.1. Synteza łącznika	77
5.2. Optymalizacja warunków rozszczepienia reszty rybozy	80
6. Opracowanie warunków analizy MALDI produktów syntezy oligonukleotydu	88
6.1. Sterowanie wydajnością syntezy oligonukleotydu	92
6.2. Kontrolowane generowanie krótszych fragmentów	93
6.2.1. Metoda rozcinania łańcucha polimeru	93
6.1.2. Metoda czynników terminujących chemiczną syntezę oligonukleotydu	99
7. Sprawdzenie opracowanej metody sekwencjonowania na modelowej kombinatorycznej bibliotece oligonukleotydowej	104
7.1. Synteza modelowej oligonukleotydowej biblioteki kombinatorycznej	104
7.2. Synteza sondy fluorescencyjnej	105
7.3. Selekcja i analiza elementów biblioteki kombinatorycznej za pomocą spektrometrii mas MALDI	106
PODSUMOWANIE	110
IV CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	113
1. Odczynniki chemiczne	113
1.1. Odczynniki	113
1.2. Rozpuszczalniki	113
2. Aparatura	114
3. Techniki ogólne	115
4. Przepisy szczegółowe	116
4.1. Funkcjonalizacja podłoża	116
4.2. Synteza 3-amidofosforynu 1-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-1-(<i>o</i> -nitrofenylo)-1,3-propanodiolu (5)	117
4.2.1. 1-(<i>o</i> -Nitrofenylo)but-3-en-1-ol (2)	117
4.2.2. 1-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-1-(<i>o</i> -nitrofenylo)-but-3-en-1-ol (3)	117
4.2.3. 1-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-1-(<i>o</i> -nitrofenylo)-1,3-propanodiol (4)	118
4.2.4. 3-Amidofosforyn 1-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-1-(<i>o</i> -nitrofenylo)-1,3-propanodiolu (5)	119
4.3. Synteza kwasu 3-benzoiloksy-3-(<i>o</i> -nitrofenylo)propanowego (8)	119
4.3.1. 1-O-Benzoil-1-(<i>o</i> -nitrofenylo)but-3-en-1-ol (7)	119
4.3.2. Kwas 3-benzoiloksy-3-(<i>o</i> -nitrofenylo)propanowy (8)	120
4.4. Synteza kwasu 4-benzoiloksy-4-(<i>o</i> -nitrofenylo)butanowego (16)	120
4.4.1. 1-(<i>o</i> -Nitrofenylo)pent-4-en-1-ol	120
4.4.2. 1-O-Benzoil-1-(<i>o</i> -nitrofenylo)pent-4-en-1-ol (15)	121
4.4.3. Kwas 4-benzoiloksy-4-(<i>o</i> -nitrofenylo)butanowy (16)	121
4.5. Synteza „podłoży fotolabilnych”: 9, 10, 14, 17 i 18	122
4.5.1. „Podłoża fotolabilne” 9, 10 i 18	122
4.5.2. „Podłoże fotolabilne” 14 i 17	123
4.6. Synteza 3'-amidofosforynu 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydyny (23)	123
4.6.1. 2'-Deoksyurydyna (21)	123
4.6.2. 5'-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydyna (22)	124
4.6.3. 3'-Amidofosforyn 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydyny (23)	124
4.7. Synteza 4-(<i>o</i> -nitrofenylo)-N-benzylbutanamid-4-ylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforanu (34)	125
4.7.1. 4-Benzoiloksy-4-(<i>o</i> -nitrofenylo)-N-benzylbutanamid (27)	125
4.7.2. 4-Hydrokso-4-(<i>o</i> -nitrofenylo)-N-benzylbutanamid (28)	126
4.7.3. 5'-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)tymidyna	126
4.7.4. Bis(2-cyanoetylo) 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforan (31)	127
4.7.5. 2-Cyanoetylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforan (32)	128

4.7.6. 4-(<i>o</i> -Nitrofenylo)-N-benzylbutanamid-4-ylo 2-cyanoetylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforan (33)	128
4.7.7. 4-(<i>o</i> -Nitrofenylo)-N-benzylbutanamid-4-ylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforan (34)	129
4.8. Synteza 4-N-(8-amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynylo-N-benzylsukcyndiamidu (42)	130
4.8.1. 4-N- <i>p</i> -Toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyna (37)	130
4.8.2. 4-N- <i>p</i> -Toluenosulfonylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-cytydyna (38)	131
4.8.3. 4-N-(8-Amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyna (39)	131
4.8.4. 4-N-(8-Amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynylo-sukcynamid (40)	132
4.8.5. Kwas 4-(benzylamino)-4-oksobutanowy (41)	133
4.8.6. 4-N-(8-Amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynylo-N-benzylsukcyndiamid (42)	133
4.9. „Podłoże oksylabilne” (45)	134
4.10. Synteza tymidyn-3'-ylo cytydyn-5'-ylo fosforanu (47)	134
4.10.1. 4-N-Benzoilocytydyna	134
4.10.2. 4-N-2',3'-O-Tribenzoilocytydyna	135
4.10.3. 2-Cyanoetylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo 4-N-2'3'-O-tribenzoilocytydyn-5'-ylo fosforan (46)	136
4.10.4. Tymidyn-3'-ylo cytydyn-5'-ylo fosforan (47)	136
4.11. 2-O-Amidofosforyn 4-N-(2-(2-Hydroksyetoksy)etylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyny (51)	137
4.11.1. 4-N-(2-(2-Hydroksyetoksy)etylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyna (48)	137
4.11.2. 4-N-(2-(2- <i>tert</i> -Butylodimetylosililoksyetoksy)etylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyna (49)	137
4.11.3. 4-N-(2-(2-Hydroksyetoksy)etylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyna (50)	138
4.11.4. 2-O-Amidofosforyn 4-N-(2-(2-Hydroksyetoksy)etylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyna (51)	139
4.12. Synteza 3'-amidofosforynów N-blokowanych 5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksynukleozydów (53A-D)	139
4.12.1. N-Blokowane 2'-deoksynukleozydy (52A-C)	139
4.12.2. N-Blokowane 5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksynukleozydy	140
4.13. 3'-Amidofosforyn 4-N-[tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksycytydyny (57)	143
4.13.1. 4-N- <i>p</i> -Toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydyna (54)	143
4.13.2. 4-N-(4,9,13-Triazatridekano-1-ylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksy-cytydyna (55)	143
4.13.3. 4-N-[Tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydyna	144
4.13.4. 4-N-[Tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-2'-deoksy-cytydyna	144
4.13.5. 4-N-[Tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksycytydyna (56)	145
4.13.6. 3'-Amidofosforyn 4-N-[tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksycytydyny (57)	145
4.14. 3'-Amidofosforyn 4-N- <i>p</i> -toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydyny	146
4.15. Porównanie reaktywności 3'-amidofosforynu 5'-O-(4,4'-dimetokstrytylo)tymidyny i 3-amidofosforynu 1-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-1-(<i>o</i> -nitrofenylo)-1,3-propanodiolu (5)	147
4.16. Synteza oligonukleotydów	147
4.17. Odblokowanie oligonukleotydu	148
4.18. Odłączenie oligonukleotydu od „podłoża fotolabilnego”	149
4.19. Rozszczepienie układu rybozy 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo cytydyn-5'-ylo fosforanu (47) w roztworze	149
4.20. Nadjodan amonu	149
4.21. Odłączenie oligonukleotydu od „podłoża oksylabilnego”	149
4.23. Synteza sondy fluorescencyjnej	149
4.24. Synteza kombinatorycznej biblioteki oligonukleotydowej	150
4.25. Eksperyment hybrydyzacyjny	150
4.26. Analiza mikroskopowa	151
4.27. Analiza MALDI	151

KOMUNIKATY KONFERENCYJNE ZWIĄZANE Z TEMATYKĄ PRACY:

‘Wykorzystanie spektrometrii mas MALDI-TOF w analizie oligonukleotydów’ XLVIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Poznań, **2005**

Abstrakt: A. Rulka i W. T. Markiewicz, ‘Sequencing of Oligonucleotide Combinatorial Libraries with MALDI-TOF Mass Spectrometry’, *Acta Biochimica Polonica*, Abstracts of the 1st Conference of Polish Mass Spectrometry Society Puławy, Poland April 16th – 18th, Supplement 2, **2008**.

‘Sequencing of Oligonucleotide Combinatorial Libraries with Mass Spectrometry’, YoungChem, International Conference for Young Scientists, Kraków, **2008**

‘Sequencing of Oligonucleotide Combinatorial Libraries with Mass Spectrometry’, International Conference on Advance in Organic Synthesis, Karpacz, **2009**

‘Sequencing of Oligonucleotide Combinatorial Libraries: Generation of Terminated Sequence Fragments’, Polsko-Amerykańskie Sympozjum Biologii Chemicznej Poświęcone Pamięci Profesora Krzysztofa Michejdy, Łódź, **2009**

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- A** – adenina
AA – kwas antranilowy
ACE (ang. *affinity capillary electrophoresis*) - elektroforeza kapilarna powinowactwa
ATT – 6-aza-2-tiotymina
t-BDMSCl – chlorek *tert*-butylodimetylosililowy
BzCl – chlorek benzoilu
C – cytozyna
CDI – 1,1'-karbonylodiimidazolu
CI (ang. *Cluster Ionization*) – jonizacja klasterowa
CID (ang. *collisionally induced dissociation*) - kolizyjnie indukowana dysocjacja
CSP (ang. *Calf Spleen Phosphodiesterase*) – fosfodiesteraza z grasicy cielęcej
Cyt^{OFA} – amidofosforyn 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-4-(2-(2-hydroksyetyloamino)cytydyny
7-deaza-dATP – 5'-trifosforan 7-deaza-2'-deoksyadenozyny
7-deaza-dGTP – 5'-trifosforan 7-deaza-2'-deoksyguanozyny
ddATP – 5'-trifosforan dideoksyadenozyny
ddCTP – 5'-trifosforan dideoksytydyny
ddGTP – 5'-trifosforan guanozyny
ddTTP – 5'-trifosforan tymidyny
dA^{Bz}poCNE - cyjanoetylo-4-N-benzoilo-2'-deoksyadenoz-3'-ylo-fosforan
dC^{Bz}poCNE – cyjanoetylo-4-N-benzoilo-2'-deoksytyd-3'-ylo-fosforan
dG^{iBu}poCNE – cyjanoetylo-4-N-*izo*-butyrylo-2'-deoksyguanoz-3'-ylo-fosforan
dTpoCNE – cyjanoetylo-3'-deoksytymid-2'-ylo-fosforan
DE (ang. *delayed extraction*) – opóźniona ekstrakcja jonów
DHBA – kwas 2,5-dihydroksybenzoowy
DCC – N,N'-dicykloheksylokarbodiimid
DMSO - dimetylosulfotlenek
DMAP - dimetyloaminopirydyna
DMTCl – chlorek dimetoksytrytylu
5'-DMT-T-SuccCPG – podłoże szklane z 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidynosukcynamidem
ESI (ang. *Electrospray Ionization*) – jonizacja poprzez elektrorozpraszanie
FTICR-MS (ang. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) – spektrometr masowy zaopatrzone w analizator cyklotronowego rezonansu jonowego z transformacją Fouriera
2'-F-dCTP - 5'-trifosforan 2'-deoksy-2'-fluorocytydyny
FAB (ang. *Fast Atom Bombardment*) – wzbudzenie w wyniku bombardowania atomami o wysokiej energii
FADMTdA^{Bz} – 3'-amidofosforyn N-benzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyadenozyny
FADMTdC^{Bz} – 3'-amidofosforyn N-benzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksytydyny
FADMTdG^{i-Bu} – 3'-amidofosforyn N-*izo*-butyrylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyguanozyna
FADMTdT - 3'-amidofosforyn 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksytymidyny
FmocCl – chlorek fluorenylometyloksykarbonylowy
G – guanina
HPA – kwas 3-hydroksypikolinowy
HPLC (ang. *High Performance Liquid Chromatography*) – wysokosprawna chromatografia cieczowa
iBu – *izo*-butyryl
IM (ang. *ion mobility*) – ruchliwość jonów
IRMPD (ang. *Infrared Multiphoton Dissociation*) – fragmentacja wielofotonową światłem podczerwonym
LCAA-CPG (ang. *Long Chain Alkyl Amine-Controlled Pore Glass*) – podłoże szklane o kontrolowanej wielkości porów z długim łącznikiem alkilowoaminowym

- LC/ESI-MS** (ang. *Liquid Chromatography/Electrospray Ionization-Mass Spectrometry*) – spektrometr masowy z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie sprzężony z chromatografem cieczowym
- L-Lys** – L-lizyna
- L-Met** – L-metionina
- MALDI-TOF** (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-of-Flight*) – laserowa desorpcja/jonizacja wspomagana cząsteczkami matrycy z analizatorem mierzącym czas przelotu jonów
- MALDI-IR** – MALDI, w którym zastosowano laser emitujący światło podczerwone
- NA** – kwas nikotynowy
- Nd-YAG** – laser neodymowy o częstotliwości czterokrotnej
- NHS** – N-hydroksysukcynimid
- NMR** (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*) – magnetyczny rezonans jądrowy
- NS** (ang. *Nozzle Skimmer*) – metoda fragmentacji w źródle jonów
- PCR** (ang. *Polymerase Chain Reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy
- TPSCI** –
- PS** – podłoże polistyrenowe
- PSD** (ang. *Post Source Decay*) – fragmentacja poza źródłem jonów
- SVP** (ang. *Snake Venom Phosphodiesterase*) – fosfodiesteraza z jadu węża
- T** – tymina
- TEAF** – fluorek trietyloamoniowy
- TFA** (ang. *trifluoroacetic acid*) – kwas trifluorooctowy
- THAP** – 2,4,6-trihydroksyacetofenon
- TMSCI** – chlorek trimetylosililowy
- TPSCI** – chlorek kwau 2,4,6-triizopropylbenzenosulfonowego
- TsCl** – chlorek tosyłu

I PRZEGLĄD LITERATUROWY

BIBLIOTEKI KOMBINATORYCZNE

W odpowiedzi na stale rosnące oczekiwania wobec współczesnej nauki, na początku lat 90' zeszłego stulecia, rozwinął się nowy prąd w ukierunkowanej syntezie organicznej nazwany syntezą kombinatoryczną [1]. Wówczas było to nowatorskie podejście do syntezy i badania właściwości związków; w dalszym ciągu jest to użyteczne narzędzie służące do poszukiwania substancji o pożądanym właściwościach. W tym miejscu pozwolę sobie przytoczyć definicję.

Synteza kombinatoryczna jest zamierzonym konstruowaniem zestawu molekuł opartym na logicznym projektowaniu reakcji chemicznych prowadzących do połączenia wybranych monomerów w różnych kombinacjach. Powstały zbiór spokrewnionych strukturalnie związków nazywany jest biblioteką kombinatoryczną. Biblioteka jest następnie przeszukiwana w celu identyfikacji elementów o pożądanym właściwościach.

W klasycznej syntezie organicznej, w danym czasie, substraty przekształcane są w produkt (wyłączając ewentualne produkty uboczne). Przy zastosowaniu metody kombinatorycznej, w tym samym czasie, możliwe jest otrzymanie setek, tysięcy, a nawet milionów związków, ponieważ ich synteza biegnie równolegle, bądź jednocześnie. Synteza kombinatoryczna jest więc atrakcyjną konkurencją dla syntezy konwencjonalnej, dzięki radykalnemu skróceniu czasu potrzebnego do otrzymania tej samej liczby związków.

Ostatecznym powodem, dla którego tworzone są kombinatoryczne biblioteki związków jest wyodrębnienie cząsteczek o założonych na wstępie właściwościach. Niezbitym argumentem przemawiającym za stosowaniem syntezy kombinatorycznej jest możliwość jednoczesnego, a zarazem niezależnego, badania właściwości wszystkich związków wchodzących w skład otrzymanej biblioteki. Tym samym chemia kombinatoryczna

odpowiada na wyzwania współczesnej biotechnologii [2, 3], farmakologii [4-7], czy też chemii materiałowej [8, 9].

1. Klasyfikacja bibliotek kombinatorycznych

Mimo, że koncepcja bibliotek kombinatorycznych wywodzi się bezpośrednio z chemii biopolimerów [10, 11], w chwili obecnej synteza kombinatoryczna jest narzędziem wykorzystywanym w różnych obszarach chemii syntetycznej: od chemii nieorganicznej [12], poprzez organiczną chemię małych cząsteczek [13, 14] aż po chemię polimerów [9]. Podejście to jest szczególnie intensywnie rozwijane w kierunku poszukiwania związków wykazujących czynność biologiczną. Wśród nich wyjątkowe miejsce zajmują oligonukleotydy. Biblioteki oligonukleotydowe tworzone są w celu poszukiwania aptamerów mogących znaleźć zastosowanie w strategii antysensowej i antygenowej [2, 3, 15-18], a także prace nad sekwencjonowaniem genomu [19-21], wymieniając tylko najbardziej znaczące.

W zależności od potrzeb, dla których tworzone są biblioteki, rodzaju syntezowanych związków, liczby wchodzących w ich skład cząsteczek, metody syntezy itp., powstałe biblioteki różnią się między sobą tak zawartością, jak i sposobem „odkodowania”, a następnie wykorzystania informacji w nich zawartych.

Oryginalnej klasyfikacji bibliotek kombinatorycznych dokonał W. T. Markiewicz [22], uwzględniając następujące kryteria:

- Typ związku - obecnie biblioteki kombinatoryczne tworzone są dla praktycznie nieograniczonego spektrum związków,
- Kompletność biblioteki - biblioteka może zawierać pełną lub tylko częściową reprezentację wszystkich możliwych struktur danego typu związków,
- Homogeniczność biblioteki:
 - biblioteka homogeniczna składa się ze związków zbudowanych z tej samej liczby elementów,
 - biblioteka heterogeniczna zawiera związki zbudowane z różnej liczby elementów,
- Metoda syntezy biblioteki - zależy ona od rodzaju związków, które ma zawierać biblioteka, np.: biblioteki syntetyzowane chemicznie (np.: oligonukleotydowe) albo biologicznie (biblioteki fagowe),
- Format biblioteki - w zależności od przyjętej strategii syntezy oraz nośnika, na którym powstaje biblioteka można wyszczególnić biblioteki:
 - scalone (ang. *integrated*) - przykładem tego typu biblioteki jest mikromacierz DNA, szklana płytką z nadrukowanymi fragmentami kwasu nukleinowego [23-25],

średnicy i wielkości porów podłoża. Dzięki temu faktowi, przy zastosowaniu metod biologii molekularnej, możliwe jest przeszukiwanie bibliotek i detekcja związków biologicznie czynnych [28-30]. W wyniku selekcji, z puli wszystkich otrzymanych na drodze syntezy kombinatorycznej związków, wyodrębnione zostają aktywne cząsteczki o nieznannej budowie. Zasadniczym problemem związanym z syntezą kombinatoryczną jest opracowanie odpowiedniej strategii pozwalającej na ustalenie struktury wyodrębnionego elementu biblioteki. Od możliwości poznania jego struktury zależy bowiem użyteczność biblioteki kombinatorycznej. Jest to problem o tyle trudny do rozwiązania, że dotyczy znikomych ilości związku, do których analizy nie można zastosować konwencjonalnych metod analitycznych.

3. Metody „czytania” struktury wyselekcjonowanych elementów bibliotek kombinatorycznych

W celu rozwiązania problemu „odczytywania” struktury elementów bibliotek kombinatorycznych, zaproponowano następujące podejścia:

1. metody pośrednie, dotyczą poznawania struktury elementu biblioteki nie wprost, na przykład poprzez:
 - a. bezpośrednie czytanie struktury kopii elementu (dotyczy kwasów nukleinowych) [28, 29],
 - b. czytanie przez dekonwolucję rekurencyjną [31, 32],
 - c. sekwencjonowanie etykiet kodujących [33, 34],
 - d. „czytanie” binarnych etykiet kodujących [40-43],
 - e. spektralną analizę etykiet kodujących [44-47, 60-64],
 - f. „odczytywanie” etykiet niechemicznych [48,49],
2. metody bezpośrednie:
 - a. pozycyjne kodowanie [23-25, 52, 53],
 - b. bezpośrednie sekwencjonowanie elementu biblioteki (biblioteki peptydowe) [27,54],
 - c. metody wykorzystujące spektrometrię mas [65-78].

Każda z metod została w szczegółach opisana w dalszej części pracy.

3.1. Metody pośrednie

3.1.1. Bezpośrednie czytanie struktury kopii elementu

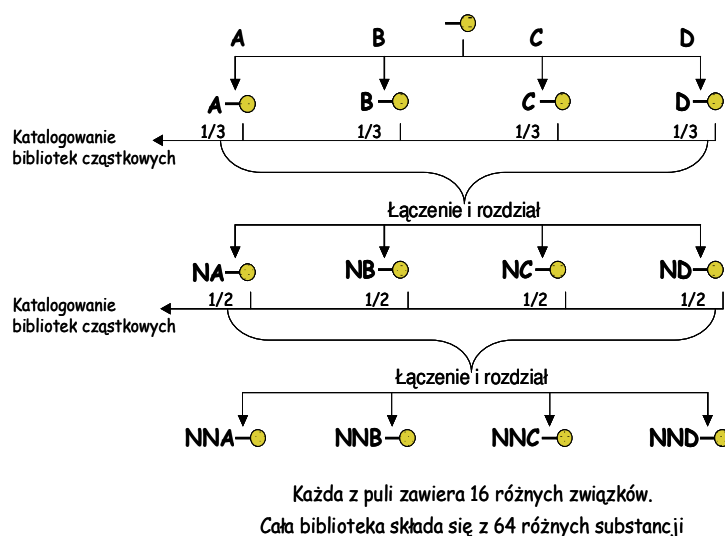
Biblioteki oligonukleotydowe, których elementy nie zawierają modyfikacji stanowią szczególny przypadek, w którym możliwe jest bezpośrednie zastosowanie amplifikacji elementu biblioteki, a następnie sekwencjonowania uzyskanej kopii [28, 29]. Oczywiście

konieczne jest takie skonstruowanie biblioteki, które to umożliwi. To znaczy: oflankowanie elementu biblioteki odpowiednimi starterami dla polimeraz stosowanych w reakcji PCR i podczas sekwencjonowania DNA metodą Sangera.

Zastosowanie metody jest jednakże ograniczone wyłącznie do oligonukleotydów składających się z naturalnie występujących jednostek. Wprowadzenie modyfikowanych nukleotydów do łańcucha oligonukleotydu może spowodować „zatrzymanie” enzymu w miejscu modyfikacji. Z pewnością jednak, polimerazy nie są w stanie odwzorować modyfikacji w nici potomnej (jej rodzaju i położenia w łańcuchu).

3.1.2. Dekonwolucja rekurencyjna

Do grupy metod pośrednich należy dochodzenie struktury elementu biblioteki na drodze dekonwolucji rekurencyjnej. Podejście to zaproponował Kim D. Janda w 1994 roku [31, 32] i zastosował do rozproszonych bibliotek peptydowych w roztworze. Podstawowym założeniem metody jest tworzenie podbibliotek, czy też bibliotek cząstkowych, na każdym etapie syntezy oligomeru. Biblioteki otrzymywane są metodą syntezy dzielonej.



Rys. 2. Zasada syntezy biblioteki i tworzenia bibliotek cząstkowych.

Przypuśćmy, że chcemy zbudować bibliotekę, której elementy będą składać się z czterech różnych aminokwasów, oznaczmy je **A**, **B**, **C** i **D**. Podłoże dzielimy więc na cztery puli. Do każdej przyłączamy jeden rodzaj aminokwasu, część z każdej puli odkładamy i oznaczamy jako bibliotekę cząstkową *P1*, która składa się z czterech podzbiorów: **A**, **B**, **C** i **D**. Pozostałe podłoże mieszamy, dzielimy na cztery części i poddajemy sprzężeniu z następnym aminokwasem. Bibliotekę cząstkową tworzymy również na tym etapie syntezy. Składa się ona z czterech pul oznaczonych *P2*: **NA**, **NB**, **NC** i **ND**, gdzie **N** jest nieznanym aminokwasem w sekwencji. Ponownie łączymy pozostałe podłoże, mieszamy i dzielimy. Po

przyłączeniu do każdej z części podłoża odpowiedniego aminokwasu otrzymujemy bibliotekę końcową składającą się z $4^3 = 64$ elementów w czterech równych pulach: **NNA**, **NNB**, **NNC** i **NND**. Zasada metody schematycznie przedstawiona jest na **Rys. 2**.

W następnym kroku każdą z pul biblioteki końcowej testujemy w celu znalezienia cząsteczek aktywnych. Przypuśćmy, że znaleźliśmy ją w puli **NNA**. Ostatni aminokwas został oznaczony. Cofamy się do biblioteki cząstkowej *P2*, do każdej puli dołączamy znany aminokwas i ponownie testujemy każdą z nich. Po wyodrębnieniu puli, która dała pozytywną odpowiedź, np.: **NAA**, cofamy się do podbiblioteki *P1*, dołączamy dwa znane aminokwasy i powtarzamy proces przeszukiwania biblioteki. Tym razem wyodrębnienie aktywnej puli daje ostateczną odpowiedź dotyczącą sekwencji aktywnego tripeptydu.

Metoda ta ma dwie niewątpliwe zalety. Po pierwsze jest uniwersalna i może być zastosowana do każdego typu związków o budowie polimerycznej. Po wtóre, poprzez wielokrotne badanie aktywności bibliotek na różnych poziomach znajomości sekwencji, pozwala na znalezienie alternatywnych cząsteczek wykazujących spodziewaną aktywność. Jednakże zastosowanie tego podejścia ogranicza się tylko do związków zbudowanych z niewielkiej liczby elementów, ze względu na konieczność odkładania części podłoża na każdym etapie syntezy, a co za tym idzie zmniejszającą się w trakcie procesu jego ilość. Poza tym jest ono praco- i czasochłonne.

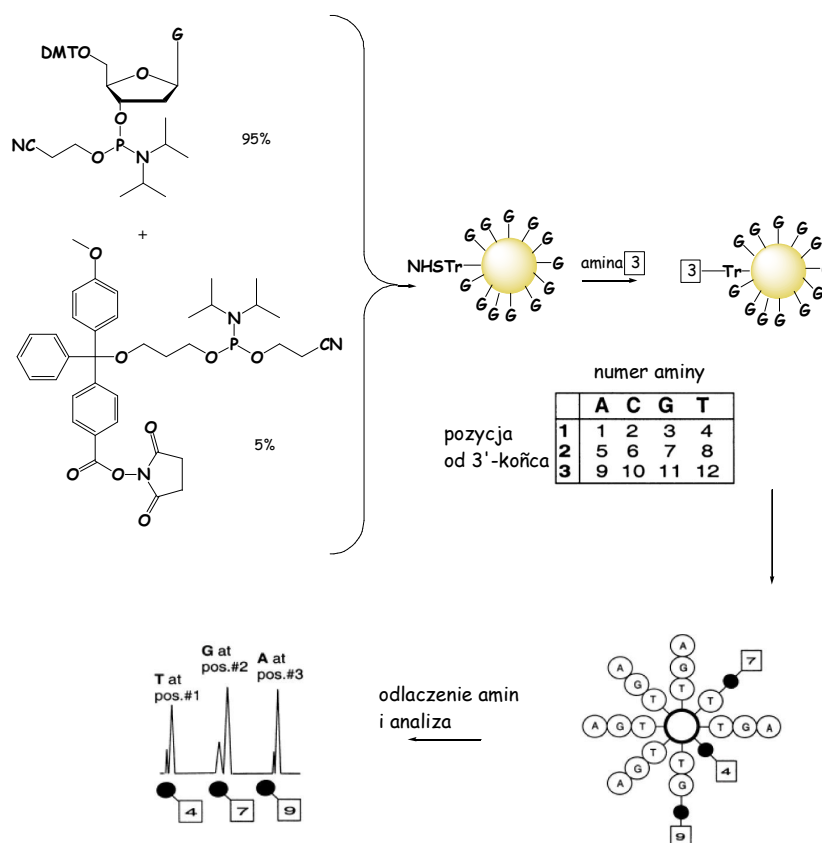
3.1.3. Sekwencjonowanie etykiet kodujących

Alternatywą dla dekonwolucji rekurencyjnej jest metoda, polegająca na odczytywaniu struktury etykiet kodujących sekwencję pierwotnego elementu biblioteki, opracowana przez Brennera i Lerner'a w 1992 roku [33], następnie rozwinięta w laboratorium Gallopa [34]. Pierwotnie zastosowano ją do odczytywania struktury elementów bibliotek peptydowych, kodowanych przez „etykiety genetyczne” – oligonukleotydy.

Metoda opiera się na równoległym prowadzeniu dwóch różnych syntez kombinatorycznych (peptydów i oligonukleotydów). W tym celu konieczne jest zastosowanie dwufunkcyjnego łącznika oraz ortogonalnych systemów grup ochronnych. W tym wypadku w syntezie peptydów zastosowano 9-fluorenylometoksykarbonyl (Fmoc) oraz dimetoksytrytyl (DMT) w syntezie oligonukleotydów. Po przyłączeniu każdego kolejnego aminokwasu dołączano kodującą go sekwencję oligonukleotydową (wybrano kod trójnukleotydowy). W ten sposób otrzymano bibliotekę peptydów chemicznie połączonych z kodującymi je etykietami oligonukleotydowymi. Oligonukleotydową etykietę kodującą poprzedzała sekwencja służąca jako starter do PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*). Na końcu 5' umieszczono starter do sekwencjonowania DNA metodą Sangera (**Rys. 3**). Aktywne związki

- podatności na bezpośrednią analizę w śladowych ilościach.

W 2000 roku Shchepinov opracował metodę kodowania sekwencji elementów bibliotek oligonukleotydowych, w której jako etykiet kodujących użyto pochodnych grup triarylometylowych (trytylowych) [37]. Były to pochodne niosące aktywowane funkcje karboksylowe. Amidofosforyn pochodnej trytylowej zastosowano jako 5% dodatek do roztworów standardowych amidofosforynów i użyto w automatycznej syntezie oligonukleotydów. Po każdym etapie utlenienia kolumnę wyjmowano i traktowano odpowiednimi aminami otrzymując tym samym etykiety o różnych masach. Po zakończeniu syntezy, etykiety usuwano i poddawano analizie MALDI-TOF (ang. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*).



Rys. 4. Zasada kodowania oligonukleotydów według Shchepinova [37].

Wybrano aminy pierwszorzędowe jako bardziej reaktywne od drugorzędowych. Spośród handlowo dostępnych amin wyselekcjonowano te, których masy różniły się o, co najmniej, 2Da tak, by możliwe było rozróżnienie ich w widmie masowym. Aminy stosowane w celu zaszyfrowania sekwencji uszeregowano według wzrastającej masy, czwórkami (każda amina z czwórki kodowała inny nukleotyd), dzięki czemu możliwe było określenie zarówno rodzaju, jak i położenia nukleotydu w sekwencji (Rys. 4).

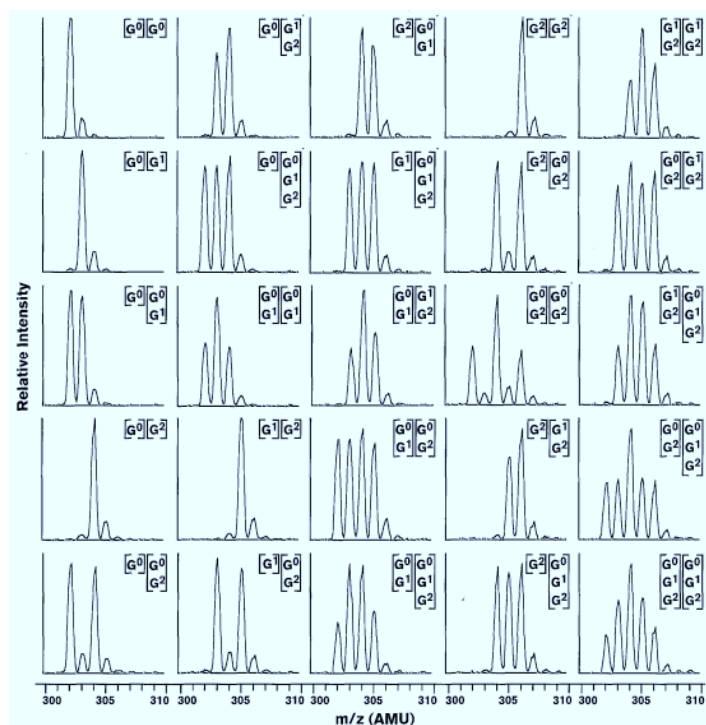
Niekwestionowaną innowacją metody jest wprowadzenie jednego zunifikowanego syntonu, który dopiero podczas syntezy biblioteki przekształcany jest w etykietę kodującą. Wybór pochodnych trytylowych był bardzo trafny ze względu na możliwość wykrycia niewielkich ich ilości za pomocą spektrometrii mas (nawet poniżej 1fmol). Zastosowanie związków niełączonych sekwencyjnie eliminuje problem ortogonalności. Niestety problemem jest tu nietrwałość etykiet w warunkach detrytylacji, a co za tym idzie ich stopniowa utrata podczas syntezy oligonukleotydu. Ten problem rozwiązano w innym laboratorium, zastępując szkielet trytylu pierścieniem pirołu [38]. Jednakże niedogodnością pozostała konieczność dysponowania licznym zbiorem amin. Dla 20-meru potrzeba ich 80 (muszą być rozróżnialne w widmie masowym i nie zawierać innych grup funkcyjnych), a ta liczba rośnie wraz z wprowadzaniem np. modyfikacji.

Ciekawym podejściem do metody kodowania jest zastosowanie etykiet izotopowych. Metoda opiera się na stworzeniu unikalnego kodu izotopowego, który połączono z możliwością zastosowania metod spektralnych [39]. W laboratorium firmy Glaxo opracowano cztery różne strategie kodowania, które można stosować zarówno osobno jak i w kombinacjach. Metoda pierwsza opiera się na użyciu, jako etykiety, dwóch aminokwasów w kilku wersjach składu izotopowego (np. Gly – $^{12}\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2\text{N}$, $^{13}\text{C}^{12}\text{CH}_5\text{O}_2\text{N}$ i $^{13}\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_2\text{N}$), które połączono ze sobą w dziesięciu kombinacjach nazwanych kodem blokowym. Masa, przy której pojawił się sygnał pochodzący od kodu blokowego, odczytana z widma, jednoznacznie definiuje budowę pierwszego monomeru. Struktura trzeciego monomeru jest znana, ponieważ jest ostatni w sekwencji. Rodzaj drugiego monomeru wyznacza różnica mas pomiędzy masą całkowitą trimeru a masą pierwszej jednostki. W metodzie drugiej użyto dwa bloki: referencyjny, o stałej masie oraz kodujący, o masie zmiennej. Różnica mas pomiędzy nimi określała strukturę pierwszej jednostki.

Pozostałe metody bazowały na:

1. równomolowym połączeniu tej samej substancji w różnych wariantach składu izotopowego (**Rys. 5**),
2. na połączeniu w różnych stosunkach molowych dwóch substancji o różnym składzie izotopowym.

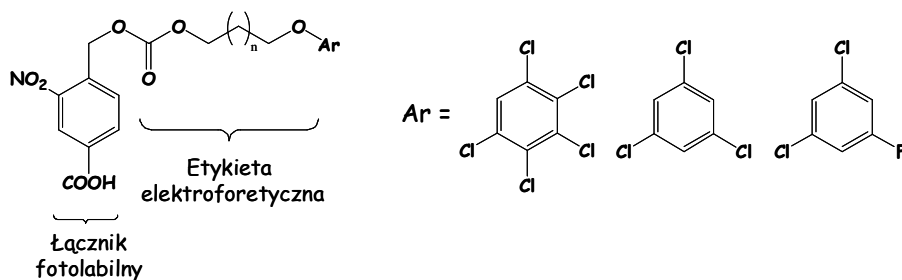
Podstawowym ograniczeniem tego rozwiązania jest możliwość jego zastosowania wyłącznie do bibliotek składających się z trimerycznych elementów.



Rys. 5. Widma masowe etykiet izotopowych otrzymane w wyniku równomolowego połączenia tej samej substancji, ale o różnym składzie izotopowym.

3.1.5. „Czytanie” binarnych etykiet kodujących

Odmienne podejście do strategii etykiet kodujących przedstawił Clark Still, który pierwszy użył kodu binarnego, jako narzędzia pozwalającego na zaszyfrowanie dużej liczby związków przy zastosowaniu relatywnie małej liczby etykiet [40, 41]. Oryginalnie zastosowano ją do „czytania” sekwencji elementów bibliotek peptydowych.

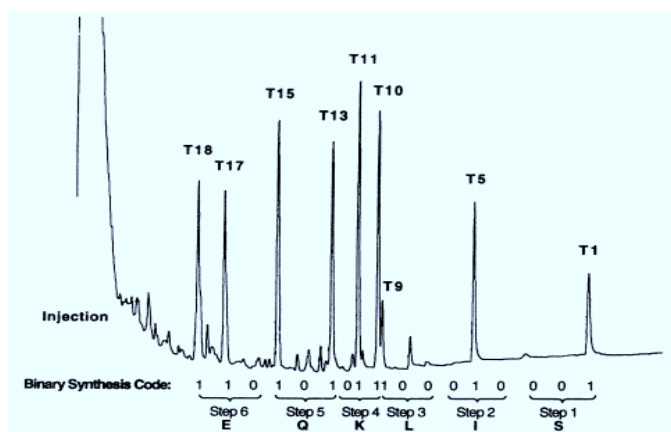


Rys. 6. Struktura etykiety binarnej według Stilla.

Zsyntetyzowano 18 rozróżnialnych chromatograficznie cząsteczek (oznaczono je: **T1-T18**) składających się z fotolabilnego łącznika, elektroforu oraz łańcucha węglowego różnej długości, którego obecność powodowała różnice w ruchliwości chromatograficznej etykiet (Rys. 6). Jako elektrofor zastosowano halogenowe pochodne benzenu. Cząsteczki te mogą

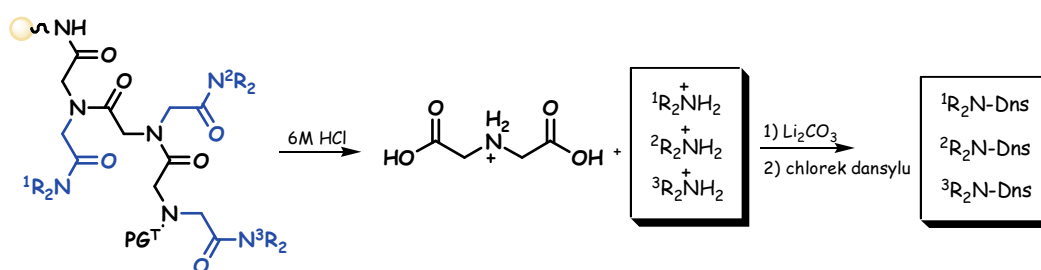
być wykryte, za pomocą detektora wychwytu elektronów, w ilościach nawet poniżej jednego pikomola.

Przyjęto kod trój bitowy. Etykiety uszeregowano zgodnie z malejącym czasem retencji i podzielono na 6 serii. Każdy krok syntezy kodowała kolejna trójka związków (o coraz krótszym czasie retencji). Do zaszyfrowania kroku pierwszego użyto etykiet **T1-T3**, dla drugiego **T4-T6** itd. Każda trójka etykiet tworzyła serię uniwersalnych dla każdego kroku, trójbitowych kodów. Pod każdym z kodów krył się konkretny reagent: kod 001 kodował serynę, 010 - izoleucynę, 100 - leucynę, itd. Odpowiednią etykietę binarną przyłączano po etapie kondensacji kolejnego aminokwasu tak, by każda z etykiet obsadzała nie więcej niż 1% wolnych grup aminowych rosnącego łańcucha peptydowego. Po zakończeniu syntezy etykiety odłączano od podłoża i podawano analizie chromatograficznej (**Rys. 7**).



Rys. 7. Chromatogram otrzymany po odłączeniu etykiet od podłoża.

Koncepcję kodu binarnego wykorzystano później w nieco odmiennej wersji w Instytucie Badań firmy Affymax [42, 43]. Do stworzenia kodu użyto dialkiloamin, które wprowadzano do oligomeru N-[(dialkilokarbamoilo)metylo]glicynowego stanowiącego szkielet etykiety (**Schemat 1**). Po zakończeniu syntezy kombinatorycznej, aminy usuwano i traktowano chlorkiem dansylu. W ten sposób wprowadzano grupę wykazującą wysoką fluorescencję. Analizę etykiet prowadzono za pomocą HPLC zaopatrzonego w detektor fluorescencji.



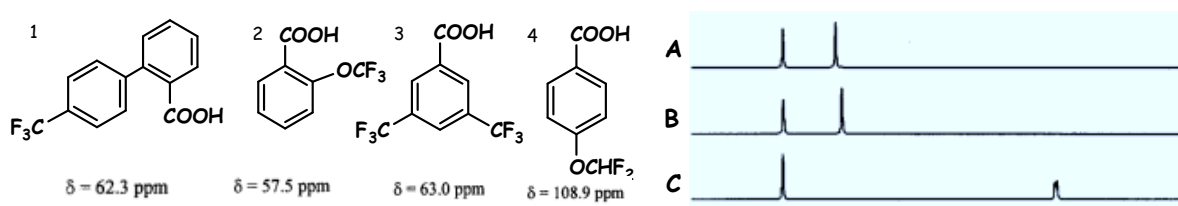
Schemat 1. Otrzymywanie dialkiloaminowych etykiet kodujących.

Dzięki użyciu kodu binarnego możliwe jest zakodowanie informacji dotyczącej rodzaju i kolejności przyłączanych do podłoża cząsteczek, za pomocą stosunkowo niewielkiej ilości związków. Do stworzenia kodu użyto chemicznie biernych cząsteczek i nie łączono ich ze sobą sekwencyjnie. Wadą tego podejścia jest konieczność wcześniejszego przygotowania i przetestowania dużej liczby związków kodujących, ponieważ do zaszyfrowania syntezy 20-sto etapowej trzeba użyć $3 \times 20 = 60$ różnych etykiet. Niemniej, za pomocą tych 60 etykiet można zakodować $[2^3 - 1]^{20}$ różnych związków

3.1.6. Spektralna analiza etykiet kodujących

Innym interesującym rozwiązaniem problemu „czytania” struktury elementów biblioteki jest zastosowanie metod pozwalających na analizę związków bezpośrednio związanych z podłożem. Takimi metodami są: NMR [44], spektroskopia IR i Ramana [45] czy pomiar fluorescencji [46, 47].

W przypadku zastosowania NMR, jako etykiet użyto fluorowych pochodnych aromatycznych kwasów karboksylowych [44]. Wybrano ^{19}F NMR dlatego, że jądro fluoru jest wyjątkowo wrażliwe na otoczenie chemiczne, dzięki czemu możliwe jest rozróżnienie blisko spokrewnionych ze sobą związków. Każda z zastosowanych cząsteczek organicznych daje w widmie ^{19}F NMR jeden sygnał, co ułatwia analizę otrzymanych danych. Do utworzenia kodu zastosowano mieszaninę dwóch związków w różnych kombinacjach, zwiększając tym samym liczbę możliwych do utworzenia kodów przy użyciu niewielu różnych związków (Rys. 8).



Rys. 8. Etykiety i widma NMR mieszanin tych związków: A – 1 i 2; B – 2 i 3; C – 2 i 4

W przypadku etykiet IR i Ramana wybrano serię związków, które wykazują absorpcję promieniowania IR w rejonie $4000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ oraz $2800\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ [45]. Są to te rejony w widmie w podczerwieni, które są ubogie w pasma absorpcji i w których pojawiają się pasma drgań charakterystyczne dla ugrupowań chemicznych, takich jak: nityle, azydki, grupy nitrowe czy wiązania potrójne.

W obu powyższych przypadkach (etykiety ^{19}F NMR i IR) do utworzenia kodu zastosowano mieszaninę związków w różnych kombinacjach. Związki stosowano parami,

zwiększając tym samym liczbę możliwych do utworzenia kodów przy użyciu mniejszej liczby związków.

W celu kodowania fluorescencyjnego dobrano barwniki tak, by każdy z nich miał różne długości fal wzbudzenia/emisji [46, 47]. Dzięki temu możliwe było załadowanie podłoża różnymi fluoroforami jednocześnie. Możliwość ilościowego oznaczenia fluorescencji pozwoliła na wprowadzenie do metody dodatkowej zmiennej (zróznicowanie nie tylko ze względu na rodzaj, ale również na ilość).

Wymienione metody można zastosować do bibliotek każdego typu. Niestety, ze względu na szczególne właściwości stosowanych do kodowania związków, a w związku z tym ich ograniczoną dostępność, możliwe jest kodowanie tylko bibliotek składających się z niewielkiej liczby elementów.

3.1.7. Etykiety niechemiczne

Alternatywą dla etykiet chemicznych są etykiety fizyczne, np.: mikrochipy o unikalnym kodzie odczytywanym przez przekaźnik częstotliwości radiowej [48, 49]. W eksperymentach podłoże umieszczano w polipropylenowych reaktorach z wbudowanymi mikrochipami. Każdy reaktor miał przydzielony własny unikalny kod, który zapisany był na mikrochipie i kodował rodzaj monomeru oraz krok syntezy. Trójetapowa synteza z zastosowaniem pięciu różnych monomerów wymagała, więc użycia $5^3=125$ mikroreaktorów. W każdej rundzie syntezy (dziel/łącz) wszystkie mikrochipy były skanowane, a kody wprowadzano do programu komputerowego, który sterował rozdziałem reaktorów do odpowiedniej puli. Niestety, ze względu na konieczność zastosowania liczby reaktorów równej liczbie elementów, z których składa się biblioteka, metoda ta nie nadaje się do kodowania dużych bibliotek.

Podsumowując, strategia etykiet kodujących, mimo uniwersalności, cierpi z powodu wielu niedoskonałości i utrudnień:

1. na podłożu gromadzone są chemicznie różne od elementów biblioteki cząsteczki, których obecność może powodować zafałszowanie wyników podczas przeszukiwania biblioteki,
2. w przypadku etykiet peptydowych lub oligonukleotydowych bardzo dużo pracy i uwagi należy poświęcić dobraniu odpowiednich warunków syntezy etykiet: ortogonalny system grup ochronnych, synteza odpowiedniego łącznika wielofunkcyjnego,
3. za ich pomocą można kodować jedynie ograniczoną liczbę związków,

4. w przypadku etykiet niesekwencyjnych należy odpowiednio dobrać, zsyntezować i przebadać szeroką pulę związków,
5. w każdym przypadku metoda wymaga wielu dodatkowych czynności i nie dostarcza bezpośredniej informacji dotyczącej kodowanej struktury- „historia” syntezy.

Szerokiego spojrzenia na najnowsze dokonania w dziedzinie dostarczają prace przeglądowe pod redakcją S. Balasubramaniana [50] oraz R. L. Afflecka [51].

3.2. Metody bezpośrednie

3.2.1. Pozycyjne kodowanie

Do grupy metod dostarczających bezpośredniej informacji o strukturze związku należy pozycyjne kodowanie, które dotyczy bibliotek scalonych (ang. *arrays*) [23-25]. W tym przypadku poznanie struktury elementu biblioteki nie sprawia problemów, ponieważ współrzędne geometryczne jednoznacznie określają jego budowę na podstawie przebiegu syntezy. W ostatnim czasie opracowano wydajniejszy alternatywny wariant mikromacierzy. Przeniesiono oligonukleotydy z dwuwymiarowej płaszczyzny szkiełka w trójwymiarową przestrzeń ziarna [52, 53]. W dalszym jednak ciągu możliwa liczba elementów takiej biblioteki nie przekracza kilkuset tysięcy.

3.2.2. Bezpośrednie sekwencjonowanie

W przypadku analizy bibliotek peptydowych możliwe jest bezpośrednie sekwencjonowanie wyselekcjonowanego elementu biblioteki. Tym sposobem zidentyfikowano strukturę peptydów wiążących się do monoklonalnych przeciwciał przeciwko β -endorfinom [27]. Syntezę peptydu prowadzono na podłożu polistyrenowym o średnicy 200 μ m i załadowaniu 200pmol/ziarno. Po wyselekcjonowaniu, aktywny element biblioteki sekwencjonowano automatycznie za pomocą metody degradacji Edmana.

Ograniczeniem tej metody jest fakt, że w ten sposób można poznać jedynie sekwencję peptydu. Poza tym na jednym ziarnie podłoża musi być zgromadzona stosunkowo duża ilość materiału (czułość techniki jest ograniczona do ~50pmol). To ma przełożenie na wielkość ziaren, a co za tym idzie liczbę elementów biblioteki. Do niedawna istotnym utrudnieniem była również konieczność stosowania naturalnych aminokwasów. Jednak ostatnie doniesienia wskazują, że możliwe jest zastosowanie tej metody także w przypadku modyfikowanych peptydów [54].

3.2.3. Metody spektralne

3.2.3.1. Analiza jonów fragmentarycznych – biblioteki peptydowe

Jak dotąd najlepszym rozwiązaniem problemu „czytania” struktury aktywnych elementów biblioteki wydaje się być bezpośrednie zastosowanie metod spektralnych. Do bibliotek małych cząsteczek zastosowano różne metody: począwszy od spektroskopii IR [55-57], poprzez NMR [58], HPLC [59], na spektrometrii mas skończywszy [60-64]. Jednakże w przypadku bibliotek oligomerów problem jest o tyle skomplikowany, że dotyczy związków zbudowanych z powtarzających się elementów, często o bardzo zbliżonej strukturze. W związku z tymi ograniczeniami do analizy związków oligomerycznych z sukcesem udało się zastosować jedynie spektrometrię mas.

Pionierem zastosowania spektrometrii mas w analizie oligomerycznych bibliotek kombinatorycznych jest Metzger [65, 66]. Pierwsze badania dotyczyły kontroli jakości syntezy. Do analizy mieszaniny ~24 500 syntetycznych peptydów zastosowano technikę ESI-MS (ang. *electrospray ionization*) sprzężoną z HPLC, co pozwoliło na wyeliminowanie zakłóceń izobarycznych (dochodzi do nich wówczas, gdy dwa różne związki mają tę samą masę). Później przedstawiono rozszerzoną metodę analizy bibliotek peptydowych, wykorzystującą technikę tandemową MS/MS [67]. Wykazano, że eksperymenty opierające się na fragmentacji i analizie jonów potomnych są użytecznym narzędziem mogącym służyć do identyfikacji elementów biblioteki, ale również detekcji produktów ubocznych syntezy. Ponadto, dowiedziono, że dla peptydów podobnych strukturalnie, intensywność sygnałów odzwierciedla ich względne stężenie w mieszaninie, co pozwala na półilościowe oszacowanie jej składu.

W chwili obecnej sekwencjonowanie peptydów za pomocą tandemowej spektrometrii mas jest rutynowo stosowanym sposobem identyfikacji aktywnych elementów peptydowych bibliotek kombinatorycznych. Przy pomocy najnowocześniejszych metod i urządzeń możliwe jest dokładne i bezsporne określenie sekwencji aminokwasowej [68]. FTICR-MS (ang. *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) czyli spektrometr masowy zaopatrzony w analizator cyklotronowego rezonansu jonowego z transformacją Fouriera jest przyrządem pozwalającym na oznaczenie masy z dokładnością poniżej 2ppm, przy użyciu standardu wewnętrznego. Tandemowa spektrometria mas, w której połączono FTICR z kwadropolową pułapką jonową pozwala na zbieranie danych z dużą szybkością i łatwością, przy zastosowaniu rutynowych protokołów fragmentacji.

Spektrometria mas jest narzędziem, pozwalającym na analizę bibliotek kombinatorycznych na wielu poziomach. Wspomniałam wyżej o badaniu jakości otrzymanych zbiorów cząsteczek, a także analizie strukturalnej wyselekcjonowanych aktywnych elementów. Jednak zastosowanie spektrometrii mas nie kończy się na tym. Wiele uwagi i wysiłków poświęcono badaniom mającym na celu wykorzystanie tej obiecującej metody również w celu przeszukiwania bibliotek i selekcji aktywnych elementów. Pierwsze informacje w tym temacie pojawiły się już w roku 1996, kiedy to Barry Karger zastosował spektrometrię mas w połączeniu z ACE (ang. *affinity capillary electrophoresis*) - elektroforezą kapilarną powinowactwa [69]. Zespolecie obu metod umożliwiło dokonanie w jednym kroku selekcji oraz identyfikacji aktywnych ligandów. Bibliotekę 1000 tri- i tetrapeptydów przeszukiwano przy pomocy ACE pod kątem zdolności do wiązania się z wankomycyną. Aktywne ligandy łączyły się z wankomycyną. W ten sposób oddzielono je od pozostałych i bezpośrednio poddano je identyfikacji z wykorzystaniem CID (ang. *collisionally induced dissociation*) - kolizyjnie indukowanej dysocjacji. Analiza otrzymanych fragmentów dostarczyła informacji strukturalnej.

Właśnie z zamiarem przeszukiwania bibliotek w laboratorium w Ohio w USA opracowano metodę, którą nazwano ECLIPSE (ang. *enzyme-catalyzed loss of isotope peak signal enhancement*) [70]. W celu ustalenia specyficzności enzymu - fosfatazy tyrozynowej (enzym katalizujący hydrolizę fosforanu z białek zawierających fosfotyrozynę), fosforan tyrozyny wyznakowano częściowo atomem tlenu ^{18}O ($^{18}\text{O}:^{16}\text{O}$ w stosunku 1:1). Następnie przeprowadzono syntezę biblioteki peptydów z użyciem wyznakowanego aminokwasu. Ten zabieg sprawił, że każdy z elementów biblioteki zawierający fosfotyrozynę pojawiał się w widmie masowym w postaci dubletu sygnałów. Traktowanie otrzymanej biblioteki fosfatazą tyrozynową prowadziło do hydrolizy fosforanu. Produkty hydrolizy pozbawione znakowanego fosforanu dawały w widmie pojedynczy sygnał i poddawane były fragmentacji w celu ustalenia ich struktury.

Inne podejście do wykorzystania spektrometrii mas w poszukiwaniu aktywnych elementów biblioteki przedstawili Malcom *et al.* [71]. Bibliotekę dipeptydów przeszukiwano w celu odnalezienia najskuteczniejszych inhibitorów proteinazy cysteinowej. Poszukiwano takich inhibitorów, które wiążą się nieodwracalnie z enzymem. Utworzony kowalencyjny kompleks identyfikowano za pomocą ESI-MS. W następnym etapie kompleks poddawano trawieniu bromocyjanem oraz trypsyną, a otrzymane fragmenty analizowano przy użyciu LC/ESI-MS ustalając strukturę aktywnych dipeptydów.

W chwili obecnej możliwa jest również charakterystyka niekowalencyjnych kompleksów makrocząsteczek z ich ligandami [72]. Do tego celu stosowana jest technika jonizacji ES w

połączeniu z FTICR-MS. Kompleks pomiędzy receptorem a uprzywilejowanym ligandem poddaje się bezpośredniej analizie FTICR-MS, określając tym samym masę ligandu, który ma najwyższe powinowactwo do receptora. Następnie, w fazie gazowej, ligand jest uwalniany z kompleksu, a jego struktura analizowana za pomocą fragmentacji CID. W ten sposób podczas jednej analizy przeprowadzana jest zarówno selekcja, jak i identyfikacja elementów biblioteki.

Metody opierające się na fragmentacji peptydów i analizie jonów potomnych dostarczają rzetelnej informacji dotyczącej struktury, ponieważ peptydy są związkami, które łatwo fragmentują pod wpływem niskiej energii, dając pełną serię jonów potomnych. Interpretacja otrzymanych w ten sposób widm nie jest skomplikowana, najintensywniejsze bowiem w widmie są sygnały pochodzące od jonów, które dostarczają najbogatszej informacji o sekwencji. Niestety, inne oligomery (oligonukleotydy czy oligosacharydy) nie są tak podatne na fragmentację, nawet pod wpływem wyższej energii, a ich widma „najeżone” są sygnałami pochodzącymi od mało informatywnych fragmentów, których obecność utrudnia odczytywanie struktury.

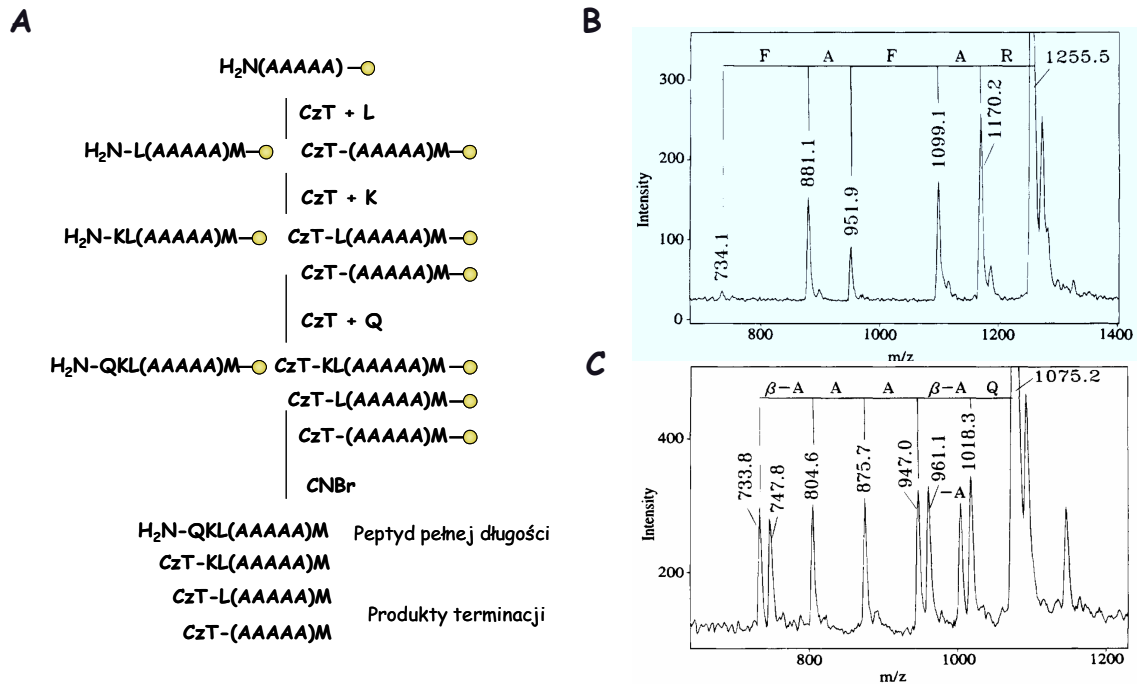
3.2.3.2. Kontrolowane generowanie krótszych sekwencji

Alternatywą dla metod opierających się na fragmentacji jest kontrolowane generowanie krótszych sekwencji podczas syntezy oligomeru, a następnie ich analiza za pomocą spektrometrii mas. Jako pierwszy to rozwiązanie zaproponował Thomas Keough w roku 1996 [73], a w 2002 udoskonalił Griesinger [74].

Polegało ono na tym, że podczas syntezy biblioteki na każdym z etapów zatrzymywano wydłużanie około 10% łańcuchów peptydowych. Prowadziło to do utworzenia serii oligomerów różnej długości (**Rys. 9A**). Produkty takiej syntezy były następnie analizowane za pomocą MALDI-MS. Różnice mas pomiędzy sąsiednimi pikami dostarczały informacji o sekwencji peptydu (**Rys. 9B**). Czynnikiem zatrzymującym wzrost łańcucha była N-acetylo-D,L-alanina, którą stosowano jako 10%-owy dodatek do standardowych aminokwasów używanych w syntezie. Metoda sprawdzała się dobrze gdy masy zastosowanych monomerów różniły się, co najmniej, o 1Da. W przypadku monomerów izobarycznych do ich rozróżnienia konieczne było zastosowanie czynników terminujących o różnych masach (**Rys. 9C**).

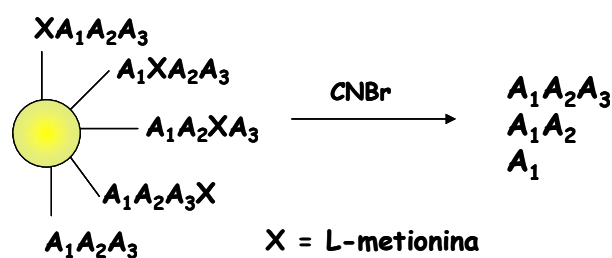
Na tej samej zasadzie oparto metodę sekwencjonowania bibliotek glikopeptydowych [75], z tą różnicą, że jako czynników terminujących w syntezie użyto kilku strukturalnie podobnych związków, a w celu rozróżnienia między glikanami o tej samej masie zastosowano różne blokady acylowe grup hydroksylowych w kilku kombinacjach. Do syntezy oligomeru użyto podłoża z łącznikiem fotolabilnym. Połączenie metody generowania

krótszych sekwencji z fotolitycznym uwolnieniem fragmentów glikopeptydu umożliwiło odczytanie sekwencji bezpośrednio z ziarna podłoża.



Rys. 9. A - metoda kontrolowanego generowania krótszych sekwencji, B - widmo MALDI produktów terminacji sekwencji, C: widmo MALDI peptydu zawierającego w sekwencji alaninę i β -alaninę, β -alanina jest kodowana za pomocą dwóch różnych czynników terminujących syntezę.

Nieco odmienną wersją powyższego podejścia jest metoda, w której krótsze sekwencje generowane są w wyniku rozcięcia łańcucha oligomeru. Osiągnięto to poprzez włączenie metioniny w każdą pozycję sekwencji peptydu, tak by znalazła się w 10% wszystkich łańcuchów peptydowych [76]. Po etapie selekcji na ziarno podłoża działano bromocyjanem. W miejscu włączenia metioniny następowało rozcięcie łańcucha peptydowego (**Rys. 10**). Otrzymane fragmenty analizowano za pomocą ESI lub MALDI-MS. Tak jak poprzednio, różnice mas pomiędzy sąsiednimi sygnałami dostarczały informacji o sekwencji. Tę samą zasadę wykorzystali Kent oraz Martinez, zastępując metioninę odpowiednio tioestrem [77] lub fotolabilnym aminokwasem [78].



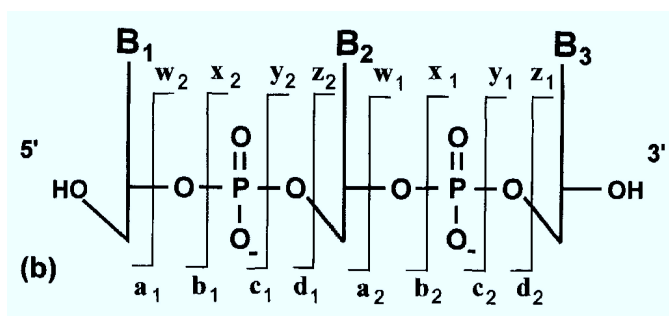
Rys. 10. Ogólna zasada metody rozcinania łańcucha.

Metody wykorzystujące kontrolowane generowanie krótszych sekwencji można zastosować do identyfikacji elementów bibliotek oligomerów każdego typu. Nie wymagają one wprowadzania dodatkowych kroków podczas syntezy, ani zmiany jej warunków. Cząsteczki używane w celu generowania krótszych sekwencji nie różnią się strukturalnie od elementów wchodzących w skład oligomeru, nie mogą więc powodować zakłamań podczas badania aktywności związków wchodzących w skład biblioteki. W końcu, analiza masowa zgromadzonych na ziarnie podłoża sekwencji pozwala na jednoznaczną i bezpośrednią charakterystykę strukturalną oligomeru oraz ocenę jakości syntezy.

3.2.3.3. Analiza jonów fragmentarycznych - oligonukleotydy

Pierwsze próby analizy oligonukleotydów za pomocą spektrometrii mas podjęto już we wczesnych latach osiemdziesiątych, przy zastosowaniu metody FAB (ang. *Fast Atom Bombardment*), czyli wzbudzenia w wyniku bombardowania atomami o wysokiej energii. Niestety, mimo, że metoda FAB jest zaliczana do metod miękkiej jonizacji, okazała się być zbyt inwazyjna, powodując rozległą fragmentację oligonukleotydu. Niemniej, za jej pomocą udało się ustalić sekwencję 10-meru [79].

Spośród wielu możliwych metod jonizacji stosowanych w spektrometrii mas do charakterystyki oligonukleotydów użyteczne są w zasadzie jedynie dwie: ESI oraz MALDI. Obie metody wprowadzono w końcu lat osiemdziesiątych zeszłego stulecia i od tego momentu trwają intensywne badania nad ich wykorzystaniem w chemii kwasów nukleinowych. Szczególnie intensywnie testowano ich potencjalne zastosowanie do sekwencjonowania DNA oraz wykrywania modyfikacji i polimorfizmów. Wyjątkowo dużo uwagi poświęcono mechanizmowi fragmentacji oligonukleotydów i jej ewentualnemu zastosowaniu do analizy sekwencji.



Rys. 11. Nomenklatura jonów fragmentarycznych według McLuckey'a.

Oligonukleotydy wykazują względną stabilność w warunkach ESI. Rozległość fragmentacji w źródle jonów wzrasta jednak wraz z długością oligonukleotydu. Studia nad stabilnością oligonukleotydów w warunkach wzbudzenia prowadzono głównie z

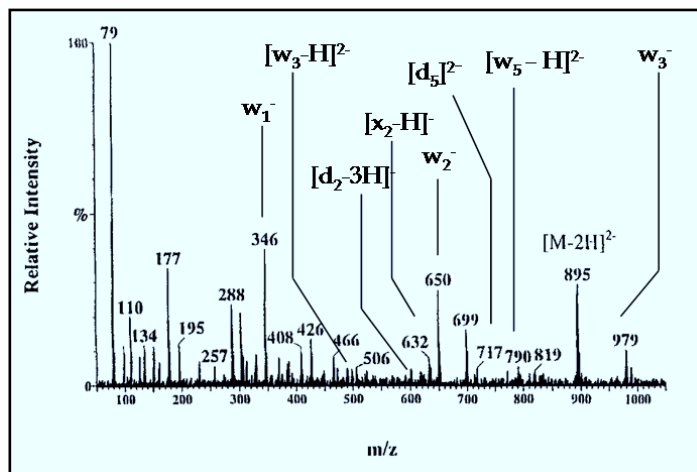
wykorzystaniem tandemowej spektrometrii mas. Pionierską pracę w tym obszarze wykonał McLuckey, który nie tylko wskazał drogi fragmentacji, ale również, bazując na nazewnictwie opracowanym dla peptydów [80], zaproponował nomenklaturę jonów potomnych oligonukleotydów [81] (**Rys. 11**).

Wnikliwe badania McLuckey'a nad kolizyjnie aktywowaną fragmentacją (CID) oligonukleotydów obdarzonych wielokrotnym ładunkiem doprowadziły do ustalenia ogólnych tendencji i sformułowania szeregu reguł [81, 82]:

- w pierwszym kroku dekompozycji następuje odłączenie zasady:
 - odszczepieniu może ulec każda z zasad, przy czym preferencje można przedstawić w następującym szeregu: $A > T \gg G, C$,
 - nie ma znaczenia położenie zasady w oligomerze, jedynym wyjątkiem jest zasada z końca 3', która rzadko ulega odłączeniu,
 - ze względu na preferencję odłączenia zasad A i T, często występują problemy z identyfikacją sąsiednich zasad G i C,
- następnym krokiem jest rozerwanie wiązania 3'-fosfodiesterowego przy tej reszcie cukrowej, od której odłączyła się zasada:
 - ta reguła jest spełniona niezależnie od rodzaju zasady i jej ładunku,
 - generalnie prowadzi do utworzenia jonów typu w oraz $(a-B)$,
- odłączenie kolejnej zasady prowadzi do utworzenia jonów drugiej generacji. Wydajność wewnętrznej fragmentacji wzrasta wraz ze wzrostem przyłożonej energii;
- zwykle obserwuje się jony komplementarne (np. a i w), pod warunkiem dobrania odpowiednich warunków analizy.

Niestety, informacja o sekwencji krótkich oligomerów otrzymana na drodze fragmentacji jest dalece niekompletna (**Rys. 12**). Stwierdzono, że wyznaczenie właściwej sekwencji zależy w dużej mierze od właściwego rozpoznania reszt 3'- i 5'-końca. Trudności nie zniechęciły jednak badaczy do podejmowania wciąż nowych prób opracowania metody sekwencjonowania z użyciem tandemowej spektrometrii mas. Testowano różne techniki fragmentacji: CID - fragmentację poza źródłem jonów [81, 82], NS (ang. *Nozzle Skimmer*) - prowadzi do fragmentacji w źródle [83] oraz IRMPD (ang. *Infrared Multiphoton Dissociation*) - czyli fragmentację wielofotonową światłem podczerwonym [84, 85]. Wykorzystano również różnego typu analizatory: pułpkę jonową, potrójny kwadrupol oraz cyklotronowy rezonans jonowy. Przeprowadzono serię badań, poświęcając temu tematowi wiele czasu i uwagi, by na koniec stwierdzić, że wysoki stopień skomplikowania widm czyni tandemową spektrometrię mas pomocną w weryfikacji sekwencji, jednakże, w praktyce, niemożliwe jest oznaczenie za

jej pomocą sekwencji *de novo*. Zwłaszcza, że sygnały reprezentujące pełną sekwencję otrzymano wyłącznie dla dekamerów [83-87].



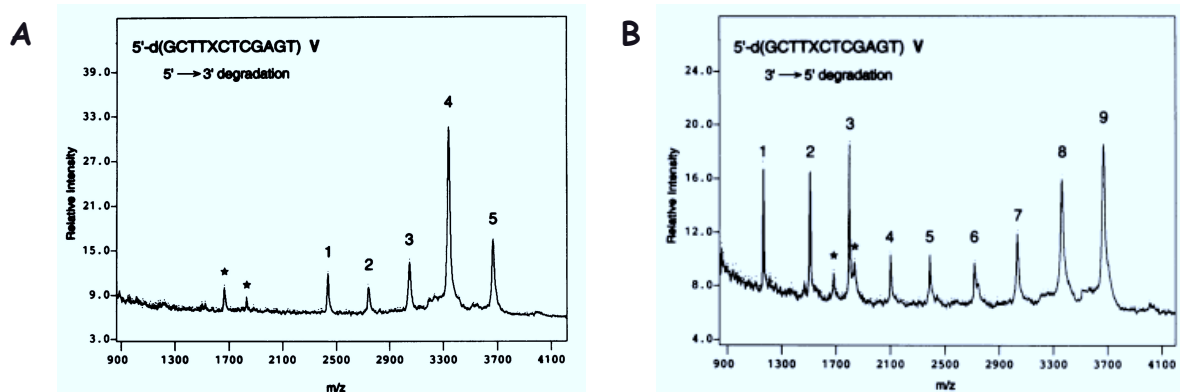
Rys. 12. Widmo ESI MS/MS jonu $[M-2H]^{2-}$, gdzie $M = 5'-d(CACGTG)-3'$, zaznaczono tylko te fragmenty, które wprost dostarczają informacji o sekwencji.

Cechą charakterystyczną widm masowych ESI są serie sygnałów odpowiadających kolejnym, wielokrotnie naładowanym, jonom. Ten fakt czyni analizę wieloskładnikowych mieszanin wyjątkowo trudnym zadaniem. Tu leży wyższość metody MALDI nad ESI. Jonizacja promieniowaniem UV emitowanym przez laser dostarcza jonów o pojedynczym ładunku, niezależnie od masy analizowanej substancji czy zastosowanych warunków. Dzięki temu możliwa jest analiza nawet bardzo skomplikowanych mieszanin, na przykład fragmentów DNA otrzymanych w wyniku trawienia enzymatycznego lub sekwencjonowania metodą Sangera. W związku z powyższym to właśnie MALDI wiezie prym w obszarze sekwencjonowania kwasów nukleinowych za pomocą spektrometrii mas.

3.2.3.4. Analiza fragmentów powstałych w wyniku trawienia enzymatycznego

Niezwykły potencjał MALDI dostrzegł Pieleś i wraz ze współpracownikami wykorzystał do opracowania metody sekwencjonowania modyfikowanych oligonukleotydów z wykorzystaniem spektrometrii mas [88]. Jako modelowy wybrano oligonukleotyd o sekwencji: $5'-d(GCT\ TXC\ TCG\ AGT)-3'$, gdzie X to 2'-O-metyloadenozyna. Poddawano go dwóm osobnym trawieniom za pomocą nukleaz specyficznych dla jego obu końców. Użyto fosfodiesterazy z grasicy cielęcej - CSP (ang. *Calf Spleen Phosphodiesterase*) jako 5'-egzonukleazy, oraz fosfodiesterazy z jadu węża - SVP (ang. *Snake Venom Phosphodiesterase*) jako 3'-egzonukleazy. W celu zarejestrowania optymalnej liczby produktów degradacji oligonukleotydu widma wykonywano w 5 minutowych odstępach czasowych. CSP odcinała kolejne nukleotydy od końca 5' aż do momentu napotkania modyfikowanej jednostki (**Rys.**

13A). Sekwencję czterech nukleotydów z 5'-końca oznaczono obliczając różnice mas między sąsiednimi pikami i przypisując je masom poszczególnych nukleotydów. Nieco inaczej wyglądała sytuacja na przeciwnym końcu oligonukleotydu. SVP usuwała kolejne nukleotydy niezależnie od tego czy były modyfikowane czy nie (Rys. 13B). Po złożeniu, oba widma pozwoliły na odczytanie pełnej sekwencji oligonukleotydu.



Rys. 13. Widma MALDI-TOF produktów częściowej nukleolitycznej degradacji oligonukleotydu o sekwencji 5'-d(GCT TXC TCG AGT)-3', A: pod wpływem CSP, B: SVP. Widma wykonano po 30 min. inkubacji z enzymami; gwiazdkami zaznaczono jony o podwójnym ładunku.

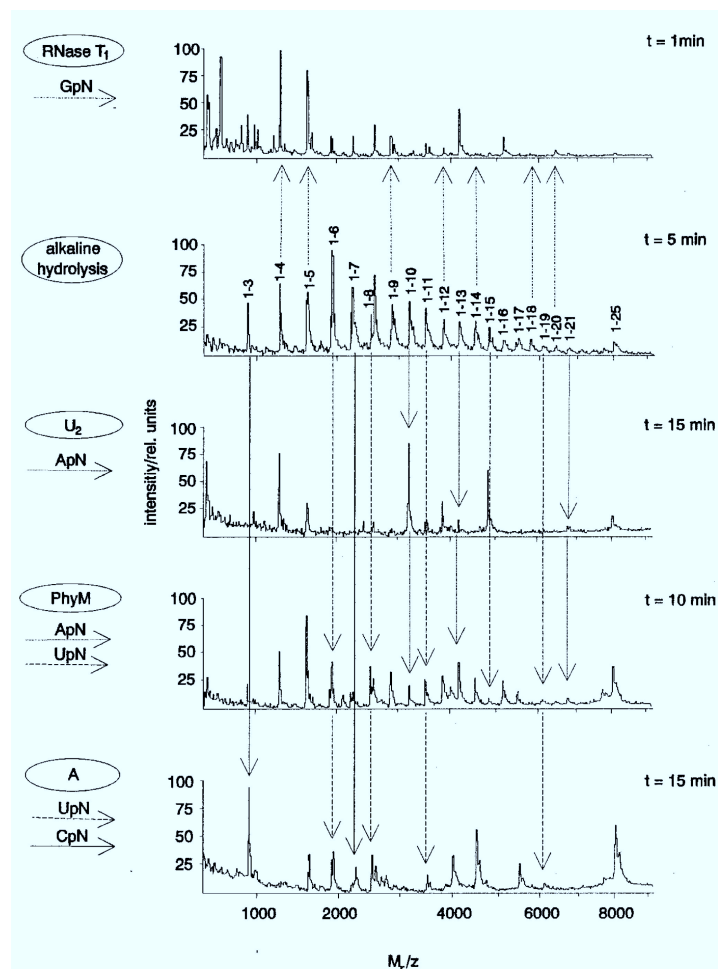
Przy założeniu, że dysponujemy znaczną ilością materiału oligonukleotydowego, ta technika pozwala na oznaczenie sekwencji oligonukleotydów zawierających różnego typu modyfikacje, za wyjątkiem tych, które nie podlegają enzymatycznej hydrolizie oraz takich, które posiadają nukleotydy o zbliżonych masach, np.: tymidyna i 2'-deoksy-5-metylocytydyna.

Z tym ostatnim problemem zmierzono się w laboratorium Engelsa [89], w którym opracowano metodę sekwencjonowania RNA za pomocą spektrometrii mas. Problem dotyczył nieznacznej różnicy mas pomiędzy cytydyną oraz urydyną (1Da), która uniemożliwiała ich rozróżnienie w widmie masowym. Jego rozwiązanie oparto na różnicy w szybkości reakcji enzymatycznej hydrolizy (zastosowano 5'-egzonukleazę) wiązania fosfodiesterowego, w zależności od tego, czy na 5'-końcu znajdowała się cytydyna, czy urydyna. Ponieważ cytydyna uwalniana była znacznie wolniej od urydyny, w widmie obserwowano wyższe intensywności sygnałów pochodzących od fragmentów, zawierających cytydynę na 5'-końcu i na tej podstawie odróżniano ją od urydyny.

Mimo zastosowania tego i jemu podobnych wybiegów [90] w celu usprawnienia metody, ma ona jedno niewątpliwe ograniczenie. Wymaga zastosowania stosunkowo dużych ilości oligonukleotydu (minimalnie 300pmol), co praktycznie wyklucza ją z kręgu metod użytecznych w sekwencjonowaniu bibliotek kombinatorycznych.

Nieco inną wersją sekwencjonowania z wykorzystaniem nukleolitycznej degradacji DNA/RNA jest zastosowanie enzymów miejscowo-specyficznych. Zastosowano tu znaną od lat metodę sekwencjonowania RNA z użyciem czterech różnych RNaz: T₁ (specyficzna dla G), U₂ (specyficzna dla A), A (specyficzna dla C i U) i PhyM (specyficzna dla A i U) [91]. Podzielono RNA na cztery porcje i każdą z nich traktowano inną nukleazą. Dla porównania RNA poddano również częściowej hydrolizie zasadowej. Następnie każdą z porcji analizowano za pomocą MALDI. Po zestawieniu i porównaniu ze sobą widm możliwe jest odczytanie sekwencji oligorybonukleotydu (**Rys. 14**).

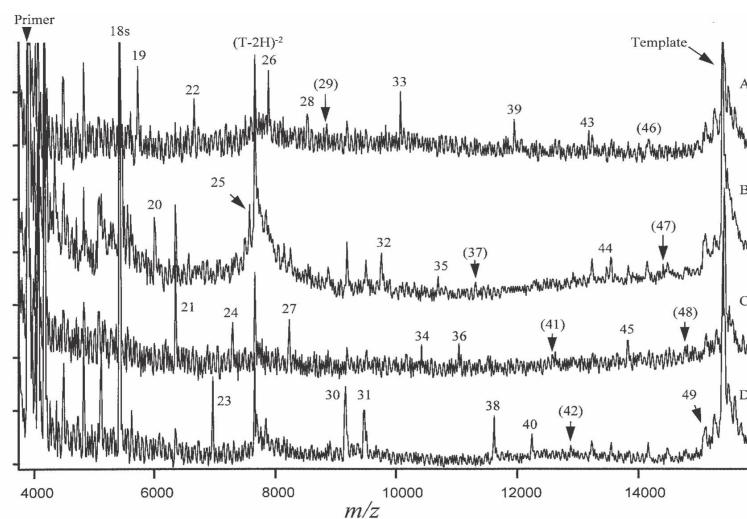
Niewątpliwą zaletą tego podejścia jest bezsporne oznaczenie sekwencji. Możliwe jest to dzięki przeprowadzeniu czterech niezależnych reakcji degradacji (przy czym niektóre enzymy są specyficzne dla tych samych nukleotydów). Możliwość zestawienia czterech różnych widm eliminuje potrzebę dokładnego oznaczenia masy fragmentów, a co za tym idzie problem w rozróżnieniu nukleotydów o zbliżonej masie. Taki sposób odczytania sekwencji pozwala na analizę oligonukleotydów w szerokim zakresie mas. Jedynym ograniczeniem w zastosowaniu metody jest, podobnie jak przy użyciu egzonukleaz, duża ilość materiału potrzebna do przeprowadzenia kilku równoległych trawień.



Rys. 14. Widma 25-meru RNA o sekwencji: 5'-UCC GGU CUG AUG AGU CCG UGA GGA C-3' poddanego częściowej hydrolizie, przez miejscowo specyficzne nukleazy.

Inną enzymatyczną metodą, w której powstałe fragmenty DNA następnie mogą być analizowane za pomocą spektrometrii mas, jest sekwencjonowanie DNA metodą Sangera. Pierwotny pomysł opierał się dokładnie na tych samych regułach, co wykorzystywany od lat w laboratoriach biochemicznych. Z tą różnicą, że zamiast analizy PAGE (ang. *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), w celu odczytania sekwencji, zastosowano spektrometrię mas MALDI [92]. Reakcję enzymatycznej syntezy DNA na matrycy, czyli fragmente o nieznannej sekwencji, prowadzono w czterech różnych naczyniach. W każdym z nich zastosowano inny terminator syntezy, odpowiednio: ddATP, ddCTP, ddGTP i ddTTP, otrzymując specyficzne serie fragmentów. Następnie dla każdej z tych serii rejestrowano widmo masowe. Cztery niezależne widma zestawiano ze sobą w celu identyfikacji kolejnych nukleotydów w sekwencji (Rys. 15).

Metoda ta wykazuje dokładnie te same zalety, które wymieniłam w podsumowaniu poprzedniej. Poza tym możliwe jest zastosowanie do jej potrzeb bardzo niewielkich ilości materiału. Jednakże w widmie pojawiają się intensywne sygnały, pochodzące między innymi od starterów, które obniżają względną intensywność sygnałów pochodzących od analizowanych fragmentów oraz pogarszają rozdzielczość. Sprawia to, że piki „giną w tle” i ich odczytanie staje się niemożliwe.



Rys. 15. Widma czterech reakcji sekwencjonowania Sangera, czynnikami terminującymi były odpowiednio:

A - ddA, B - ddC, C - ddG i D - ddT.

Najczęstszą przyczyną złej jakości widm oligonukleotydów jest ich fragmentacja w źródle jonów. Rozległość fragmentacji rośnie wraz ze wzrostem długości oligomeru. W celu zwiększenia trwałości oligonukleotydu w warunkach wzbudzenia użyto w metodzie sekwencjonowania Sangera trwalszych analogów nukleotydów: 7-deaza-dATP, 7-deaza-dGTP oraz 2'-F-dCTP [93]. Uzyskano w ten sposób lepszą rozdzielczość, na tyle dobrą, aby obok

właściwych, zaobserwować produkty fałszywej terminacji (fragmenty zawierające deoksyzamiast dideoksynukleozyd na 3'-końcu). Ruchliwość elektroforetyczna w żelu poliakrylamidowym produktów fałszywej terminacji jest identyczna z właściwymi, dlatego nie zdiagnozowano tego problemu wcześniej. Dopiero analiza spektrometryczna pozwoliła na „odkrycie” czynnika obniżającego jakość widm MALDI otrzymywanych w wyniku analizy fragmentów powstałych w cyklu sekwencjonowania metodą Sangera, ograniczającego zastosowanie metody do krótkich, maksymalnie 50 nukleotydowych fragmentów.

Mimo problemów z rozdzielczością potencjał spektrometrii mas jako metody następczej w stosunku do analizy elektroforetycznej został dostrzeżony. Kolejnym krokiem było usprawnienie sekwencjonowania metodą Sangera. Cztery równoległe reakcje syntezy zastąpiono jedną, z użyciem wszystkich czterech czynników terminujących jednocześnie [94]. Na koniec otrzymano jedno widmo masowe, a kolejność nukleotydów w sekwencji ustalono na podstawie różnic mas pomiędzy sąsiednimi pikami, odpowiadających masom poszczególnych nukleotydów. Nadal jednak obserwowano w widmie podwojone piki, pochodzące od produktów niewłaściwej terminacji.

Z tym problemem rozprawiono się ostatecznie dopiero w roku 2001, kiedy Edwards *et al.* zaproponowali zastosowanie dideoksynukleotydów modyfikowanych biotyną [95]. W ten sposób, w cyklu sekwencjonowania Sangera, otrzymywano fragmenty, niosące biotynę na 3'-końcu. Te fragmenty następnie „wyławiano” z mieszaniny substratów i ubocznych produktów za pomocą ziaren magnetycznego podłoża pokrytych streptawidyną. W ten sposób, po odłączeniu od podłoża, mieszanina oligonukleotydów pozbawiona była starterów, produktów fałszywej terminacji, a także enzymów i zanieczyszczeń nieorganicznych mogących utrudniać analizę. Za pomocą spektrometrii mas MALDI analizowano więc tylko właściwe produkty terminacji.

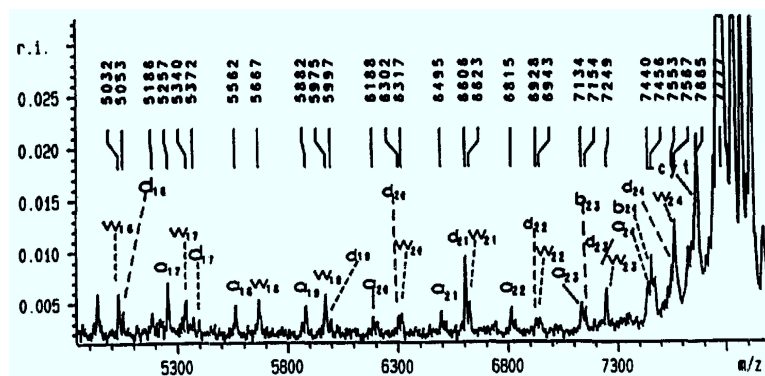
Pomimo wszelkich udoskonaleń metody sekwencjonowania Sangera z użyciem spektrometrii mas jest to metoda, której zastosowanie ogranicza się do oligonukleotydów składających się z naturalnie występujących jednostek. Niemożliwe jest bowiem odwzorowanie modyfikacji (jej rodzaju i położenia) w nici potomnej, nawet jeśli jej obecność nie zaburzyłaby samej syntezy.

3.2.3.5. Modyfikowane oligonukleotydy

W celu „czytania” sekwencji modyfikowanych oligonukleotydów, dla których nie można zastosować metod enzymatycznych, przeprowadzono próby sekwencjonowania przy użyciu fragmentacji. Oligonukleotydy chimeryczne - zawierające zarówno fosforanowe jak i tiofosforanowe wiązania internukleotydowe poddano fragmentacji w źródle jonów [96].

Analizie poddano 17-mery i 25-mery, dla których otrzymano prawie kompletną serię jonów typu w (**Rys. 11, str. 18**), pozwalającą na weryfikację sekwencji. Powstają one jako produkty główne fragmentacji w źródle jonów MALDI tiofosforanów oligonukleotydów i jest to fakt ułatwiający znacznie interpretację ich widm. W wyniku zastosowania wysokiego natężenia promieniowania (minimalnego dla uzyskania fragmentacji) rejestrowane widma charakteryzują się słabą rozdzielczością, co uniemożliwiło prawidłowe przypisanie sekwencji w niektórych regionach oligomeru (**Rys. 16**).

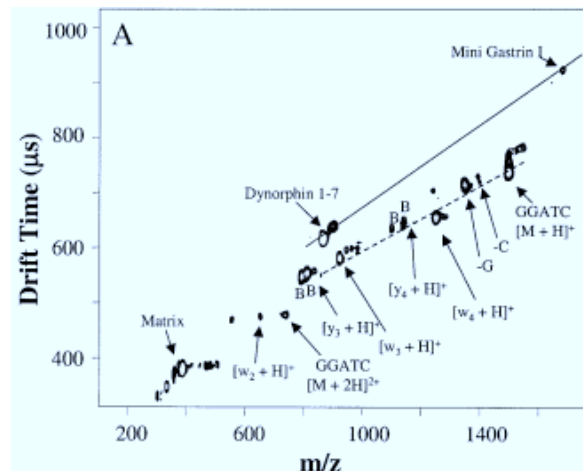
Metoda pozwala na potwierdzenie sekwencji modyfikowanych oligonukleotydów, których struktura nie może być zbadana innymi drogami. Dodatkową jej zaletą jest również duża szybkość z jaką można otrzymać rezultaty. Niestety, można ją zastosować do weryfikacji sekwencji, ale nie można odczytać na jej podstawie sekwencji *de novo*, ponieważ otrzymane wyniki nie są jednoznaczne. Poza tym, jak wynika z wielu przeprowadzonych badań [97-101], wydajność fragmentacji dramatycznie spada lub często nie następuje wcale w sąsiedztwie tymidyny, powodując luki w serii sygnałów pochodzących od jonów fragmentarycznych typu w w widmie. Pierwszym krokiem, prowadzącym do fragmentacji oligonukleotydu, jest protonowanie nukleozasady, następnie jej odłączenie i powstanie tzw. *abasic site*. Konsekwencją odszczepienia zasady z łańcucha jest rozerwanie szkieletu fosfocukrowego w tymże miejscu (**Rozdział II, Rys. 27**). Niska wydajność fragmentacji jest wynikiem niskiej zasadowości tyminy.



Rys. 16. Widmo MALDI chimerycznego 25-meru PO-PS. Fragmentacja w źródle jonów.

Niektóre niejednoznaczności wynikające z zależnych od sekwencji różnic w wydajności fragmentacji, udało się rozwiązać za pomocą spektrometrii mas MALDI-IM-TOF (IM - ang. *ion mobility*) [102]. Metoda opiera się na jonizacji i wzbudzeniu cząsteczek analitu za pomocą promieniowania lasera, rozdziału jonów zgodnie z ich ruchliwością w polu elektrycznym (zależną od masy, rozmiaru i kształtu jonu) i kolejnego rozdziału względem czasu przelotu jonów w próżni. Na końcu następuje rejestracja dwuwymiarowego widma, w którym jony rozróżniane są zarówno na podstawie stosunku m/z , jak i ruchliwości w polu elektrycznym

(Rys. 17). Zastosowanie analizatora IM pozwoliło na jednoznaczne rozróżnienie jonów fragmentarycznych typu w i y , których masy różnią się o 80 Da. W dalszym ciągu nie rozwiązano jednak problemu niejednorodnej podatności na fragmentację.

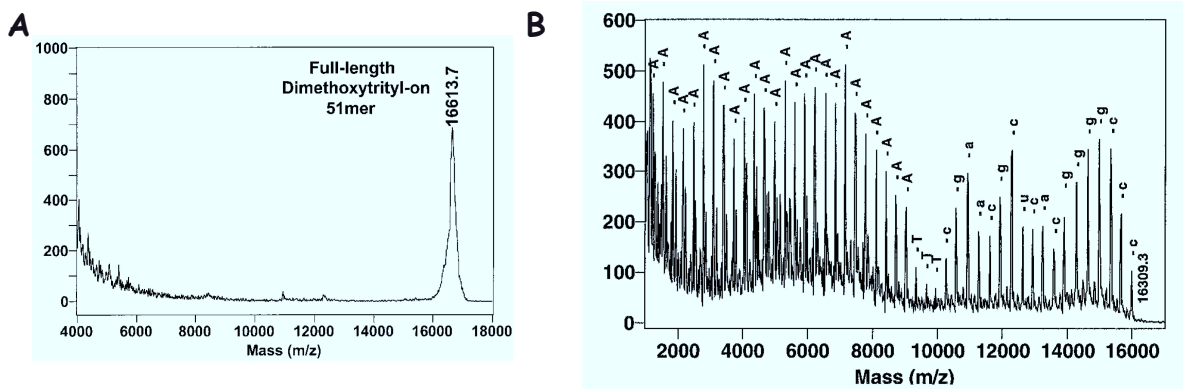


Rys. 17. Widmo MALDI-MI-TOF, fragmentacja w źródle jonów.

3.2.3.6. Analiza fragmentów powstałych w wyniku chemicznej syntezy oligonukleotydu

Kolejnym sposobem pozwalającym na odczytanie sekwencji oligonukleotydu z wykorzystaniem spektrometrii mas jest analiza surowej mieszaniny produktów otrzymanych w wyniku chemicznej syntezy [103, 104]. Wydajność etapowa chemicznej syntezy oligonukleotydu nie przekracza 99,9%. Wynikiem niekompletnego sprzęgania amidofosforynów nukleozydów jest obecność sekwencji o niepełnej długości. Krótsze fragmenty pozostają po każdym kroku syntezy od jej początku aż do końca i są zwykle widoczne w widmie. Na ich podstawie możliwa jest weryfikacja sekwencji. Z analitycznego punktu widzenia, przeważającym produktem syntezy jest najdłuższy oligonukleotyd i pochodzący od niego sygnał dominuje w widmie. Powoduje to utrudnienia w rejestracji sygnałów pochodzących od krótszych fragmentów (Rys. 18A).

W celu wyodrębnienia najdłuższego fragmentu, przeprowadzono syntezę oligonukleotydu zachowując grupę dimetoksytrytylową na 5'-końcu. Następnie, otrzymaną w wyniku syntezy mieszaninę produktów, naniesiono na niepolarnie złożo C-18. Dimetoksytrytylowa grupa na końcu 3' najdłuższego oligonukleotydu powodowała silniejsze jego wiązanie do złoża. Dzięki temu krótsze sekwencje mogły być od niego oddzielone. Następnie frakcje zawierające krótsze oligomery zagęszczono i analizowano za pomocą spektrometrii mas MALDI (Rys. 18B).

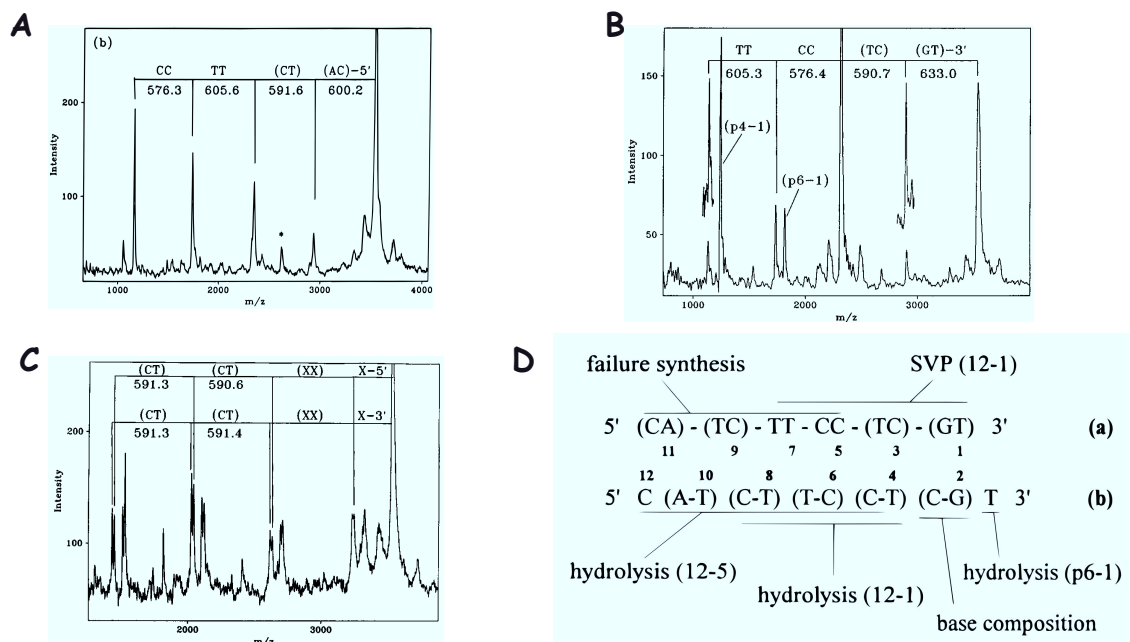


Rys. 18. Widma MALDI mieszaniny produktów chemicznej syntezy 51-meru, A: surowej mieszaniny, B: po odczyszczeniu najdłuższego produktu.

Metoda ta jest skuteczna, niestety jej zastosowanie ogranicza się do analizy produktów syntezy w dużej skali.

3.2.3.7. Metody mieszane

Ustalenie sekwencji modyfikowanych oligonukleotydów jest wyjątkowo trudnym problemem, którego rozwiązanie wymaga często zastosowania kilku różnych, komplementarnych metod. Takie podejście pozwoliło na odczytanie sekwencji chimerycznego oligonukleotydu, którego szkielet był zbudowany naprzemiennie z metylofosfonianów oraz fosforanów nukleozydów [105].

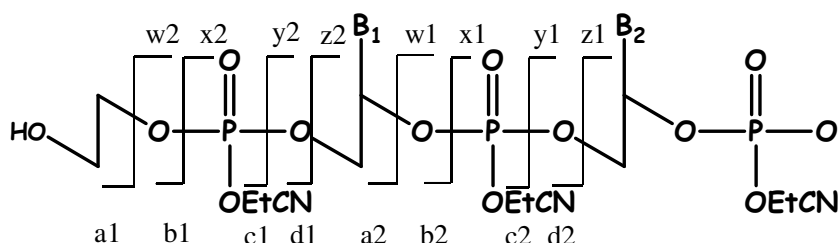


Rys. 19. Widma MALDI: A) surowego produktu syntezy oligonukleotydu; B) produktów częściowej hydrolizy enzymatycznej; C) produktów częściowej hydrolizy chemicznej; D) schematyczne zestawienie wszystkich trzech metod.

Zastosowano analizę surowej mieszaniny produktów otrzymanych w wyniku chemicznej syntezy oligonukleotydu oraz analizę produktów częściowej degradacji na drodze enzymatycznej lub chemicznej. Hydrolizie enzymatycznej pod wpływem fosfodiesterazy z jadu węża ulegały wiązania fosfodiesterowe, ale nie metylofosfonianodiesterowe. Z kolei te ostatnie znacznie łatwiej ulegały hydrolizie zasadowej. Fragment sekwencji, którego nie udało się ustalić w żaden z wymienionych sposobów, został odczytany na podstawie widma surowej mieszaniny produktów syntezy (**Rys. 19**). Podobne podejście zastosowano w przypadku oligonukleotydów zawierających w sekwencji 5-hydroksurydyne [106].

3.2.3.8. Fosforanotriestry oligonukleotydów

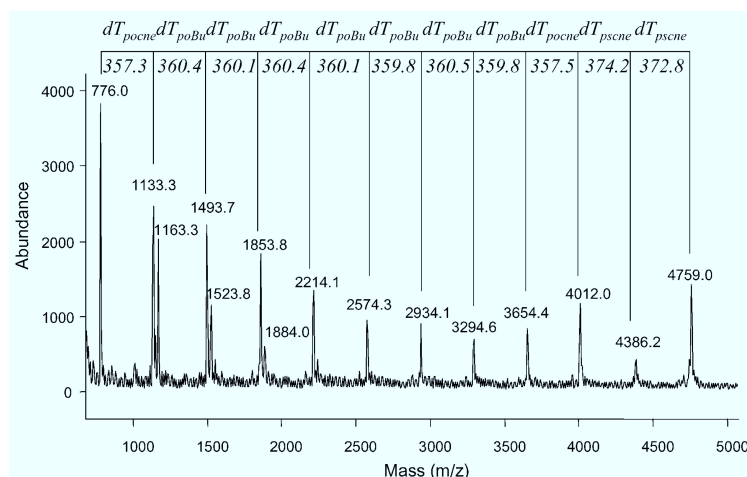
Innym sposobem umożliwiającym poznanie sekwencji jest analiza MALDI fosforanotriestrów oligonukleotydów. W laboratorium J.-J. Vasseur'a przeprowadzono badania trwałości oligonukleotydów niosących blokady reszt fosforanowych w warunkach MALDI [107]. Okazało się, że promieniowanie UV emitowane przez laser powoduje fragmentację łańcucha oligonukleotydu generując w widmie serię sygnałów umożliwiających odczytanie sekwencji. Przeprowadzono analizę oligonukleotydów bezpośrednio związanych z podłożem LCAA-CPG za pomocą łącznika sukcyinowego. Główna ścieżka dysocjacji prowadzi do otrzymania jonów typu *d* reprezentujących sekwencję, którą można odczytać w kierunku od 5'-do 3'-końca (**Rys. 20**).



Rys. 20. Nomenklatura jonów potomnych oligonukleotydu według McLuckey'a.

Pierwszy nukleotyd od końca 3' zakotwiczony jest na podłożu za pomocą łącznika sukcyinowego. Połączenie to jest trwałe w warunkach MALDI, dlatego możliwe jest odczytanie z widma dopiero drugiego w kolejności nukleotydu. Trzy nukleotydy od 5'-końca również nie mogą być w ten sposób oznaczone, ze względu na występowanie reprezentujących je sygnałów w rejonie, w którym pojawiają się sygnały pochodzące od matrycy. Badano wpływ rodzaju grup ochronnych na fragmentację, jak również zastosowanie tej metody do analizy oligonukleotydów niosących różnego rodzaju modyfikacje oraz wpływ długości oligomeru na wydajność fragmentacji [108]. Najdłuższym oligonukleotydem poddanym

analizie był 15-mer z mieszanymi grupami ochronnymi funkcji fosforanowych (cyjanoetylową i butylową) (**Rys. 21**).



Rys. 21. Widmo MALDI 15-meru niosącego grupy ochronne funkcji fosforanowych: cyjanoetylową i butylową na fosforanach.

Metodę można wykorzystać do monitorowania przebiegu syntezy, wydajności jej poszczególnych etapów oraz identyfikacji produktów ubocznych. Możliwa jest bezpośrednia analiza w pełni blokowanego oligomeru związanego z podłożem. Jest to metoda pozwalająca na szybki wgląd w strukturę oligonukleotydu w trakcie syntezy. Niestety, sprawdza się jedynie w stosunku do oligomerów niosących grupy ochronne reszt fosforanowych.

4. Łączniki do syntezy na podłożu stałym

Rozproszone biblioteki kombinatoryczne najczęściej otrzymywane są w wyniku syntezy na podłożu stałym. Jednym z najistotniejszych dla tego procesu elementów jest wybór odpowiedniego łącznika, który zakotwiczy syntezowaną cząsteczkę na ziarnie podłoża (**Rys. 22**). Idealny łącznik powinien spełniać następujące wymagania:

- być tani i łatwo dostępny,
- pozwalać na szybkie i wydajne przyłączenie pierwszej jednostki,
- być trwały w warunkach syntezy,
- jego rozszczepienie powinno być wydajne, a zastosowane do tego celu warunki nie powinny naruszać struktury finalnego produktu,
- metoda rozłączenia nie powinna dostarczać trudnych do usunięcia zanieczyszczeń.

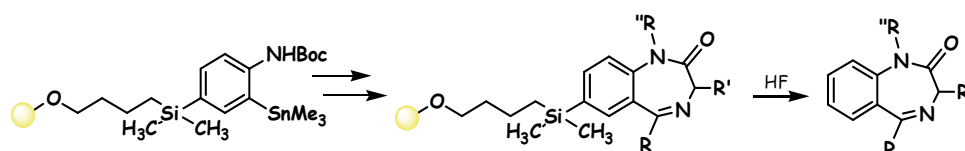
W syntezie kombinatorycznej oligonukleotydów dodatkowym wymaganiem jest trwałość łącznika w warunkach odblokowania oligomeru. Oligonukleotydy powinny bowiem pozostać związane z podłożem podczas procesu przeszukiwania biblioteki, a następnie powinno być możliwe ich łatwe uwolnienie, by możliwa była analiza ich struktury.

Podłoże-Łącznik-Cząsteczka $\xrightarrow{\text{Rozłączenie}}$ **Podłoże-Łącznik' + Cząsteczka**

Rys. 22. Generalny schemat przedstawiający zasadę funkcjonowania łączników w syntezie na podłożu stałym.

Wśród najczęściej stosowanych w syntezie na podłożu stałym łączników znajdują się:

- kwasolabilne - zwykle rozszczepiane za pomocą HF lub TFA, których nadmiaru można się pozbyć w wyniku odparowania,
- zasadolabilne - najczęściej rozłączane przy użyciu roztworu NH_3 , który jest również usuwany podczas odparowania,
- bezśladowe (ang. *traceless*) - odłączenie związku od podłoża następuje najczęściej w silnie kwasowych warunkach. Po rozszczepieniu łącznik nie zostawia grupy funkcyjnej docelowemu produktowi, a w miejscu odszczepienia łącznika tworzone jest nowe wiązanie węgiel-wodór, bądź węgiel-węgiel.



Schemat 2. Rozłączenie łącznika typu traceless

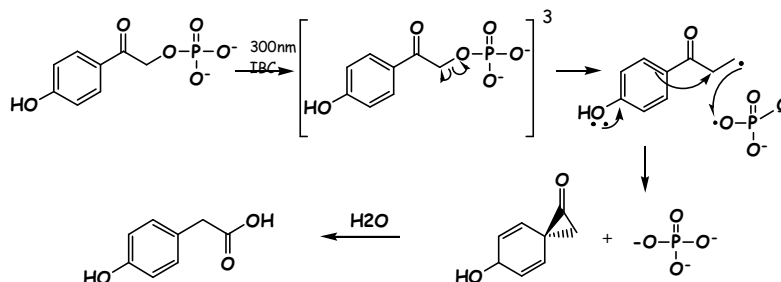
Przedstawione powyżej typy łączników nie mogą być zastosowane w syntezie kombinatorycznych bibliotek oligonukleotydowych, ze względu na warunki ich rozszczepienia. Warunki kwasowe stosuje się podczas syntezy (odblokowanie grupy dimetoksytrytylowej), a zasadowe do odblokowania grup funkcyjnych oligonukleotydu. Łączniki bezśladowe (ang. *traceless*) usuwane są z kolei w drastycznych warunkach, jakich nie przetrwałby oligonukleotyd. Zastosowanie w obszarze chemii kombinatorycznej znalazły łączniki:

- rozszczepiane po aktywacji (ang. *safety catch*) - uwolnienie produktu odbywa się w dwóch krokach, w pierwszym następuje aktywacja, w drugim odłączenie produktu,
- fotolabilne - rozszczepiane światłem,
- inne np.: rozłączane oksydacyjnie lub redukcyjnie.

4.1. Łączniki fotolabilne

W tym zwięzłym przeglądzie chciałabym skupić się głównie na łącznikach fotolabilnych. Szczególną zaletą takiego połączenia z podłożem jest możliwość bezpośredniej analizy cząsteczek związanych z podłożem za pomocą spektrometrii mas. Jako pierwsi tę możliwość zauważyli i opisali Fitzgerald *et al.* [109]. Jako łącznika fotolabilnego użyto tu

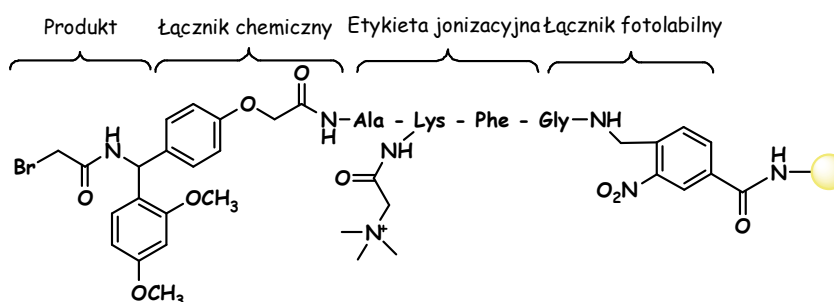
α -metylofenacyl, który, jak dowiedziono [110], pod wpływem naświetlania promieniowaniem o długości 254-366nm ulega wzbudzeniu do krótko żyjącego stanu trypletowego, w następnym etapie uwalniając połączony z nim związek (**Rys. 23**). Ponieważ najczęściej w spektrometrii mas MALDI stosowany laser azotowy emituje promieniowanie o długości 337nm, z jego użyciem możliwa jest bezpośrednia analiza związku połączony z podłożem poprzez łącznik fotolabilny.



Rys. 23. Wzbudzenie α -metylofenacylu i uwolnienie fosforanu.

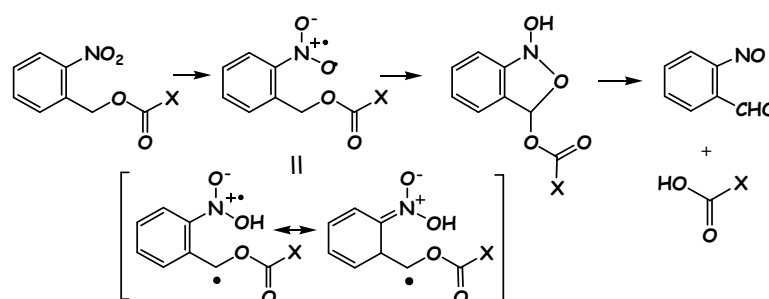
Bezpośrednia analiza MALDI cząsteczek związanych z podłożem ma kilka istotnych zalet dających jej przewagę nad metodami, które wymagają dodatkowego etapu odłączenia produktu od podłoża przed jego analizą. Przede wszystkim, zastosowanie fotolabilnego połączenia z podłożem pozwala na monitorowanie reakcji chemicznych w czasie rzeczywistym. Przypomina tym samym chromatografię cienkowarstwową stosowaną dla reakcji w roztworze. Inną istotną zaletą jest fakt, że tylko niewielka porcja związku zakotwiczonego na podłożu zostaje wykorzystana podczas analizy, reszta substancji może zostać odłączona od ziarna podłoża i użyta do dalszych reakcji lub zastosowana w inny sposób.

Niestety, nie wszystkie związki ulegają jonizacji w warunkach analizy MALDI. Te, które nie posiadają miejsc protonowania nie mogą zostać wzbudzone. Ominięcie tej przeszkody, poprzez dodanie „etykiety jonizacyjnej”, zaproponował Carrasco [111]. Zaprojektowano i otrzymano układ składający się z łącznika fotolabilnego, etykiety mającej zdolność jonizacji oraz łącznika rozszczepianego chemicznie, do którego przyłączano syntetyzowaną cząsteczkę (**Rys. 24**).



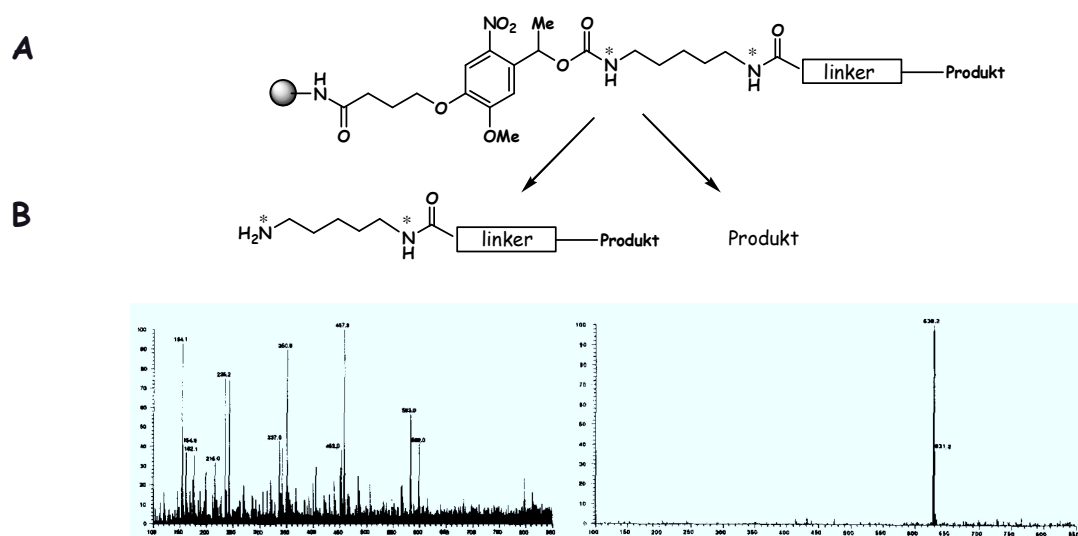
Rys. 24. Wielofunkcyjny układ zawierający etykietę jonizacyjną.

Połączenie ze sobą molekuł o różnych właściwościach otworzyło szereg możliwości. Po pierwsze, wprowadzenie „etykiety jonizacyjnej” pozwoliło na analizę MALDI cząsteczek, które w normalnych warunkach nie ulegają jonizacji. Po drugie, dodanie etykiety wiąże się ze zwiększeniem masy analizowanej cząsteczki i przesunięciem jej sygnału w widmie poza zakres występowania pików pochodzących od matrycy. Fotolabilny łącznik pozwala na bezpośrednią analizę MALDI cząsteczek związanych z podłożem, zaś połączenie etykiety z analizowaną cząsteczką poprzez łącznik rozszczepiany chemicznie umożliwia jej niezależne odłączenie, podczas gdy etykieta pozostaje związana z podłożem.



Rys. 25. Fotoizomeryzacja łącznika *o*-nitrobenzylowego.

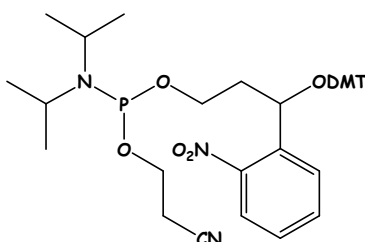
W tej pracy wykorzystano popularniejszy łącznik fotochemiczny, pochodną *o*-nitrobenzylową, którą jako fotolabilną grupę ochronną wprowadzili Patchornik, Amit i Woodward [112]. Uwolnienie produktu opiera się na indukowanej światłem fotoizomeryzacji pochodnych alkoholu *o*-nitrobenzylowego do *o*-nitrobenzaldehydu (Rys. 25).



Rys. 26. Zasada wykorzystania fotolabilnego konstruktu: **A** - odłączenie produktu od podłoża; **B** - widma MALDI peptydu bez i z przyłączoną etykietą jonizacyjną. * - 50% ^{15}N .

Na koncepcji etykiet jonizacyjnych oparł swój pomysł McKeown [113]. Niektóre peptydy, pomimo posiadania miejsc protonowania, mają niską zdolność jonizacji, co odzwierciedla się w złej jakości otrzymywanych w wyniku ich analizy widm. Poprawę właściwości jonizacyjnych cząsteczek może przynieść wprowadzenie pierwszorzędowej grupy aminowej, która ma dobre zdolności do jonizacji. Zbudowano układ, którego ogólny schemat budowy przypomina ten skonstruowany przez Carrasco [111]. Do podłoża, poprzez łącznik fotolabilny, przyłączono etykietę - 1,5-diaminopentan, oraz łącznik rozszczepiany chemicznie, na którym prowadzono syntezę peptydów. Przyłączenie etykiety jonizacyjnej do peptydów o niskich skłonnościach do jonizacji poprawiło znacznie jakość ich widm. Umożliwiło wręcz analizę materiału zgromadzonego na jednym ziarnie podłoża, co wcześniej było raczej trudne (**Rys. 26**).

Fotolabilne połączenie z podłożem zastosowano również w chemii oligonukleotydów [114]. Zsyntezowano łącznik fotolabilny, który użyto w postaci amidofosforynu w automatycznej syntezie oligonukleotydu (**Rys. 27**). Proces syntezy był wydajny. Osiągano w jego wyniku podłoże o wysokim stopniu załadowania, a oligonukleotydy otrzymywano z dobrą wydajnością. Po skończonej syntezie możliwe było odłączenie oligonukleotydu od podłoża poprzez naświetlanie promieniowaniem UV o długości fali 370 nm. Oligonukleotyd połączony z podłożem łącznikiem fotolabilnym można było również poddać bezpośrednio analizie MALDI, bez konieczności wcześniejszego odłączenia go od podłoża. Możliwe było również monitorowanie procesu odblokowania oligonukleotydu w czasie rzeczywistym [115].



Rys. 27. Łącznik fotolabilny wykorzystany w automatycznej syntezie oligonukleotydów.

Opisano również wykorzystanie fotolabilnych łączników do syntezy oligonukleotydów modyfikowanych na 3'-końcu. Z jego użyciem otrzymano oligonukleotydy niosące na 3'-końcu resztę kwasu glikolowego [116] jak i innych kwasów [117], wolną grupę 3'-hydroksylową [118] i grupy alkiloaminowe [119]. Przedstawiono propozycje zastosowania fotolabilnego połączenia w syntezie kombinatorycznej peptydów [111, 113, 120] oraz proteomicie chemicznej [121].

Jak twierdzą autorzy cytowanej literatury, zastosowanie fotolabilnego łącznika do syntezy oligonukleotydów na stałym podłożu pozwala na uwolnienie otrzymanego produktu bez użycia środków chemicznych, a sposób odłączenia jest ortogonalny do warunków syntezy i odblokowania oligomeru. Możliwość bezpośredniej analizy produktów syntezy za pomocą spektrometrii mas MALDI bez konieczności wcześniejszego uwolnienia oligonukleotydu z ziarna podłoża jest wyjątkową zaletą tego podejścia. Głównie dlatego, że wyklucza konieczność stosowania dodatkowych reagentów, a w związku z tym wprowadzania do próby zanieczyszczeń. Możliwe jest również monitorowanie postępu reakcji na podłożu w czasie jej trwania. Wszystkie wymienione zalety sprawiają, że fotochemiczne odłączenie substancji od podłoża wydaje się być atrakcyjną alternatywą dla łączników rozszczepianych chemicznie.

II SPEKTROMETRIA MAS MALDI-TOF

1. Wprowadzenie

Metoda jonizacji MALDI (ang. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry*) została wprowadzona w późnych latach osiemdziesiątych zeszłego stulecia przez Karasa i Hillenkampa [122, 123]. W technice MALDI, jako źródło energii prowadzącej do wzbudzenia analizowanych cząsteczek, zastosowano laser. W zależności od rodzaju wbudowanego lasera emitowane przez niego promieniowanie może mieć różną długość. Oryginalnie Karas i Hillenkamp zastosowali laser neodymowy o częstotliwości czterokrotnej (Nd-YAG), który emitował promieniowanie o długości fali 266nm [124]. Obecnie stosowane są zarówno lasery azotowe (λ 337nm), jak i neodymowe o trzykrotnej częstotliwości (λ 355nm).

W spektrometrii mas MALDI przed analizą, niewielką ilość badanej substancji należy zmieszać z matrycą (najczęściej niskocząsteczkową substancją organiczną o charakterze kwasowym), otrzymaną mieszaninę nałożyć na stalową płytkę i umieścić w komorze wprowadzania próbek spektrometru. Próbkę jest bombardowana emitowaną przez laser pulsującą wiązką światła o długości fali zbliżonej do rezonansowego pasma absorpcji matrycy. Następuje przeniesienie energii, a cząsteczki matrycy oraz analitu ulegają przemianie fazowej i w postaci gazów przechodzą w obszar wysokiej próżni. Jest to tak zwany proces desorpcji. W czasie desorpcji cząsteczki analitu ulegają jonizacji w wyniku protonowania lub odprotonowania. Jest to drugi etap – jonizacja. Jony następnie są przyspieszane w polu elektrycznym i wędrują do analizatora. Najczęściej stosowany jest analizator mierzący czas przelotu jonów, zależny od stosunku masy do ładunku.

Obecnie produkowane aparaty MALDI-TOF wykazują szeroki zakres mierzonych mas (limit mas dla oligonukleotydów wynosi obecnie około 300kDa). Metoda umożliwia analizę wieloskładnikowych mieszanin i wykazuje wysoką tolerancję w stosunku do zanieczyszczeń buforami, detergentami czy niektórymi jonami.

Zanim przejdę do omówienia wykorzystania metody w praktyce (**Część III**) chciałabym umieścić tu krótkie wprowadzenie teoretyczne. Nie można bowiem mówić o analizie oligonukleotydów za pomocą spektrometrii mas MADLI-TOF, nie próbując zrozumieć

procesów związanych z jonizacją analizowanych cząsteczek. Użyłam słowa „próbować”, ponieważ natura tych procesów nie jest do końca zrozumiała, ani dla twórców metody, ani dla badaczy, którzy już przeszło 20 lat prowadzą doświadczenia mające na celu wyjaśnienie wątpliwości, które budzą hipotezy sformułowane w tym obszarze.

2. Mechanizm powstawania jonów

Pierwszy model powstawania jonów w warunkach analizy MALDI zaproponował Ehring [125], sugerując jonizację fotochemiczną. Miał to być proces dwustopniowy, w którym, jako pierwsze, fotojonizacji miały ulegać cząsteczki matrycy, aby następnie, już w fazie gazowej, promować jonizację cząsteczek analitu [126]. Według tego mechanizmu procesy prowadzące do jonizacji cząsteczek matrycy opierają się głównie na gromadzeniu energii (ang. *pooling*) i wielofotonowej absorpcji. Chociaż rozważano również inne drogi tworzenia jonów matrycy, takie jak: przeniesienie protonu w stanie wzbudzenia [127], reakcje dysproporcjonowania [128], czy jonizację termiczną [129]. Jony analitu tworzą się w wyniku protonowania lub odprotonowania podczas zderzeń z cząsteczkami matrycy [130]. Model fotochemicznej jonizacji był szeroko akceptowany, mimo, że nie tłumaczył zjawisk zachodzących podczas analizy MALDI, na przykład, tak zwanych, „sweet spots”. „Sweet spot” jest to miejscowe nagromadzenie cząsteczek analizowanej substancji w obrębie spotu, dające w widmie sygnały o dużej intensywności [131]. Gdyby jony analitu tworzyły się podczas zderzeń w fazie gazowej, intensywność sygnałów w widmach MALDI nie powinna być zależna od procesu krystalizacji.

Kolejny model, zakładający mechanizm jonizacji klasterowej (CI), zaproponował Karas [132-134]. Przyjmuje się w nim, że polimeryczne, protonowane cząsteczki analitu otoczone kwasowymi cząsteczkami matrycy tworzą tzw. klaster, które pod wpływem energii emitowanej przez laser ulegają desorpcji. Jony analitu tworzą się w fazie gazowej w wyniku desolwatacji cząsteczek matrycy. Proces ten przypomina dehydratację zachodzącą podczas jonizacji ESI. Tu jednak nasuwa się pytanie dotyczące przyczyn różnicy w liczbie ładunków, który otrzymuje cząsteczka w obu przypadkach (wielokrotny w ESI, jednostkowy w MALDI).

Ostatnio, zaproponowano mechanizm, który obejmuje proces przeniesienia protonu zachodzący podczas krystalizacji matrycy [135]. Założono, że w fazie stałej kwasowe protony matrycy są przyciągane przez zasadowe atomy biocząsteczki. Proces ten może zachodzić pomiędzy cząsteczkami matrycy i analitu, a także pomiędzy cząsteczkami analitu. Poza tym, ze względu na fakt powstawania podobnych ilości jonów dodatnich i ujemnych, autorzy sugerują proces dysproporcjonowania, indukowany przeniesieniem energii. Jony analitu

powstają w wyniku przeniesienia energii ze wzbudzonych cząsteczek matrycy do cząsteczek analitu, przy czym powstają jednocześnie jony dodatni i ujemny.

Przeprowadzono wiele badań nad mechanizmem desorpcji/ionizacji oraz nad rolą matrycy w tym procesie. Do dziś jednak mało jest pewnych informacji dotyczących mechanizmu jonizacji, za to wiele niejasności związanych z proponowanymi modelami. Co do jednego jednak wszyscy są zgodni, że matryca odgrywa w tym procesie rolę „pośrednika” pomiędzy promieniowaniem emitowanym przez laser a cząsteczkami analitu. Tym samym pełni rolę ochronną, ponieważ cząsteczki analitu nie są bezpośrednio wystawione na działanie promieniowania UV.

3. Analizator mierzący czas przelotu (TOF)

W spektrometrach mas MALDI stosowano różne analizatory [136-140], niemniej najszersze zastosowanie znalazł analizator mierzący czas przelotu jonów (TOF – ang. *Time-of-Flight*). Pulsacyjny charakter wytwarzania jonów idealnie pasuje do trybu działania analizatora typu TOF. Wraz z pulsem lasera uwalniana jest „porcja” jonów, która następnie przyspieszana jest w polu elektrycznym. Od momentu, gdy jony opuszczą akcelerator, mierzony jest czas ich przelotu. Pomiar kończy się w chwili dotarcia jonów do detektora. W momencie detekcji jednej porcji jonów uwalniana jest kolejna.

W akceleratorze wszystkie analizowane cząsteczki mają przyłożoną identyczną energię kinetyczną:

$$E = \frac{1}{2} mv^2 \quad (1)$$

gdzie **E** - energia kinetyczna

m - masa jonu

v – prędkość jonu

Przy założeniu, że:

$$E = Az \quad (2)$$

gdzie **A** – potencjał przyspieszenia

z – ładunek jonu

A jest wartością stałą dla wszystkich jonów. Po przekształceniu równania (1) otrzymamy więc:

$$v = \sqrt{(2z/m)} \quad (3)$$

Z równania (3) jasno widać, że prędkość jonu zależy wyłącznie od jego ładunku i masy.

Pamiętając o tym, że:

$$v = d/t \quad (4)$$

gdzie d – droga
 t – czas

podstawiając równanie (3) do powyższego równania, czas przelotu przez daną, stałą dla wszystkich jonów drogę można wyrazić:

$$t = \sqrt{m/2z} \quad (5)$$

Stąd jasno wynika, że czas przelotu jonów zależy wyłącznie od stosunku ich masy do ładunku, więc jony o tym samym ładunku (wszystkie powstałe w wyniku procesu jonizacji MALDI jony obdarzone są pojedynczym ładunkiem) będą poruszać się w próżni z różną prędkością zależną od ich masy. Do detektora docierają więc będą najpierw jony o niższej masie, a następnie coraz cięższe. Jony są zbierane przez detektor w mikrosekundowych odstępach czasu. Korzyściami z zastosowania w spektrometrach mas analizatora mierzącego czas przelotu jonów są: szeroki zakres mierzonych mas, możliwość analizy dużych, niestabilnych termicznie cząsteczek, a także wysoka czułość oraz dokładność aparatów [141, 142].

W analizatorach typu TOF wpływ fragmentacji analitu na jakość sygnału, mierzonego poprzez stosunek sygnału do szumu, i rozdzielczość zależy od geometrii urządzenia. W trybie liniowym fragmentacja zachodząca podczas przyspieszania jonów w polu elektrycznym skutkuje obniżeniem rozdzielczości sygnałów. Poprawę rozdzielczości uzyskano poprzez wprowadzenie zwierciadeł elektrostatycznych, które umieszczono na końcu drogi przyspieszonych jonów. Po dotarciu do niego jony ulegają odbiciu. Dzięki temu zabiegowi, szybkość powstałych w wyniku metastabilnego rozpadu jonów potomnych (dzielących tę samą energię początkową co jony macierzyste) ulega zróżnicowaniu.

Pisałam powyżej, że jony o tym samym stosunku m/z dzielą tę samą energię kinetyczną, jednakże nie do końca jest to prawdą, różnice w energii istnieją mimo, że są bardzo niewielkie. Niestety, najmniejsze nawet różnice energii skutkują różnicami w szybkości jonów, a w efekcie poszerzeniem sygnałów w widmie i obniżeniem rozdzielczości. Aby temu zapobiec zastosowano opóźnioną ekstrakcję jonów (ang. *delayed extraction*) [103, 143, 144], jest to submikrosekundowy przedział czasowy, w którym ogniskowane są jony przed detekcją. Dzięki temu zabiegowi możliwe jest więc „wyrównanie” prędkości jonów o tym samym stosunku m/z i wyostrenie sygnałów w widmie.

4. Analiza kwasów nukleinowych

Metoda MALDI wykorzystywana jest do analizy związków wielkocząsteczkowych. Stworzono ją z myślą o białkach i peptydach, jednak obecnie jej zastosowanie jest dużo szersze. Za pomocą spektrometrii mas MALDI analizowane są również polisacharydy [145], kwasy nukleinowe [146-149], czy polimery syntetyczne [150, 151]. Już od samych początków jej wprowadzenia, metoda MALDI, znalazła zastosowanie w chemii kwasów nukleinowych. Mimo wczesnych problemów z trwałością oligonukleotydów w warunkach MALDI, jest to w chwili obecnej narzędzie standardowo wykorzystywane do sekwencjonowania [152-156], badania jednonukleotydowych polimorfizmów [157], modyfikacji epigenetycznych [158], czy po prostu potwierdzenia masy oligonukleotydów otrzymanych na drodze syntezy chemicznej czy biologicznej.

Błąd oznaczenia masy oligonukleotydu waha się od 0,01% w przypadku krótkich fragmentów do 0,1% dla 50-merów i rośnie wraz ze wzrostem długości oligonukleotydu. Od wielkości analizowanej substancji zależy również czułość detekcji. W przypadku krótkich oligomerów (do 20nt) do analizy wystarczy 5fmol substancji. Dla dłuższych cząsteczek (>40 nt) potrzeba 1-30pmol oligomeru.

Podczas analizy mieszanin związków obserwuje się tendencję do spadku jakości sygnałów w widmie wraz ze wzrostem masy. Objawia się to niskim stosunkiem sygnału do szumu oraz niską rozdzielczością sygnałów. Niższa skuteczność jonizacji dla dłuższych oligonukleotydów może powodować problemy w ich detekcji. Poza tym w widmie mieszaniny oligonukleotydów stosunek sygnału do szumu oraz rozdzielczość sygnałów pochodzących od cząsteczek o mniejszej masie są znacznie niższe niż w widmach pojedynczych substancji. Prawdopodobnie jest to związane z faktem, że minimalna wartość irradiacji, koniecznej do wzbudzenia, dla mieszaniny oligonukleotydów jest determinowana poprzez najdłuższy z nich. Jej wartość jest więc znacząco zawyżona w stosunku do krótkich oligomerów.

Podsumowując, wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej analizowanego związku:

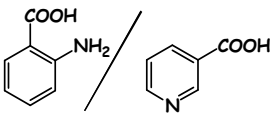
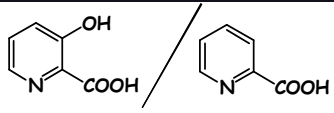
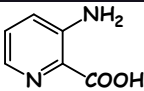
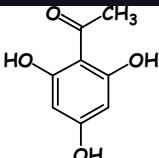
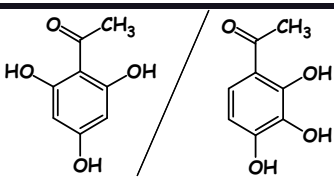
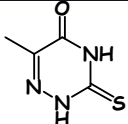
1. Wzrastają - zakres fragmentacji i tendencja do tworzenia adduktów,
2. Spadają - skuteczność detekcji i wydajność jonizacji.

4.1. Matryce

Charakterystyka MALDI kwasów nukleinowych jest dużo trudniejsza niż w przypadku peptydów. Zarówno polianionowa natura, jak i tendencja do fragmentacji utrudniają analizę powodując, że widma oligonukleotydów charakteryzują: słaba rozdzielczość oraz niski stosunek sygnału do szumu. Kluczem do poprawy jakości widm MALDI jest odpowiedni

dobór matrycy w połączeniu z długością promieniowania emitowanego przez laser. Zaledwie niewielka liczba kombinacji okazała się być odpowiednia do analizy kwasów nukleinowych. Zastosowanie większości tych kombinacji daje jakościowo lepsze sygnały dla jonów ujemnych. Wyjątkiem jest użycie HPA, dla którego jakość sygnałów zarówno w trybie jonów dodatnich, jak i ujemnych jest porównywalna [159,160].

Tabela 1. Matryce stosowane do analizy MALDI oligonukleotydów i ich własności chemiczne.

Wzór chemiczny	Nazwa	λ [nm]	Oдноśnik	PA [kJ/mol]
	kwas 2-aminobenzoesowy/kwas nikotynowy	337/355	[161, 162]	895 ABA 918 NA
	3-HPA/kwas pikolinowy 4:1	4:1 337/355 1:8 266	[164]	903 HPA 919 PA
	kwas 3-aminopikolinowy	266/337/355	[165]	937
	2,4,6-trihydroksyacetofenon	337/355	[189]	210 [kcal/mol]
	2,4,6-THAP/2,3,4-THAP 2:1	337/355	[166]	
	6-aza-2-tiotymina	337/355	[167]	

Wszystkie zestawione powyżej matryce są stosowane w połączeniu z organicznymi solami amoniowymi, takimi jak: cytrynian czy winian, które mają na celu redukcję ilości adduktów kwasów nukleinowych z metalami oraz fragmentacji [166].

Odkrycie 3-HPA jako matrycy do MALDI było wielkim przełomem w spektrometrii mas oligonukleotydów, ponieważ znacznie zmniejszyło stopień ich fragmentacji i polepszyło stosunek sygnału do szumu, pozwalając na analizę dłuższych fragmentów. W chwili obecnej mieszanina HPA i cytrynianu diamonowego jest najczęściej stosowaną matrycą do analizy

długich oligonukleotydów. Do analizy oligonukleotydów, nie dłuższych niż 25 nukleotydów, często używa się 2,4,6-THAP, 6-aza-2-tiotyminę lub mieszaninę kwasów aminobenzoowego i nikotynowego.

Kwasy nukleinowe, ze względu na swój charakter, mają duże powinowactwo do jednowartościowych jonów metali. W ich obecności powstają sole oligonukleotydów, które utrudniają analizę, obniżając lotność kwasów nukleinowych i wpływając tym samym na intensywność i szerokość sygnałów. W wyniku przejścia z fazy stałej do fazy gazowej oligonukleotyd przyłącza kationy metali, aby zredukować siły odpychania elektrostatycznego wywołane obecnością ładunków ujemnych w obrębie łańcucha. Powstają jony molekularne z różną liczbą kationów metali. W przypadku analizy wysokocząsteczkowych oligonukleotydów następuje znaczące poszerzenie sygnału. Szczególnie uciążliwe są jony sodu i potasu, ponieważ występują bardzo powszechnie w środowisku. Ten problem można rozwiązać wymieniając je na kationy amonowe. Sole amonowe oligonukleotydów podczas procesu desorpcji/ionizacji ulegają rozkładowi z wytworzeniem wolnego kwasu i amoniaku.

Jest kilka sposobów na wymianę kationów metali na kationy amonu. Chyba najprostszym jest zastosowanie bezpośrednio przed analizą żywicy jonowymiennej załadowanej jonami amonu [162]. Dość wydajną i popularną techniką jest wytrącanie oligonukleotydów za pomocą alkoholu z roztworu octanu amonu [168]. Inną możliwością jest dodanie do roztworu matrycy wspomnianych wcześniej soli amonowych [88]. Przeprowadzono również serię doświadczeń, w których testowano wpływ zasad organicznych na redukcję ilości adduktów oligonukleotydu z metalami oraz trwałość ich jonów molekularnych [169]. Badano także wpływ innych substancji pomocniczych: amin biogennych [170, 171], cukrów [172] oraz poliakrylamidu [173] i glicerolu [174].

Stężenia stosowanych roztworów matrycy są różne i zależą od jej rozpuszczalności, ponieważ przygotowuje się roztwory nasycone. Zwykle zawierają się w granicach 100-500mM. Sygnały pochodzące od jonów matrycy występują w widmie w obszarze 100-1000Da.

4.2. Stabilność jonów i fragmentacja

W zależności od przedziału czasu, w którym odbywa się fragmentacja powstające podczas analizy MALDI-TOF jony fragmentaryczne można podzielić na cztery kategorie [175]:

- powstające natychmiast – kiedy czas życia jonu macierzystego jest porównywalny z czasem jego powstania. Czas przelotu takich jonów fragmentarycznych będzie odpowiadał stosunkowi ich masy do ładunku,

- szybkie – gdy czas życia jonu macierzystego jest nieco dłuższy od czasu potrzebnego na jego wygenerowanie. Takie fragmenty obserwowane są w liniowym widmie jako „ogony” sygnałów skierowane w stronę wyższych mas. Różnice w szybkości kompensuje zastosowanie reflektrometru,
- wczesne metastabilne – gdy czas życia jonów macierzystych jest równy czasowi ich przyspieszenia. Powstałe jony fragmentaryczne są rozsięte w zakresie mas od jonu macierzystego do fragmentarycznego. Wczesna metastabilna fragmentacja jest przyczyną ograniczeń w zastosowaniu metody MALDI,
- metastabilne – powstają w regionie wolnym od pola, mają więc tę samą prędkość co jony macierzyste i wraz z nimi docierają do detektora. Mimo, że mają tę samą prędkość, obdarzone są niższą masą od jonów macierzystych i mogą być wykryte za pomocą analizy PSD (ang. *Post Source Decay*). Jest to technika detekcji jonów metastabilnych, polegająca na stopniowym zmniejszaniu potencjału pola elektrycznego przyłożonego do reflektrometru. Niższe wartości napięcia pozwalają na zbieranie jonów fragmentarycznych w obrębie coraz niższych mas [176-178].

Na zakres fragmentacji ma wpływ szereg czynników. Między innymi jest to rodzaj stosowanej matrycy, ale również czas przebywania oligonukleotydu w akceleratorze [179]. Tłumaczy to wzrastającą wraz z masą tendencją oligonukleotydów do fragmentacji. Jest główną przeszkodą podczas analizy MALDI-TOF długich sekwencji. Im dłuższy oligonukleotyd tym dłużej przebywa w akceleratorze.

Na podstawie analizy MALDI-IR oligonukleotydów z użyciem kwasu bursztynowego jako matrycy ustalono szereg reguł, od których zależy fragmentacja kwasów nukleinowych (zarówno rodzaje jonów fragmentarycznych jak i ich nomenklaturę opisałam w rozdziale

3.2.3.3, Część I):

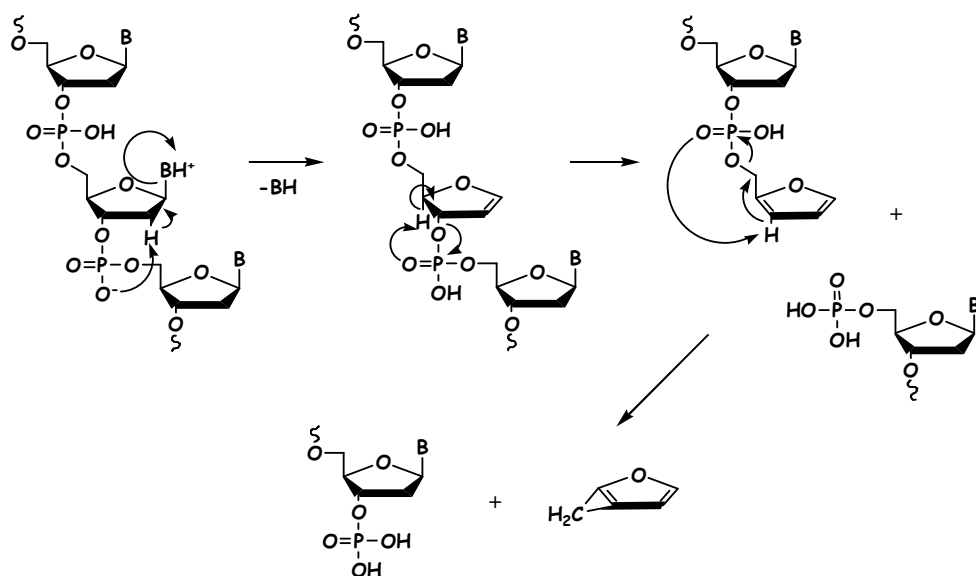
1. największe intensywności w widmie osiągają fragmenty niskocząsteczkowe,
2. ilość jonów fragmentarycznych wzrasta wraz ze wzrostem natężenia promieniowania,
3. nie obserwuje się fragmentacji w sąsiedztwie reszt tymidynowych,
4. w sąsiedztwie A, C, i G nie obserwuje się znaczących różnic w wydajności fragmentacji.

Jest kilka przyczyn, dla których sygnały pochodzące od jonów fragmentarycznych o niższej masie charakteryzują się większą intensywnością. Po pierwsze, bez wątpienia wydajność detekcji maleje wraz ze wzrostem masy. Po drugie, wraz ze wzrostem rozmiarów jonu fragmentarycznego zwiększa się prawdopodobieństwo powstania jonów drugiej

generacji. To ostatnie zjawisko prowadzi do zwiększenia ilości jonów o mniejszej masie kosztem jonów o masie większej.

Przy zastosowaniu matryc innych niż HPA obserwuje się jony fragmentaryczne oligonukleotydów również w widmach MALDI-UV [99, 180]. Stosując kwas pikolinowy jako matrycę w połączeniu z długością promieniowania laserowego 266nm, Juhasz *et al.* na podstawie sygnałów pochodzących od jonów fragmentarycznych mogli zrekonstruować sekwencję 11-meru [103].

Analiza MALDI-PSD jak dotąd daje zadowalające rezultaty wyłącznie dla krótkich oligomerów i przedstawione zostały jedynie widma pięcio- i sześciomerów [181, 182].



Rys. 27. Mechanizm fragmentacji oligonukletydu w warunkach analizy MALDI.

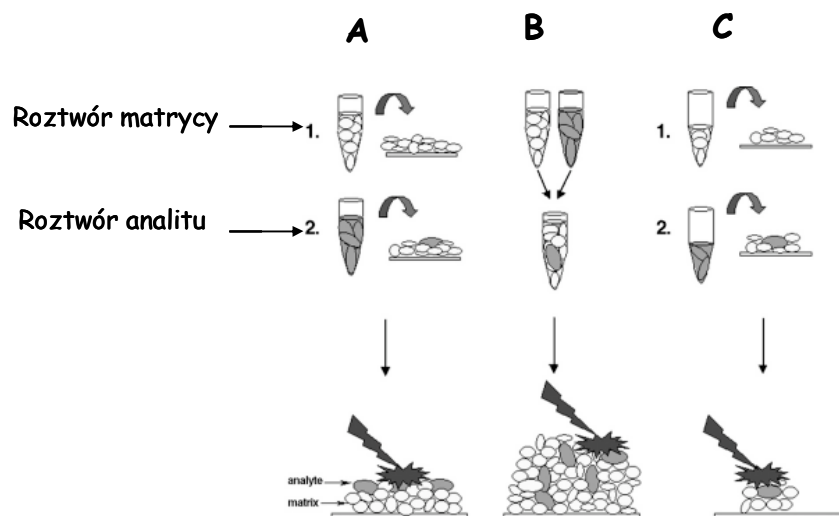
Mechanizm powstawania jonów fragmentarycznych był szeroko badany i do dziś dyskutowane są jego szczegóły. Jednak, co do ogólnego schematu, badacze zajmujący się tą dziedziną są zgodni. Fragmentacja rozpoczyna się 1,2-eliminacją nukleozasady katalizowaną przeniesieniem protonu. Zdania na temat pochodzenia owego protonu są podzielone. Nordhoff uważa, że rozerwanie wiązania N-glikozydowego odbywa się w wyniku przeniesienia protonu z sąsiedniej reszty fosforanowej [175]. Z kolei Zhu twierdzi, że proton przenoszony jest z cząsteczki matrycy [99]. Ta ostatnia hipoteza jest w zgodzie z obserwacjami dotyczącymi rozległości fragmentacji w zależności od stosowanej matrycy, ponieważ cząsteczki matrycy wykazują różną kwasowość, a także stabilnością tymidyny, która wykazuje wyjątkowo niską zasadowość, czy zwiększoną trwałością RNA w stosunku do DNA w warunkach MALDI [159]. Następnym etapem po eliminacji zasady jest rozerwanie wiązania 3'- a następnie 5'-fosfoestrowego i wytworzenie dwóch komplementarnych

fragmentów. Zwykle sygnały pochodzące od obu jonów obserwowane są w widmie MALDI. Ogólny mechanizm fragmentacji przedstawiam na rysunku (**Rys. 27**).

4.3. Przygotowanie próbki do analizy MALDI

Ostatnim już zagadnieniem, które chciałabym omówić w niniejszym rozdziale, jest sposób przygotowania próbki do analizy. Tej tematyce poświęcono wiele publikacji [174, 183, 184]. Generalnie, istnieją dwa powszechnie stosowane metody przygotowania próbki: metoda cienkowarstwowa (ang. *thin-layer*) i metoda siedzącej kropli (ang. *dried-droplet*). W zasadzie wszystkie matryce MALDI mogą być użyte w procedurze siedzącej kropli, jednakże tylko matryce rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych są stosowane w metodzie cienkowarstwowej. W tej ostatniej procedurze mikrolitrową objętość roztworu matrycy w lotnym rozpuszczalniku organicznym (np. kwas α -cyjano-4-hydroksy-cynamonowy w acetonie) nakłada się na płytkę MALDI. Rozpuszczalnik szybko ulatnia się pozostawiając cienką warstwę kryształków matrycy. Na powierzchnię tej warstwy kryształków nanosi się roztwór analitu w rozpuszczalniku, w którym matryca się nie rozpuszcza (np. w wodzie). Cząsteczki analitu wbudowują się w powierzchnię matrycy (**Rys. 28**).

Procedura siedzącej kropli, z kolei, polega na zmieszaniu roztworu matrycy z analitem i nałożeniu na płytkę MALDI. Można również nałożyć roztwór matrycy na powierzchnię płytki. Po odparowaniu rozpuszczalnika nakładany jest roztwór analitu. Najczęściej procedura ta prowadzi do powstawania tzw. mikrolokalizacji (ang. *sweet spots*). Są to pozycje w obrębie przygotowanego do analizy preparatu, które dają lepsze rezultaty niż pozostałe. Jest to zjawisko ściśle związane z procesem krystalizacji matrycy.



Rys. 28. Sposoby przygotowania próbki do analizy: **A** – cienkowarstwowa, **B** – procedura siedzącej kropli, **C** – wariacja na temat metody siedzącej kropli.

Preparatyka cienkowarstwowa pozwala uzyskać lepszą powtarzalność analiz, a także uzyskać większą dokładność w oznaczeniu masy i wyższą rozdzielczość. Niestety, matryce stosowane do analizy oligonukleotydów są dobrze rozpuszczalne w wodzie. Ten fakt uniemożliwia zastosowanie do przygotowania próbki do analizy procedury cienkowarstwowej.

5. Podsumowanie

To już wszystkie aspekty dotyczące analizy MALDI oligonukleotydów, na które chciałam zwrócić szczególną uwagę. Ten krótki rozdział miał na celu przedstawienie wyjątkowych zalet metody MALDI, ale również jej ograniczeń. Miał także pomóc w zrozumieniu problemów, z którymi się spotkałam podczas badań opisanych w dalszej części pracy.

III WYNIKI I DYSKUSJA

1. Wstęp

Historia syntezy kombinatorycznej rozpoczęła się we wczesnych latach osiemdziesiątych zeszłego stulecia. Jest to podejście do syntezy chemicznej, które umożliwia otrzymanie nawet milionów związków w krótkim czasie, a następnie równoległe, ale niezależne badanie ich właściwości. Dzięki tym szczególnym zaletom jest to narzędzie chętnie wykorzystywane zarówno w przemyśle farmaceutycznym, w poszukiwaniach związków wiodących (ang. *lead*) [4-7] i chemicznym, gdzie służy do syntezy nowych materiałów [8, 9], czy też tańszych i wydajniejszych katalizatorów [185]. Syntezę kombinatoryczną od momentu powstania stosuje się również w chemii oligonukleotydów i ich analogów [2, 3, 15-21]. Z jej pomocą poszukuje się aptamerów stosowanych w terapii antysensowej i antygenowej [3, 2, 15-18]. Prowadzone są również badania strukturalne [186] oraz nad sekwencjonowaniem genomu [19-21].

Za pomocą metod zaczerpniętych z biologii molekularnej opracowano ogólne metody syntezy i przeszukiwania bibliotek kombinatorycznych. Otwartym problemem nadal jednak pozostaje opracowanie metody „odczytywania” struktury wyselekcjonowanych elementów biblioteki. W celu rozwiązania problemu sekwencjonowania elementów bibliotek oligonukleotydowych zaproponowano szereg metod, które ewoluowały w czasie, od opisów ołówkiem na bibule [187, 188], po charakterystykę spektralną [44-47, 55-77]. Mimo jednak różnorodności propozycji, nie ma wśród nich prostej, uniwersalnej techniki, bezpośredniej i niedrogiej, która pozwoliłaby na poznanie struktury wyselekcjonowanego elementu biblioteki oligonukleotydowej, metody na tyle ogólnej, by za jej pomocą możliwe było poznanie struktury dowolnie modyfikowanego oligonukleotydu.

Metody pośrednie, opracowane w celu odczytywania sekwencji, są pracochłonne, a klasyczne metody sekwencjonowania wymagają dysponowania dużymi ilościami materiału (Część I). W przypadku bibliotek oligonukleotydowych, których elementy zbudowane są z naturalnie występujących jednostek, możliwe jest zastosowanie reakcji PCR w celu „pomnożenia” ilości substancji. Inaczej wygląda sytuacja, kiedy do czynienia mamy z

modyfikowanymi oligonukleotydami, których nie można poddać amplifikacji, ponieważ modyfikacje nie mogą być odwzorowane w niciach potomnych. W związku z tym, do dyspozycji eksperymentatora pozostaje ilość związku zgromadzona na jednym ziarenku podłoża, w najlepszym wypadku kilka pikomoli. Jedną z metod wystarczająco czułych, by za jej pomocą analizować tak znikome ilości substancji, jest spektrometria mas. Tę metodę, bezpośrednią i uniwersalną, wybrałam do opracowania metody sekwencjonowania bibliotek oligonukleotydowych.

2. Wybór metody analizy oligonukleotydów

Wybór spektrometrii mas MALDI-TOF podyktowany był kilkoma względami:

1. jest to metoda tak zwanej miękkiej jonizacji - stosowana energia nie powoduje rozległej fragmentacji powstałych jonów,
2. powstające jony obdarzone są pojedynczym ładunkiem, dodatnim lub ujemnym w zależności od zastosowanych warunków analizy, możliwa jest więc analiza nawet bardzo skomplikowanych mieszanin związków,
3. jest metodą czułą - możliwa jest analiza femtomolowych ilości czystego, pojedynczego związku,
4. w granicach interesujących mnie mas (około 3,5-4kDa) możliwe jest oznaczenie masy związku z dokładnością do 0,01% - teoretycznie możliwe jest więc rozróżnienie dwóch związków, których masy różnią się o 0,5Da.

Niebagatelną rolę w wyborze odegrała również możliwość swobodnego dostępu do aparatury.

3. Analiza fosfortriestrów oligonukleotydów za pomocą spektrometrii mas MALDI-TOF

Wielokrotnie pisałam (Część I - 3.2.3.3 i II - 4.2), że w widmach MALDI oligonukleotydów zazwyczaj nie obserwuje się sygnałów pochodzących od jonów fragmentarycznych [137, 189]. Dowiedziono jednak, że fosforanotriestry oligonukleotydów [107, 108] w warunkach MALDI ulegają rozległej fragmentacji w źródle jonów i w ich widmach widoczne są intensywne sygnały pochodzące od jonów potomnych. Szerzej opisałam to zjawisko w rozdziale 3.2.3.8 (Część I).

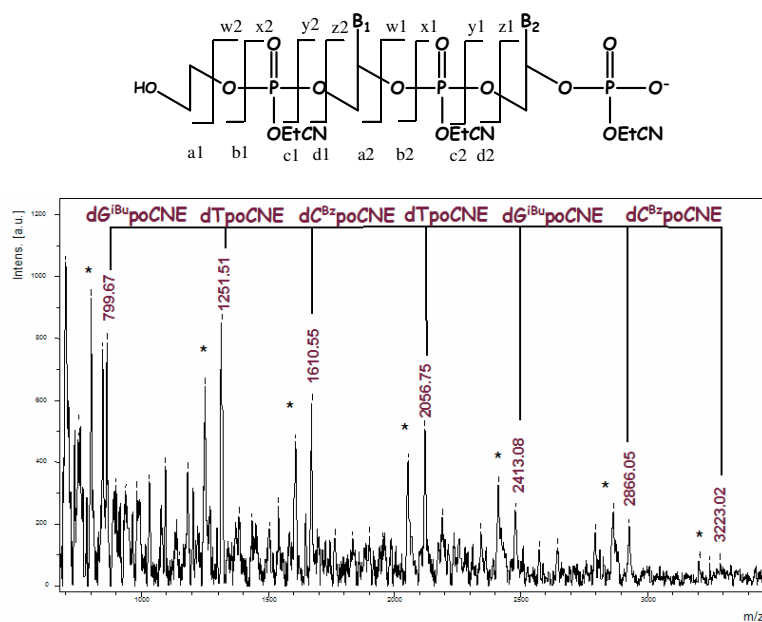
Postanowiłam samodzielnie sprawdzić podatność fosforanotriestrów oligonukleotydów na fragmentację i ewentualnie wykorzystać ten fakt do opracowania metody sekwencjonowania elementów oligonukleotydowych bibliotek kombinatorycznych. Pierwotny plan obejmował syntezę biblioteki oligonukleotydowej, której elementy byłyby trwale związane z podłożem. W następnym etapie miało nastąpić odblokowanie oligonukleotydów, w celu

przeprowadzenia selekcji aktywnych elementów biblioteki oraz wtórne blokowanie grup fosforanowych za pomocą diazometanu. Diazometan powoduje niespecyficzne metylowanie DNA. Ulegają mu, zatem zarówno reszty fosforanowe, jak i atomy N-7 oraz C-3 guanozyny [190-192]. Otrzymane w wyniku metylowania fosforanotriestry oligonukleotydów miałam zamiar następnie poddać analizie MALDI. Różnice mas pomiędzy sygnałami pochodzącymi od powstałych w warunkach analizy jonów fragmentarycznych mogłyby posłużyć do odczytania sekwencji.

Przeprowadziłam zautomatyzowaną syntezę nonameru o sekwencji 5'-d(CTG TCT GCC)-3' (**OTF**) na komercyjnie dostępnym podłożu typu CPG. Po wyjęciu podłoża z kolumnienki, bez stosowania procedur mających na celu usunięcie grup ochronnych oligonukleotydu, sporządziłam zawiesinę podłoża w wodzie. Następnie mieszałam tę zawiesinę z matrycą i naniosłam na płytkę analityczną MALDI. Początkowo jako matrycy użyłam kwasu 3-hydroksypikolinowego (HPA). Jest to powszechnie stosowana matryca do analizy oligonukleotydów za pomocą spektrometrii mas MALDI. Nie udało się jednakże z jej pomocą otrzymać widma oligonukleotydu. Zamierzony efekt osiągnęłam po zmianie matrycy na 2,4,6-trihydroksyaceton (THAP). HPA uważana jest za matrycę „zimną”, ponieważ nie przyczynia się do fragmentacji oligonukleotydów [164]. Tymczasem, zarówno 2,4,6-trihydroksyaceton (2,4,6-THAP), jak i jego izomer 2,3,4-THAP, promują fragmentację oligonukleotydów w źródle jonów [189]. Obie matryce: HPA i THAP charakteryzuje zbliżone powinowactwo do protonu (ang. *proton affinity*) [193], a także zasadowość w fazie gazowej [194] (**Część II; Tabela 1**). Różnice w ich działaniu wynikają więc prawdopodobnie z różnej dystrybucji energii pomiędzy jonami matrycy i analitu.

W wyniku analizy MALDI w pełni blokowanego oligonukleotydu **OTF**, połączonego z podłożem poprzez łącznik sukcyńlowy, otrzymałam widmo, które zamieszczam na następnej stronie (**Rys. 29**). Przedstawia ono tylko środkowy fragment sekwencji oligonukleotydu. Oligonukleotyd jest trwale, w warunkach analizy MALDI, zakotwiczony na ziarnie podłoża. W widmie widoczny jest więc dopiero drugi w kolejności nukleotyd od 3'-końca. Sygnały pochodzące od dwóch ostatnich nukleotydów od końca 5' występują w rejonie pików pochodzących od matrycy, co powoduje trudności w ich wyodrębnieniu.

Fragmentacja zachodzi w kierunku 5'→3', ponieważ pierwszy nukleotyd od strony 3'-końca oligonukleotydu jest trwale zakotwiczony na podłożu. Uwalnianie fragmentów oligonukleotydu następuje stopniowo od strony jego wolnego 5'-końca. Sekwencję oligonukleotydu można odczytać z widma w kierunku 5'→3' (od strony lewej do prawej widma), na podstawie różnic mas pomiędzy sąsiednimi sygnałami odpowiadającymi masom kolejnych nukleotydów.



Rys. 29. Schemat fragmentacji blokowanego oligonukleotydu oraz widmo MALDI w pełni blokowanego nonameru [5'-d(CTG TCT GCC)-3']. Gwiazdkami oznaczone są sygnały pochodzące od fragmentów powstałych w wyniku odłączenia grup cyanoetylowych.

Brakującą informację o pierwszym nukleotydzie z 3'-końca oligonukleotydu łatwo uzupełnić, wprowadzając łącznik fotolabilny, kotwiczący oligonukleotyd na podłożu. Jako źródło energii/ionizacji w spektrometrze mas MALDI zastosowano laser azotowy, który emituje promieniowanie ultrafioletowe o długości 337nm. Większość światłoczułych łączników jest wrażliwa na działanie promieniowania w zakresie 300-400nm [195-200]. Podczas bezpośredniej analizy oligonukleotydu, zakotwiczonego na podłożu za pomocą takiego fotolabilnego połączenia, wiązka promieniowania powinna uwolnić oligonukleotyd pełnej długości i ewentualne jego fragmenty. Użycie fotolabilnego łącznika ma tę zaletę, że podczas analizy MALDI następuje jednoczesne odłączenie oligonukleotydu od podłoża i jego jonizacja. Inaczej niż w przypadku chemicznego uwolnienia substancji z podłoża, nie wprowadza się do badanej substancji zanieczyszczeń, które mogą utrudniać analizę.

Postanowiłam wybrać odpowiedni łącznik fotolabilny, przeprowadzić jego syntezę i zbadać właściwości tego układu pod kątem wykorzystania w metodzie sekwencjonowania oligonukleotydów bibliotek kombinatorycznych. Zastanawiając się nad wyborem odpowiedniej do tego celu cząsteczki i przeglądając publikacje na ten temat, odszukałam kilka prac dotyczących bezpośredniej analizy MALDI cząsteczek związanych z podłożem [109, 111, 113-115]. Dwie spośród nich dotyczyły analizy MALDI oligonukleotydów połączonych z ziarnem podłoża poprzez łącznik o szkielecie *o*-nitrobenzylowym [114, 115].

4. Synteza i badanie właściwości „fotolabilnego podłoża”

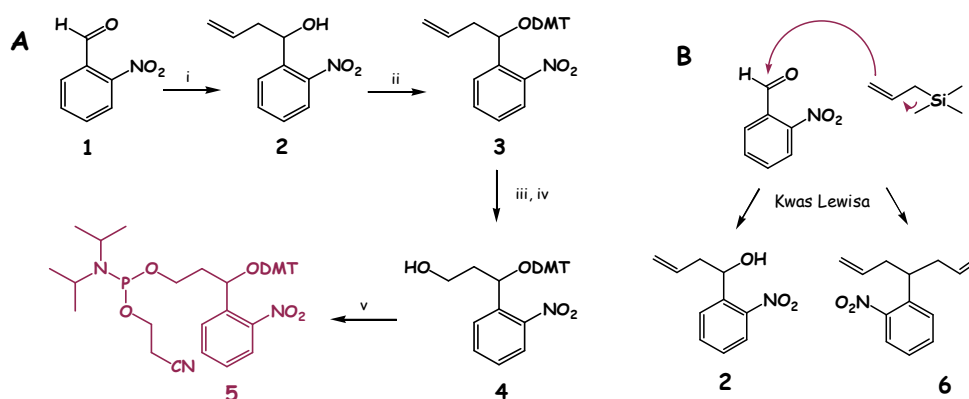
4.1. Synteza i zastosowanie łącznika Raynera

Najpierw przeprowadziłam syntezę łącznika opisanego już w literaturze [114, 201]. Schemat jego syntezy opiera się na przekształceniach 1-(*o*-nitrofenylo)but-3-en-1-olu (**2**) (Schemat 3A). Do otrzymania tego związku wykorzystałam handlowo dostępny *o*-nitrobenzaldehyd (**1**) oraz alilotrimetylosilan. Reakcję prowadziłam w obecności czterochlorku tytanu, który odgrywa rolę katalizatora kwasowego. Reakcje związków karbonylowych z alilosilanami w obecności kwasów Lewisa są szybkie i wydajne [202]. Addycja grupy alilowej do grupy karbonylowej jest regiospecyficzna. Tworzenie wiązania węgiel-węgiel zachodzi wyłącznie z udziałem atomu węgla γ alilosilanu (Schemat 3B). Jako medium reakcyjne stosowałam bezwodny nitrometan. Zachowanie bezwodnych warunków jest istotne, ponieważ czterochlorek tytanu w obecności wody ulega silnie egzotermicznej reakcji hydrolizy z wytworzeniem chlorowodoru. Próby zastosowania innych, mniej toksycznych, katalizatorów reakcji, FeCl_3 [203], czy I_2 [204], nie przyniosły zadowalających rezultatów. W obu wypadkach wydajności pożądanego produktu były niskie. W oryginalnej pracy [202] stosowano 2 równoważniki molowe czterochlorku tytanu w stosunku do aldehydu. Ilość tę zredukowałam do jednego równoważnika, zachowując wysokie wydajności reakcji. Reakcję prowadziłam w łaźni lodowej w temperaturze -20°C . Proces jest bardzo szybki. Za pomocą chromatografii cienkowarstwowej obserwowałam całkowity zanik substratu po upływie około 5 minut. Utrzymanie temperatury bliskiej -20°C jest istotne, ponieważ po podwyższeniu temperatury do -10°C proces stawał się tak szybki, że niemożliwa była jego kontrola. Poza tym, prowadził głównie do tworzenia niepożądanego produktu, 1-(1-allylo-3-butenylo)-*o*-nitrobenzenu (**6**). Produkty reakcji **2** i **6** rozdzieliłam chromatograficznie, a ich strukturę potwierdziłam za pomocą analizy NMR.

Pochodną 1-(*o*-nitrofenylo)but-3-en-1-olu (**2**) w postaci amidofosforynu miałam zamiar użyć w zautomatyzowanej syntezie oligonukleotydu, dlatego do blokady jego funkcji hydroksylowej użyłam chlorku 4,4'-dimetoksytrytylu. Konieczne było zastosowanie dużych nadmiarów molowych chlorku 4,4'-dimetoksytrytylu (3 ekwiwalenty), ze względu na niższą reaktywność drugorzędowej grupy hydroksylowej w stosunku do pierwszorzędowej. Użyłam również katalizatora nukleofilowego – DMAP, wraz z trietyloaminą. Mimo to wydajność reakcji po oczyszczeniu była średnia (około 58%).

1-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-1-(*o*-nitrofenylo)-but-3-en-1-ol (**3**) poddałam następnie dwustopniowej reakcji utlenienia. W pierwszym etapie przeprowadziłam hydroksylowanie nienasyconego łańcucha węglowego przy użyciu czterotlenku osmu. Otrzymany w ten sposób

układ *cis*-diolowy utleniałam za pomocą nadjodanu sodu do aldehydu [205], którego nie izolowałam, lecz bezpośrednio poddawałam redukcji borowodorkiem sodu do 1-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-1-(*o*-nitrofenylo)-1,3-propanodiolu (**4**) [206]. Niska wydajność reakcji utlenienia (50%) związana była z obniżaniem pH mieszaniny reakcyjnej w trakcie jej trwania. Podczas reakcji utlenienia za pomocą NaIO₄ generowany jest mocny kwas jodowy, którego obecność powoduje zakwaszenie środowiska reakcji. Prowadziło to do odblokowania funkcji hydroksylowej związku (**3**) i powstania 1-(*o*-nitrofenylo)-1,3-propanodiolu, którego obecność obserwowałam na płycie TLC. Zastosowanie buforu fosforanowego (pH 7), w celu neutralizacji powstającego kwasu jodowego, poprawiło tylko nieznacznie wydajność reakcji (60%). 1-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-1-(*o*-nitrofenylo)-1,3-propanodiol (**4**) przeprowadziłam następnie w amidofosforyn **5** według standardowej procedury [207].



Schemat 3. A: i) alilotrimetylosilan, TiCl₄, CH₃NO₂; ii) chlorek 4,4'-dimetoksytrytylu, DMAP, Et₃N, Py; iii) OsO₄, NaIO₄, THF/H₂O; iv) NaBH₄, THF/H₂O; v) bis(diizopropylamino)-(2-cyanoetylo)fosfina, tioetylotetrazol, CH₂Cl₂; B: mechanizm i produkty alilowania.

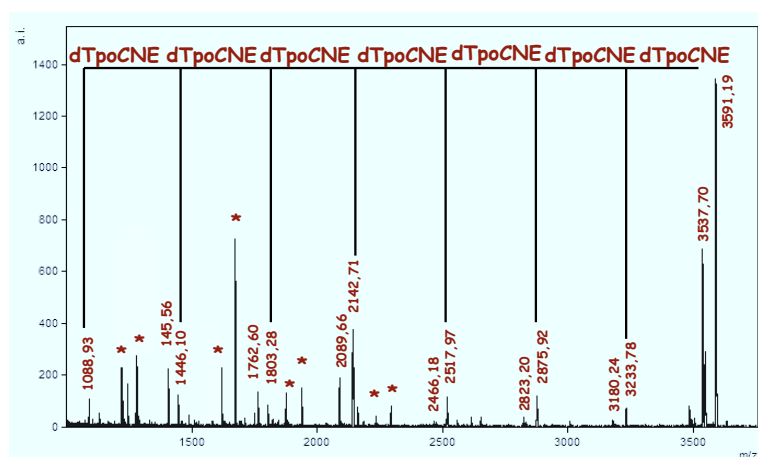
4.1.1. Analiza MALDI-TOF fosfotriestrów oligonukleotydów związanych z podłożem poprzez łącznik fotolabilny

Przed użyciem otrzymanego 3-amidofosforynu 1-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-1-(*o*-nitrofenylo)-1,3-propanodiolu (**5**) w automatycznej syntezie oligonukleotydu, porównałam jego reaktywność z reaktywnością 3'-amidofosforynu tymidyny w stosunku do sfunkcjonalizowanego grupami propylaminowymi podłoża CPG. Przygotowałam roztwory obu amidofosforynów w acetonitrylu, następnie dodałam etylotiotetrazol i użyłam w reakcji z odważonymi ilościami podłoża. Po utlenieniu i dokładnym przemyciu obu podłoży porównałam ich stopień załadowania. Wartości te oznaczyłam na podstawie absorbancji uwolnionej grupy dimetoksytrytylowej. Wartości absorbancji były nieznacznie niższe dla

podłoża załadowanego łącznikiem fotolabilnym w porównaniu do tymidyny ($Z_{LF} = 25\text{-}30\mu\text{mol/g}$, $Z_{dT} = \sim 40\mu\text{mol/g}$).

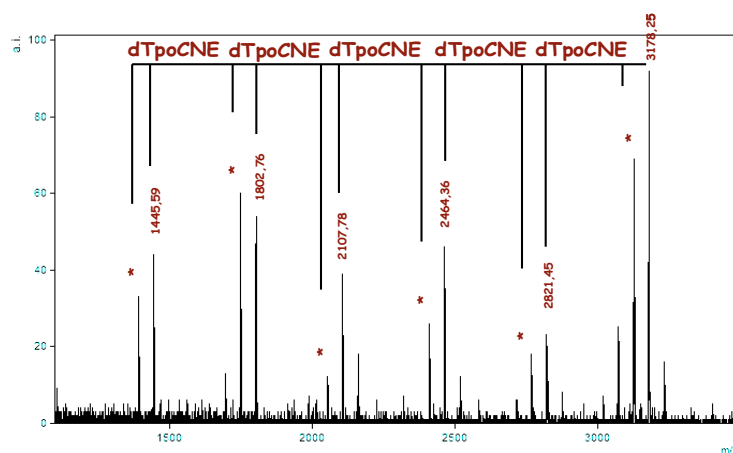
Roztwór 3-amidofosforynu 1-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-1-(*o*-nitrofenylo)-1,3-propanodiolu (**5**) w acetonitrylu (0,1M) użyłam w automatycznej syntezie oligonukleotydów w warunkach stosowanych dla standardowych amidofosforynów nukleozydów, z niewielką modyfikacją cyklu syntetycznego. Wydłużyłam czas przyłączenia łącznika do podłoża, acetylowania oraz utlenienia. Kolumnienka wypełniona była podłożem typu CPG sfunkcjonalizowanym grupami propyloaminowymi.

Zsyntezowałam następnie oligonukleotyd o sekwencji, 5'-d(TTT TTT TTT T)-3', (**CPG-T10**). Po wyładowaniu podłoża z kolumnienki, jego część zawiesiłam w mieszaninie acetonitryl/woda (9:1) i naświetlałam promieniowaniem o długości 357nm przez około pół godziny. Po upływie tego czasu wykonałam analizę MALDI roztworu zebranego z podłoża. W widmie, oprócz spodziewanej serii sygnałów będących wynikiem fragmentacji blokowanego oligonukleotydu, pojawiły się sygnały pochodzące prawdopodobnie od oligonukleotydu z częściowo odblokowanymi funkcjami fosforanowymi (**Rys. 30**).



Rys. 30. Widmo MALDI blokowanego oligonukleotydu **CPG-T10** odłączonego z podłoża w wyniku naświetlania promieniowaniem UV. Gwiazdkami oznaczona jest seria sygnałów pochodzących od oligonukleotydu i jego fragmentów z częściowo odblokowanymi funkcjami fosforanowymi.

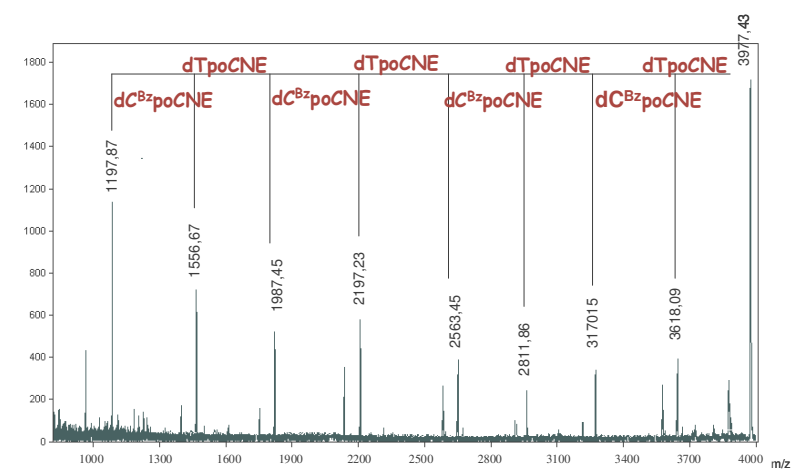
Drugą część podłoża zawiesiłam w wodzie, z otrzymanej wodnej zawiesiny pobrałam kilka ziaren podłoża **CPG-T10**, zmieszałam z roztworem matrycy i nałożyłam na płytkę MALDI. W wyniku analizy otrzymałam widmo, w którym obserwowałam serię sygnałów pochodzących od jonu macierzystego oraz jonów fragmentarycznych (**Rys. 31**). Wszystkie sygnały obecne w widmie pochodzą od oligonukleotydów niosących fosforan na 3'-końcu.



Rys. 31. Widmo MALDI-TOF blokowanego oligonukleotydu **CPG-T10**, gwiazdkami oznaczone są fragmenty powstałe w wyniku odłączenia grup cyanoetylowych.

Obserwowane w obu widmach sygnały przedstawiają fragment sekwencji dekameru **CPG-T10**, wyłączając trzy pierwsze nukleotydy. Podczas analizy MALDI oligonukleotydu związanego z pziarnem podłoża poprzez łącznik fotolabilny następuje jego odłączenie od podłoża i jonizacja wraz z równoczesną fragmentacją. Zastanawiało mnie jednak czy sekwencję oligomeru w widmie można odczytać w tym samym, czy też odwrotnym kierunku, niż podczas wymuszonej fragmentacji oligomeru trwale związanego z podłożem. Na podstawie analizy homogennej sekwencji nie mogłam jednak tego problemu rozstrzygnąć.

Przeprowadziłam więc syntezę oligonukleotydu o sekwencji naprzemiennej 5'-d(CTC TCT CTC T)-3', (**CT10**). W pełni blokowany, związany z podłożem poprzez łącznik fotolabilny oligonukleotyd poddałam analizie MALDI. Uzyskane widmo przedstawiłam na rysunku poniżej (**Rys. 32**).



Rys. 32. Widmo MALDI blokowanego oligomeru **CT10**.

Sekwencja oligonukleotydu została skonstruowana tak, by na obu jej końcach znalazł się inny nukleotyd, na 5'-końcu – cytydyna (289Da), na 3'-końcu – tymidyna (305Da).

Obliczona na podstawie uzyskanego widma różnica mas pomiędzy dwoma ostatnimi sygnałami obecnymi w widmie odpowiada masie tymidyny. Na tej podstawie stwierdziłam, że sekwencję oligonukleotydu można odczytać w kierunku 5'→3'. Obojętnie więc, czy oligonukleotyd jest związany z podłożem trwale, czy poprzez łącznik fotolabilny jego fragmentacja zachodzi w tym samym kierunku.

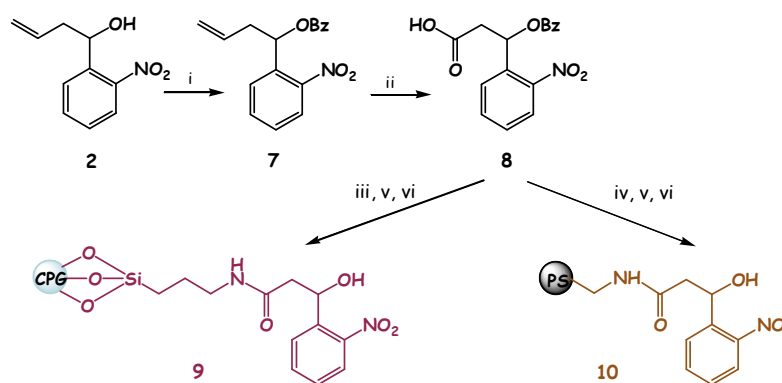
Łącznik fotolabilny spełnił swoje zadanie. Na podstawie wykonanych doświadczeń stwierdziłam, że pochodna *o*-nitrobenzylowa jest związkiem odpowiednim do wykorzystania jako łącznik w automatycznej syntezie oligonukleotydów, a także do bezpośredniej analizy MALDI jej produktów. Ilość materiału uwalniana z jednego ziarna podłoża jest wystarczająca, aby otrzymać widmo dobrej jakości (stosunek sygnału do szumu). W widmie wzdłuż całego zakresu mas oligonukleotydu obserwowałam sygnały pochodzące od jonów fragmentarycznych niosących fosforan na 3'-końcu.

Niedogodnością, związaną ze stosowaniem łącznika w formie amidofosforanu, jest konieczność każdorazowego przygotowania podłoża przed syntezą, a także modyfikacji cyklu syntetycznego. Taka procedura może być przyczyną różnic w stopniu załadowania podłoża łącznikiem w zależności od przebiegu syntezy. Aby uniknąć tego typu problemów, postanowiłam przygotować „fotolabilne podłoże”. W tym celu należało przeprowadzić syntezę takiego fotolabilnego łącznika, który następnie mogłabym trwale połączyć z podłożem.

4.2. Synteza i badanie właściwości „fotolabilnego podłoża”

Fotolabilny łącznik oparty na strukturze alkoholu *o*-nitrobenzylowego, sprawdził się podczas bezpośredniej analizy MALDI oligonukleotydu związanego z podłożem. Postanowiłam wykorzystać go do dalszych badań, zmieniając jedynie budowę łańcucha bocznego związku. Pierwszy etap syntezy, prowadzący do otrzymania 1-*o*-nitrofenylo-3-butenolu (**2**) przeprowadziłam jak poprzednio (**Schemat 3A**). Zastosowałam w tym celu alilotrimetylosilan wraz z czterochlorkiem tytanu. Niewygodną i labilną grupę 4,4'-dimetoksytrytylową zastąpiłam stabilną w warunkach reakcji utlenienia grupą benzoilową. Następnie przeprowadziłam reakcję utlenienia wiązania podwójnego 1-*O*-benzoilo-1-(*o*-nitrofenylo)but-3-en-1-olu (**7**) za pomocą nadmanganianu potasu, z użyciem eteru 18-korona-6 jako katalizatora przeniesienia fazowego [208, 209]. Proces biegnie poprzez wytworzenie wicynalnego diolu, rozerwanie wiązania pomiędzy atomami C3-C4, do otrzymania kwasu 3-benzoiloksy-3-(*o*-nitrofenylo)propanowego (**8**). Wydajność reakcji wyniosła 43%, ale wydajność całkowita procesu, w stosunku do wyjściowego

substratu, *o*-nitrobenzaldehydu, tylko 25%. Postanowiłam zastosować inną procedurę. Proces utlenienia ostatecznie przeprowadziłam z użyciem nadmanganianu potasu i nadjodanu sodu, uzyskując dobrą wydajność (powyżej 80%) [210]. Ten znaczący wzrost wydajności reakcji utlenienia tłumaczę obecnością nadjodanu, który wspomaga działanie nadmanganianu na etapie rozszczepienia układu *cis*-diolowego. Następnie łącznik **8** poddałam reakcji kondensacji z funkcjonalizowanym podłożem (Schemat 4). Do syntezy „podłoża fotolabilnego” użyłam zarówno podłoża CPG, jak i wysoce usieciowanego podłoża polistyrenowego (10% diwinylobenzenu).

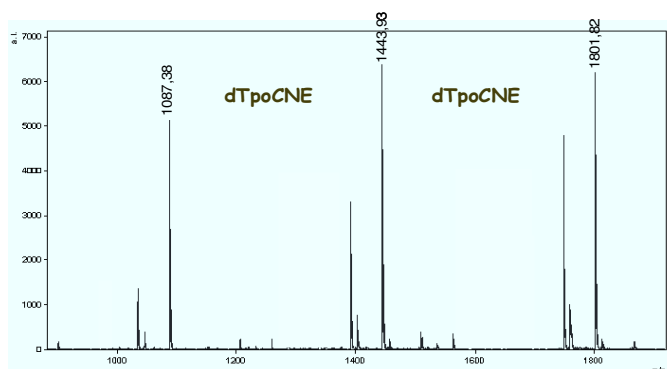


Schemat 4. i) chlorek benzoilu, Py; ii) KMnO_4 , NaIO_4 , $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$; iii) CPG, DCC, DMAP, Et_3N , CH_2Cl_2 ; iv) PS, DCC, DMAP, Et_3N , CH_2Cl_2 ; v) Ac_2O , *N*-metyloimidazol, 2,6-lutydyna, MeCN; vi) NH_3 aq.

Podłoża typu CPG są komercyjnie dostępne i szeroko używane w syntezie kwasów nukleinowych. Jednakże od lat w Pracowni Chemii Biokoniugatów do syntezy bibliotek kombinatorycznych stosowane jest podłoże polistyrenowe (PS). Wyboru takiego dokonano już na wstępie badań rozproszonych bibliotek oligonukleotydowych. Powodem był szereg niepożądanych właściwości podłoży typu CPG. Jednym z nich jest niewystarczająca trwałość wiązania pomiędzy łącznikiem, a podłożem silikażelowym [211]. Połączenie to musi być trwałe, zdolne do przetrwania silnie zasadowych warunków, ponieważ, zgodnie z moim założeniem, oligomer w trakcie odblokowania musi pozostać związany z podłożem. Dopiero bezpośrednio przed lub podczas analizy MALDI powinno być możliwe jego proste i wydajne odłączenie od podłoża. Innym, równie ważnym, powodem wyboru podłoży polistyrenowych jest regularny kształt oraz ściśle określona wielkość ich ziaren. Ta zaleta jest istotna z dwóch przyczyn. Ułatwia manipulację podłożem oraz zapewnia, że na każdym ziarnie podłoża zgromadzona będzie podobna ilość oligonukleotydu.

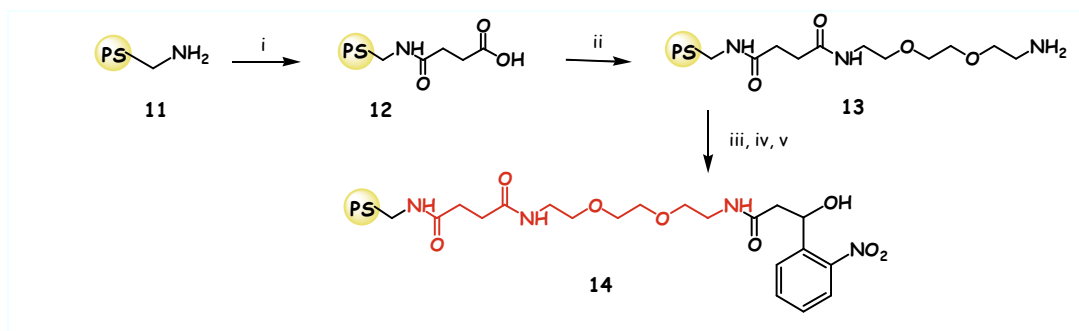
4.2.1. Opracowanie warunków analizy MALDI fosforanotriestrów oligonukleotydów związanych z „podłożem fotoloabilnym”

Następnie podłożach **9** i **10** zsyntezowałam oligonukleotydy o sekwencji 5'-d(TTT TT)-3' (**T5**) i 5'-d(TTT TTT TTT T)-3' (**T10**). Po skończonej syntezie wyjęłam podłoże z kolumnienki, zawiesiłam w wodzie, a następnie poddałam bezpośrednio analizie MALDI. Dla obu blokowanych oligonukleotydów związanych z podłożem CPG (**CPG-T10** i **CPG-T5**) otrzymałam spodziewany obraz w widmie. W przypadku pentameru związanego z podłożem polistyrenowym (**PS-T5**) również uzyskałam serię sygnałów pochodzących od jonu pierwotnego i jonów potomnych oligonukleotydu (**Rys. 33**). Nie udało mi się jednakże otrzymać przewidywanego widma oligomeru **PS-T10**. W widmie pojawiały się wyłącznie sygnały pochodzące od krótkich fragmentów oligonukleotydu, których masy nie przekraczały 1800Da.



Rys. 33. Widmo MALDI blokowanego oligonukleotydu **PS-T5**.

Na obu podłożach centrum reakcji fotochemicznej znajdowało się w różnej odległości od jego powierzchni (**Schemat 4**). Wysnułam stąd wniosek, że oligonukleotyd może znajdować się zbyt blisko powierzchni podłoża polistyrenowego, a zaistniały problem związany jest z zawadą steryczną i nieefektywnym oddziaływaniem promieniowania z łącznikiem. Postanowiłam pokonać ten problem „odsuwając” centrum reakcji od powierzchni podłoża. W układzie spełniającym tę rolę zastosowałam 2,2'-(etylenodioksy)-bis(etyloaminę) (**Schemat 5**). Pochodne glikolu etylenowego mają tendencję do przyjmowania w roztworach wodnych konformacji rozwiniętej [212, 213]. 2,2'-(Etylenodioksy)-bis(etyloamina) miała pełnić więc rolę „wysięgніка” podczas analizy oligonukleotydu odbywającej się w środowisku wodnym.



Schemat 5. i) bezwodnik kwasu bursztynowego, Et₃N, CH₂Cl₂; ii) 2,2'-(etylenodioksy)-bis(etyloamina), DCC, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂; iii) **8**, DCC, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂; iv) Ac₂O, N-metyloimidazol, 2,6-lutydyna, MeCN; v) NH₃ aq.

Na podłożu fotolabilnym **14** ponownie zsyntezowałam oligonukleotyd **T10**, który poddałam analizie MALDI. Niestety, pomimo zastosowania dłuższego łącznika, w dalszym ciągu nie obserwowałam w widmie sygnałów w rejonie mas wyższych od 1800Da. Sterowanie parametrami analizy MALDI (napięcie, częstotliwość, polaryzacja pola elektrycznego, moc lasera) również nie przyniosło poprawy obrazu widma.

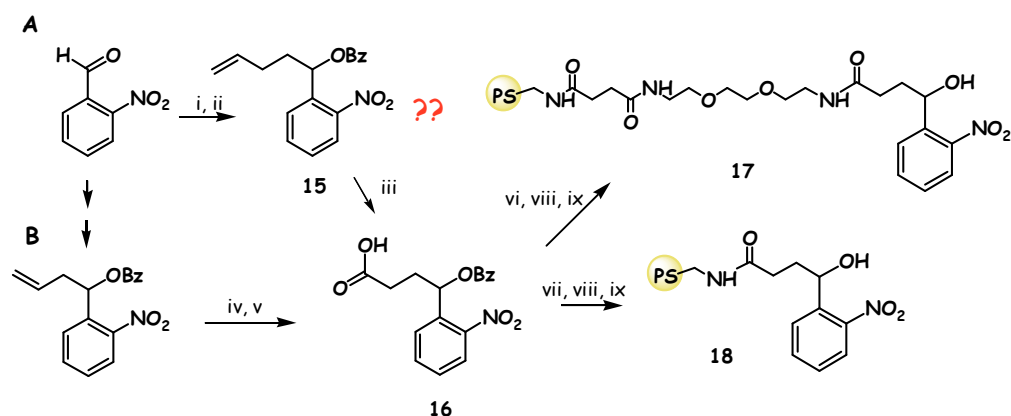
Postanowiłam przeanalizować warunki stosowane podczas przygotowania próbki do analizy. Rozpoczęłam od zmiany rozpuszczalnika na mniej polarny od wody. Wybrałam acetonitryl z dwóch względów. Po pierwsze, jest to dla blokowanego oligomeru „naturalne” środowisko, w nim biegnie synteza oligonukleotydu. Drugim powodem było wcześniej przeprowadzone doświadczenie, w którym w pełni blokowany oligonukleotyd **PS-T10** poddałam działaniu promieniowania ultrafioletowego w mieszaninie acetonitryl/woda w stosunku objętościowym 9:1 [114]. W wyniku naświetlania następowało odłączenie oligonukleotydu od podłoża, co potwierdziła analiza MALDI roztworu zebranego z podłoża (**Rys. 30**). Zmieniłam rozpuszczalnik stosowany podczas analizy MALDI blokowanego oligonukleotydu połączonego z podłożem łącznikiem fotolabilnym na acetonitryl. Pozwoliło to na otrzymanie w widmie spodziewanej serii sygnałów (analogiczną do przedstawionej na **Rys. 31**).

Taki wynik doświadczenia tłumaczę hydrofobowymi oddziaływaniami pomiędzy blokowanym oligonukleotydem a podłożem polistyrenowym. Oddziaływania te wzmacniają się w bardzo polarnych rozpuszczalnikach, takich jak woda. Blokowany oligonukleotyd prawdopodobnie „zakleja” powierzchnię ziarna podłoża, utrudniając promieniowaniu emitowanemu przez laser dotarcie zarówno do oligonukleotydu, jak i do łącznika fotolabilnego. Przypuszczalnie promieniowanie jest absorbowane przez zasady nukleinowe i rozprasza się w układach wiązań π. Innym wytłumaczeniem może być brak efektywnego oddziaływania cząsteczek matrycy z oligonukleotydem. W aprotycznym i mniej polarnym od

wody rozpuszczalniku, jakim jest acetonitryl, hydrofobowe oddziaływania blokowanego oligonukleotydu z podłożem prawdopodobnie zostają zaburzone.

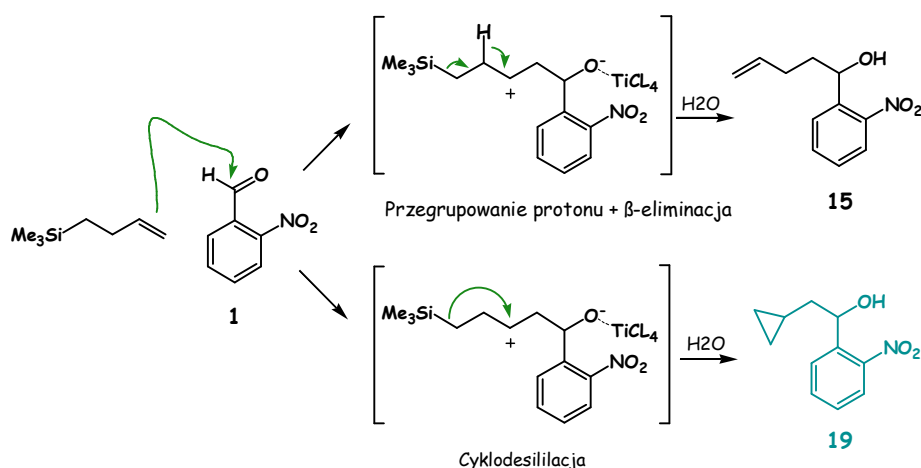
Następnym krokiem było odblokowanie oligonukleotydu za pomocą roztworu amoniaku w 55°C, przez noc. Niestety, w tych warunkach praktycznie cały materiał ulegał odłączeniu od podłoża. W celu sprawdzenia czy jakaś część oligonukleotydu pozostała związana z podłożem, przemyłam je i poddałam naświetlaniu promieniowaniem UV. Ponowna analiza MALDI roztworu zebranego z podłoża nie wykazała obecności oligonukleotydu w roztworze. Zastanawiając się nad przyczyną tego niespodziewanego wyniku, wykluczyłam nietrwałość wiązania fosfodiesterowego łączącego układ *o*-nitrobenzylowy z oligonukleotydem, ponieważ nie powinna ona odbiegać od trwałości tego typu połączeń w oligonukleotydzie. Za powód uznałam katalizowaną zasadą β -eliminację, której może podlegać zsyntetyzowany przeze mnie układ łącznika [214].

Problem nietrwałości łącznika w warunkach zasadowych mogło rozwiązać wydłużenie łańcucha węglowego układu. Konceptyjnie najprostszym sposobem wydawało się użycie 3-butenylotrimetylosilanu zamiast, jak dotąd, alilotrimetylosilanu. Reakcję przeprowadziłam w takich samych warunkach jak poprzednio, stosując jako katalizator czterochlorek tytanu w nitrometanie, w temperaturze -20°C (4.1). Następnie grupę hydroksylową 1-(*o*-nitrofenylo)pent-4-en-1-olu zablokowałam chlorkiem benzoilu i przeprowadziłam utlenianie wiązania podwójnego za pomocą nadmanganianu potasu i nadjodanu sodu (Schemat 6A). Jednakże, niezależnie od stosowanego nadmiaru utleniaczy i wydłużania czasu reakcji, analiza TLC wskazywała tylko około połowiczne przekształcenie substratu w kwas.



Schemat 6. A: i) 3-butenylotrimetylosilan, TiCl_4 , CH_2NO_2 ; ii) BzCl , Py ; iii) KMnO_4 , NaIO_4 , $t\text{-BuOH}/\text{H}_2\text{O}$; B: iv) $\text{BH}_3^*\text{Me}_2\text{S}$, CH_2Cl_2 ; v) $\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, H_2SO_4 , H_2O ; vi) **13**, DCC , Et_3N , DMAP , CH_2Cl_2 ; vii) **11**, DCC , Et_3N , DMAP , CH_2Cl_2 ; viii) Ac_2O , *N*-metyloimidazol, 2,6-lutydyna, MeCN ; ix) NH_3 aq.

Już od pierwszego etapu, na podstawie analizy widm NMR stwierdziłam, że w wyniku reakcji aldehydu *o*-nitrobenzylowego z 3-butenylotrimetylosilanem powstaje mieszanina związków. Substancje te były jednak nierozróżnialne chromatograficznie i dopiero po etapie utlenienia mogłam wydzielić związek pozostający w niezmienionej formie. Oczyszcziłam substancję nieulegającą utlenieniu i poddałam analizie jej widma ^1H i ^{13}C NMR. Stwierdziłam, że brak w nich sygnałów pochodzących od ugrupowania winylowego. To tłumaczyło dlaczego związek nie ulegał utlenieniu w zastosowanych warunkach. Widoczne były natomiast sygnały w wyższych rejonach widma świadczące o tym, że w łańcuchu bocznym związku występuje układ wiązań nasyconych. Na trop prowadzący do rozwiązania zagadki naprowadziły mnie poszukiwania literaturowe. W późnych latach 70 zeszłego wieku prowadzono badania nad reakcjami 3-butenylosilanów z chlorkami kwasowymi w obecności kwasów Lewisa. Stwierdzono wówczas, że prowadzą one do otrzymania ketonów cyklopropylometrylowych [215]. Stało się oczywiste, że z podobną sytuacją mam do czynienia w rozpatrywanym przypadku. Mechanizmy reakcji prowadzące do powstania alternatywnych produktów desililacji przedstawiam na następnej stronie (**Rys. 34**).



Rys. 34. Mechanizm desililacji.

Wydajność całkowita procesu otrzymywania kwasu 4-benzoiloksy-4-(*o*-nitrofenylo)-butanowego (**16**) wyniosła około 30%. Postanowiłam opracować wydajniejszą metodę syntezy. Mimo napotkanych problemów nie chciałam jednak rezygnować z obranej i szukać zupełnie nowej drogi syntetycznej prowadzącej do otrzymania pożądanego związku. Postanowiłam wykorzystać w tym celu reakcję hydroborowania połączonego z hydrolizą w warunkach utleniających. Reakcja hydroborowania związków nienasyconych przebiega według mechanizmu niezgodnego z regułą Markownikowa. Utlenianie otrzymanego w jej wyniku boranu prowadzi do utworzenia 1° alkoholu, a w odpowiednich warunkach kwasu. Do redukcji wiązania podwójnego użyłam kompleksu boranu z dimetylosiarczkiem. Produktu

reakcji nie izolowałam, lecz bezpośrednio podałam go reakcji hydrolizy w warunkach utleniających. Użyłam do tego celu dichromianu potasu w obecności stężonego kwasu siarkowego (VI) (**Schemat 6B**). Wydajność reakcji wyniosła 75%. Produkt wyizolowałam i scharakteryzowałam za pomocą analizy NMR.

Następnie zsyntetyzowałam „podłoża fotolabilne”. Użyłam dwóch wersji modyfikowanego podłoża polistyrenowego **11** i **13** (**Schemat 6B**). Następnie oba podłoża użyłam w automatycznej syntezie oligonukleotydu 5'-d(TTT TTT TTT T)-3' (**T10**). Podłoże **18** wykazywało nieco wyższy stopień załadowania od podłoża **17**. W obu przypadkach stwierdziłam dobrą wydajność syntezy oligonukleotydu i nie zaobserwowałam żadnych nieprawidłowości w jej przebiegu. W kolejnych doświadczeniach korzystałam z „fotolabilnego podłoża” typu **18**. Jego przygotowanie wymaga mniejszego nakładu czasu i pracy, a zmniejszenie ilości etapów reakcji prowadzonych na podłożu stałym pozwoliło na lepszą kontrolę stopnia jego załadowania.

4.2.3. Warunki odblokowania oligonukleotydu związanego z „podłożem fotolabilnym”

Oligomer **PS-T10** poddałam odblokowaniu w standardowych warunkach i ponownie stwierdziłam, że cały materiał znajduje się w roztworze. Tym razem nie udało mi się znaleźć prostego wyjaśnienia tego niespodziewanego wyniku. Przekonana, tak o trwałości wiązania fosfodiesterowego, jak i amidowego, zaczęłam podejrzewać, że te zaskakujące rezultaty spowodowane są, nie tyle nietrwałością chemiczną, co fotochemicznymi własnościami wybranego przeze mnie układu.

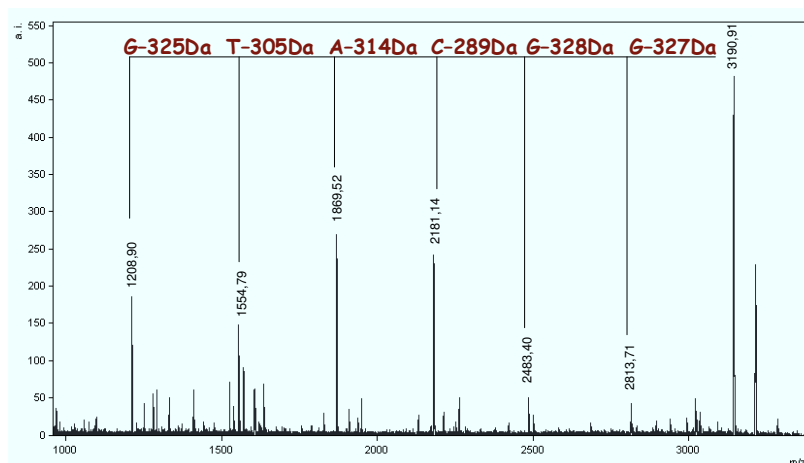
Postanowiłam wypróbować łagodniejsze warunki odblokowania. Trietyloamina jest zasadą słabszą od amoniaku, ale wystarczająco dobrą, aby na drodze β -eliminacji usunąć grupy cyjanoetylowe z reszt fosforanowych [216]. Potraktowałam więc związany z podłożem blokowany oligonukleotyd 10%-owym roztworem Et_3N w pirydynie. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą MALDI. Pełne odblokowanie funkcji fosforanowych oligonukleotydu uzyskałam po upływie 10h. W tych warunkach nie następowało uwolnienie oligonukleotydu do roztworu. Praktycznie cały materiał pozostawał związany z podłożem. Zachęciło mnie to do poszukiwania takich warunków, które prowadziłyby również do odblokowania pozostałych grup funkcyjnych oligonukleotydu [217, 218]. Zsyntetyzowałam oligonukleotyd o sekwencji mieszanej 5'-d(GGC ATG CAA G)-3' (**ARM**). Po 12h (55°C) działania na oligonukleotyd połączony z podłożem poprzez łącznik fotolabilny następowało uwolnienie praktycznie całej ilości oligonukleotydu do roztworu. Redukowałam więc stopniowo czas wystawienia oligonukleotydu na działanie amoniaku. Stwierdziłam, że po

upływie 2h następuje usunięcie wszystkich grup ochronnych oligonukleotydu, przy czym większa jego część pozostaje związana z podłożem (**Rys. 35**). Tylko niewielkie ilości oligonukleotydu zostają w tych warunkach uwolnione do roztworu.

Tabela 2. Warunki analizy i odblokowania oligonukleotydu związanego z podłożem łącznikiem fotolabilnym.

Nieodblokowany	PS-oligonukleotydy	Bezpośrednio MALDI (MeCN:H ₂ O)	UV → MALDI
	CPG-oligonukleotydy	Bezpośrednio MALDI (H ₂ O)	
Odblokowany	Et ₃ N/Py (rt., 10h) NH ₃ aq (55°C, 2h)	Bezpośrednio MALDI	UV → MALDI

Zastosowałam opracowane warunki do odblokowanie wszystkich grup funkcyjnych oligonukleotydu **ARM** związanego z podłożem łącznikiem fotolabilnym i wykonałam jego analizę MALDI. W widmie obok sygnału pochodzącego od oligonukleotydu pełnej długości obserwowałam również sygnały o niższej masie (**Rys. 35**). Różnice mas pomiędzy sąsiednimi sygnałami w widmie odpowiadały masom jednostek nukleotydowych. Dzięki temu możliwe było odczytanie sekwencji oligonukleotydu w kierunku 3'→5', czyli zgodnie z kierunkiem syntezy.



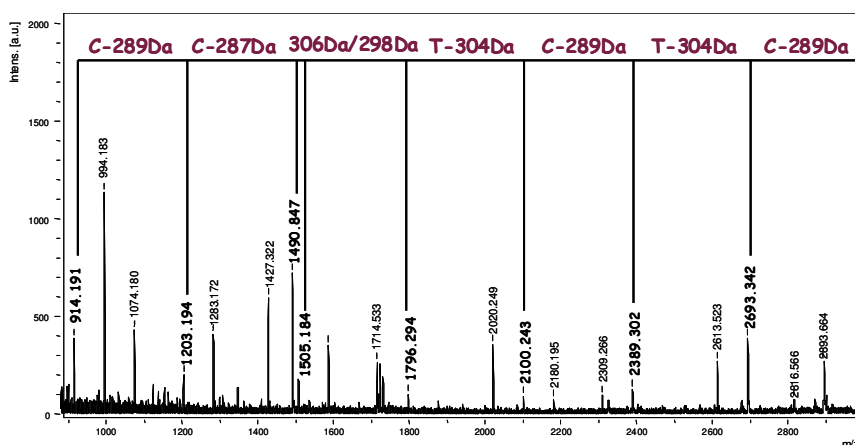
Rys. 35. Widmo MALDI odblokowanego oligonukleotydu **ARM** zakotwiczonego na podłożu PS poprzez łącznik fotolabilny.

W widmach MALDI zazwyczaj nie obserwuje się sygnałów pochodzących od jonów fragmentarycznych oligonukleotydów [137, 189]. Mało prawdopodobne więc było, by obserwowane w widmie sygnały były wynikiem fragmentacji oligonukleotydu. Postanowiłam ustalić pochodzenie sygnałów obecnych w widmie odblokowanego oligonukleotydu

związanego z podłożem poprzez łącznik fotolabilny. Był to warunek konieczny do prowadzenia dalszych badań w tym obszarze.

4.2.3. Określenie zakresu fragmentacji oligonukleotydów związanych z podłożem poprzez łącznik fotolabilny

W celu ustalenia pochodzenia sygnałów otrzymanych w wyniku bezpośredniej analizy MALDI odblokowanych oligonukleotydów związanych z podłożem poprzez łącznik fotolabilny ponownie przeprowadziłam syntezę oligonukleotydu o sekwencji 5'-d(CTC TCT CTC T)-3', (CT10). Sekwencję dobrałam tak, aby łatwiejsza była obserwacja ewentualnej fragmentacji oligonukleotydu. Teoretycznie, gdyby oligonukleotyd ulegał fragmentacji w warunkach MALDI, powinnam obserwować w widmie sygnały pochodzące od fragmentów powstałych w wyniku degradacji oligomeru zarówno od 3'- jak i 5'-końca. W sekwencji oligonukleotydu umieściłam tymidynę – 3'-koniec i cytydynę, 5'-koniec. Masy fragmentów powstałych w wyniku fragmentacji na przeciwnych końcach oligonukleotydu różniłyby się o 15Da. Oligonukleotyd odblokowałam i poddałam analizie MALDI (Rys. 36).



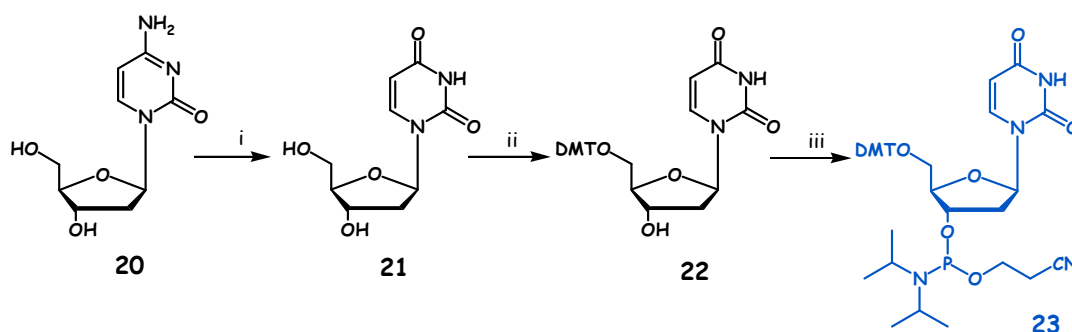
Rys. 36. Widmo MALDI odblokowanego oligonukleotydu CT10.

W widmie pojawiła się pewna dwuznaczność dotycząca możliwości odczytania sekwencji oligonukleotydu. W obrębie mas ~ 1500 Da widoczne były dwa sygnały. Różnica mas pomiędzy nimi wynosiła 15Da. W zależności od tego, który z sygnałów, przy m/z 1505 czy 1490 Da, został uznany za sąsiedni do sygnału o m/z 1796Da, różnica mas pomiędzy nimi odpowiadała masie tymidyny lub cytydyny, przy czym pomyłka w tym oznaczeniu powodowała błąd w określeniu kolejnego nukleotydu w sekwencji. Był to jednak jedyny „podwójny” sygnał obecny w widmie, dlatego wydawało się nieprawdopodobne by był wynikiem fragmentacji oligonukleotydu. Pochodzenie sygnału o m/z 1490Da przypisałam jonowi o podwójnym ładunku $[M-2H]^{-2}$ ($2980 \div 2 = 1490$ Da).

Wynik tego doświadczenia pozwolił mi przypuszczać, że obserwowane w widmie sygnały, dzięki którym możliwe jest odczytanie sekwencji oligonukleotydu, są konsekwencją jego chemicznej syntezy, a nie fragmentacji w warunkach MALDI. Synteza oligonukleotydu przebiega etapowo, w wyniku przyłączania kolejnych jednostek. Każdy z etapów chemicznej syntezy osiąga maksymalnie wydajność 99,9%. W związku z tym, w każdym cyklu syntezy, co najmniej 0,1% rosnących łańcuchów pozostaje w niezmienionej formie. Uznałam, że sygnały obserwowane w widmie pochodzą od tych właśnie krótszych fragmentów, tym bardziej, że sekwencję oligonukleotydu można odczytać w kierunku zgodnym z kierunkiem chemicznej syntezy 3'→5' [103-105].

W widmie obok sygnałów pochodzących od oligonukleotydu pełnej długości i jego krótszych fragmentów, będących wynikiem chemicznej syntezy, występują również sygnały pochodzące prawdopodobnie od jonów fragmentarycznych oligonukleotydu. Przeprowadziłam dalsze badania zmierzające do wyjaśnienia zjawisk towarzyszących wzbudzeniu i jonizacji oligonukleotydu połączonego z podłożem poprzez łącznik fotolabilny podczas analizy MALDI.

W trzech krokach zsyntetyzowałam 3'-amidofosforyn 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydyny (**23**), wychodząc z 2'-deoksycytydyny jako substratu (**Schemat 7**). Reakcję deaminacji 2'-deoksycytydyny przeprowadziłam według opracowanej w Pracowni Chemii Biokoniugatów, dotąd nieopublikowanej procedury, z użyciem 26-krotnego nadmiaru molowego azotynu sodu, 1,5-krotnego nadmiaru dwuwodorofosforanu (V) potasu oraz 0,15 ekwiwalentu kwasu ortofosforowego (V) w wodzie [219]. Reakcję prowadziłam przez trzy doby, po których stwierdziłam całkowite przereagowanie substratu. Następnie funkcję 5'-OH nukleozydu zablokowałam chlorkiem 4,4'-dimetoksytrytylu w pirydynie i przeprowadziłam w amidofosforyn **23**.



Schemat 7. i) NaNO_2 , KH_2PO_4 , H_3PO_4 , H_2O ; ii) DMTCl, Py; iii) bis(diizopropylamino)-(2-cyanoetylo)-fosfina, tioetylotetrazol, CH_2Cl_2 .

3'-Amidofosforyn 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)deoksyurydyny (**23**) mieszałam z amidofosforynem tymidyny w stosunku molowym 1:1. Przygotowałam 0,1M roztwór tej

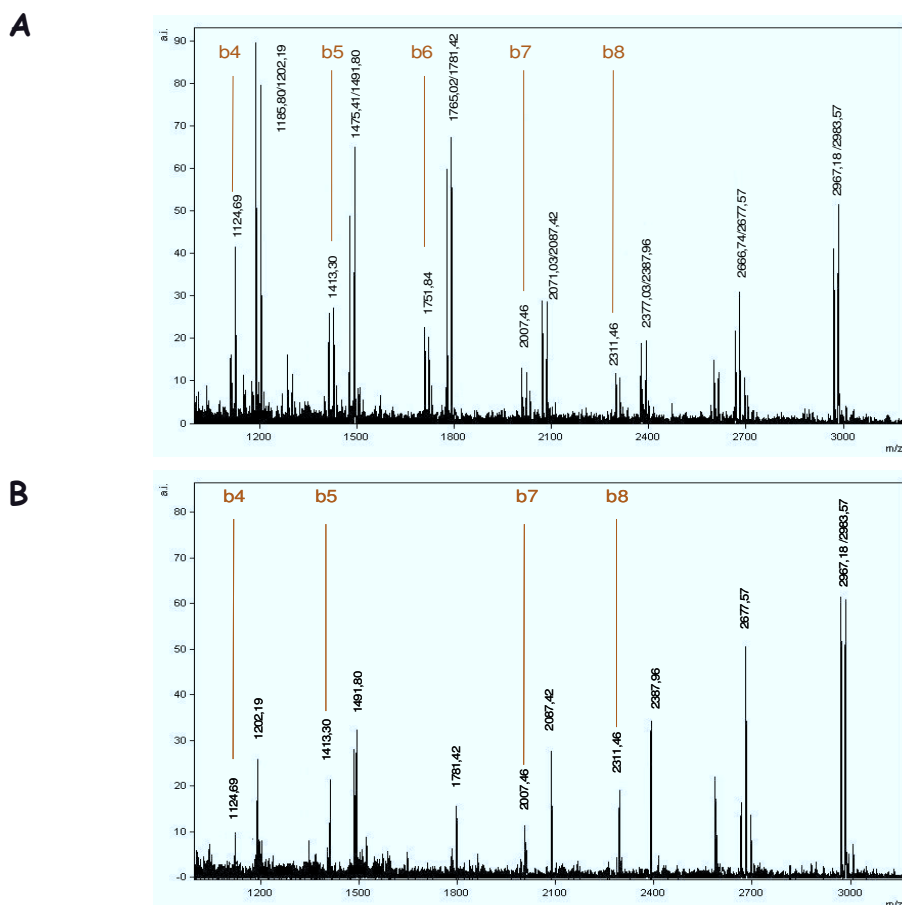
mieszaniny w acetonitrylu, który użyłam do syntezy oligonukleotydów: 5'-d(CTC TCT CTC X)-3', (**CT/dU**) włączając mieszaninę amidofosforynów na 3'-końcu oraz 5'-d(XCT CTC TCT C)-3', (**T/dUC**), w którym włączałam ją na 5'-końcu.

Wybrałam deoksyurydynę, ponieważ różnica mas pomiędzy deoksyurydyną a tymidyną wynosi 14Da, podczas gdy różnice mas pomiędzy pozostałymi nukleotydami wynoszą: $M_{dA} - M_{dC} = 24\text{Da}$; $M_{dA} - M_{dT} = 9\text{Da}$; $M_{dG} - M_{dA} = 16\text{Da}$; $M_{dG} - M_{dC} = 40\text{Da}$; $M_{dG} - M_{dT} = 25\text{Da}$ i $M_{dT} - M_{dC} = 15\text{Da}$. Ten zabieg miał wyeliminować ewentualne dwuznaczności i problemy z ustaleniem pochodzenia sygnałów w widmie MALDI. Przy zastosowaniu mieszaniny **CT/dU** na 3'-końcu oligonukleotydu i założeniu, że sygnały obserwowane w widmie są wynikiem niedoskonałej syntezy, powinnam uzyskać serię podwójnych sygnałów. Różnica mas w obrębie tych dwójek powinna wynosić 14Da. Wszystkie pojedyncze sygnały w widmie musiałyby pochodzić od jonów fragmentarycznych, powstałych w wyniku fragmentacji oligonukleotydu od końca 3'. Z kolei podwójne sygnały, których masy nie odpowiadają masie fragmentów powstałych podczas chemicznej syntezy byłyby konsekwencją fragmentacji oligonukleotydu od końca 5'.

W widmie oligonukleotydu **T/dUC** spodziewałam się obecności podwójnych sygnałów pochodzących od oligonukleotydu o najwyższej masie oraz od ewentualnych jonów fragmentarycznych będących wynikiem fragmentacji od 5'-końca. Z kolei wszystkie pojedyncze sygnały pochodziłyby od produktów niedoskonałej syntezy oraz fragmentacji od 3'-końca oligonukleotydu.

W widmie oligonukleotydu, w którym mieszanina amidofosforynów dU/dT została włączona na końcu 3', oprócz serii sygnałów pochodzących od oligonukleotydu i jego krótszych fragmentów powstałych w wyniku chemicznej syntezy, widoczne są również sygnały, które z całą pewnością pochodzą od jonów fragmentarycznych (**Rys. 37A**). Te ostatnie są podwójne, przy czym różnica mas pomiędzy nimi wynosi 14Da. Świadczy to o fragmentacji od 3'-końca oligonukleotydu połączonego z podłożem poprzez łącznik fotolabilny w warunkach analizy MALDI.

Widmo oligonukleotydu z mieszaniną dU/dT włączoną na 5'-końcu w wielu punktach potwierdza powyższe obserwacje. Jedynie ostatni sygnał w widmie pochodzący od oligonukleotydu docelowego jest podwójny. Poza tym, w widmie obserwowane są pojedyncze sygnały pochodzące od produktów chemicznej syntezy oraz fragmentów powstałych w wyniku fragmentacji oligonukleotydu od 3'-końca (**Rys. 37B**). Pewne różnice w ilości obserwowanych sygnałów pochodzących od jonów fragmentarycznych oraz intensywności sygnałów wynikają z właściwości metody. Brak powtarzalności wyników w spektrometrii mas MALDI jest bowiem nieodłączną jej wadą [220].



Rys. 37. Widma MALDI oligomerów, **A:** CT/dU, **B:** T/dUC; $([M-H]^- = 2967,72/29831,91\text{Da})$.

Obserwowane w obu widmach sygnały pochodzą od jonów fragmentarycznych typu *b* (Tabela 3). Jest to nietypowy wynik, ponieważ według danych literaturowych głównie, obserwowane w widmie MALDI, sygnały pochodzą zwykle od fragmentów typu *w* i *a* [81-87] (Rys. 11, str. 20). Niemniej, widma MALDI obu oligonukleotydów przedstawiają oczekiwany obraz i potwierdzają niewielki stopień fragmentacji oligonukleotydu (Rys. 37A/B).

Tabela 3. Zestawienie mas jonów fragmentarycznych oligonukleotydu obserwowanych w widmie. Wartości zostały obliczone za pomocą wolnego oprogramowania Nuke dla sekwencji 5'-d(CTC TCT CTC T)-3'.

Masa jonu [Da]	Typ jonu
1124,7949	b4
1413,9790	b5
1751,1747	b6
2007,3588	b7
2311,5545	b8

Wynik powyższych doświadczeń potwierdził wysuniętą wcześniej hipotezę dotyczącą pochodzenia obserwowanej w widmie serii sygnałów, będących reprezentacją sekwencji oligonukleotydu. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdziłam, że zakres fragmentacji odblokowanego oligonukleotydu połączonego z podłożem poprzez łącznik fotolabilny w warunkach analizy MALDI jest niewielki. Główna seria sygnałów obserwowanych w widmie MALDI, dzięki którym możliwe jest odczytanie sekwencji oligonukleotydu, pochodzi od krótszych fragmentów oligonukleotydu powstających w wyniku chemicznej syntezy. Postanowiłam na tym fakcie oprzeć metodę sekwencjonowania oligonukleotydowych bibliotek kombinatorycznych.

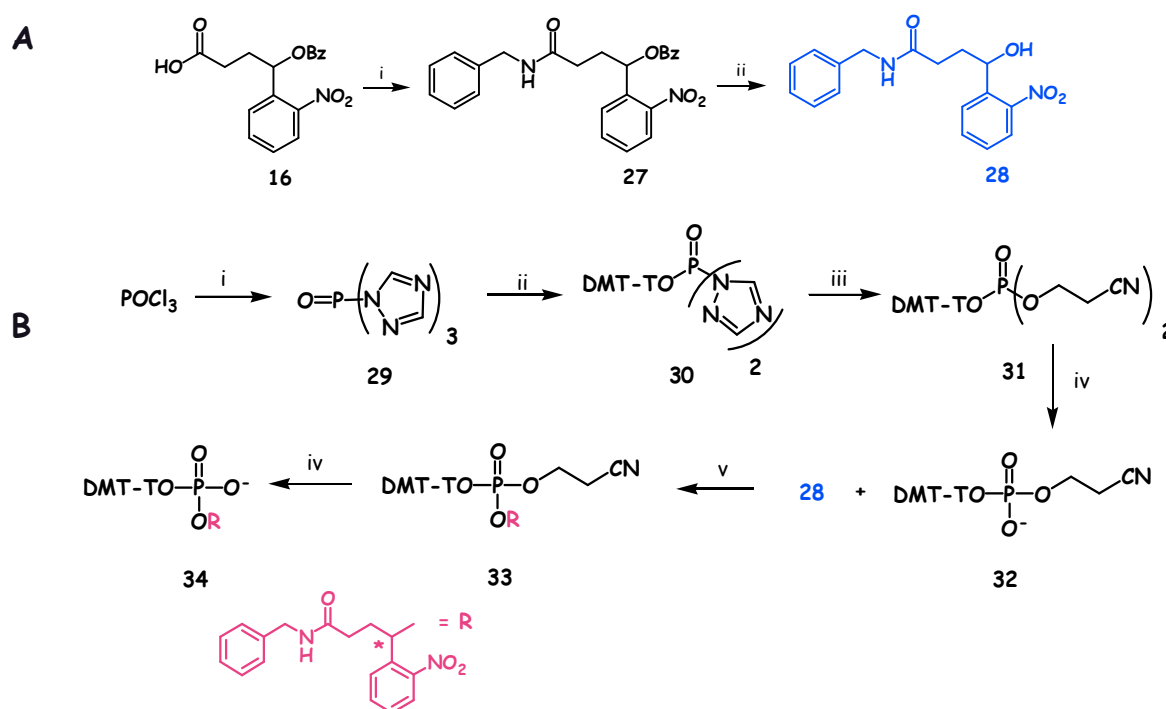
4.2.4. Badanie trwałości połączeń podłoże-łącznik fotolabilny oraz łącznik-oligonukleotyd w roztworze

Ustaliłam pochodzenie sygnałów obserwowanych w widmie MALDI oligonukleotydu związanego z podłożem poprzez łącznik fotolabilny. Jednak w dalszym ciągu bez odpowiedzi pozostało pytanie dotyczące przyczyn braku trwałości łącznika w warunkach odblokowania oligonukleotydu. Problem ten bardzo utrudniał mi pracę, ze względu na, nie do końca zrozumiałe, zachowanie „fotolabilnego podłoża”. Dlatego postanowiłam rzetelnie sprawdzić trwałość połączeń, zarówno podłoże-łącznik, jak i łącznik-oligonukleotyd, badając związki modelowe w roztworze.

Symulację zjawisk zachodzących na ziarnie podłoża rozpoczęłam od syntezy związku modelowego – 4-hydroksy-4-(*o*-nitrofenylo)-*N*-benzylobutanamidu (**28**) (Schemat 8). Jako związek imitujący podłoże użyłam benzyloaminy. Uznałam ją za dobry model polistyrenu funkcjonalizowanego grupami metyloaminowymi. Jako aktywatora podczas syntezy wiązania amidowego użyłam 1,1'-karbonylodiimidazolu (CDI). W reakcji na podłożu stałym stosowałam do tego celu *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimid (DCC), jednakże podczas syntezy w roztworze obecność powstającego *N,N'*-dicykloheksylo mocznika powodowała problemy w wyodrębnieniu czystego produktu reakcji kondensacji. Warto tu wspomnieć, że CDI sprawdził się jako dobry aktywator w reakcji tworzenia wiązania amidowego w roztworze, w reakcjach na podłożu stałym jego zastosowanie nie dawało jednak dobrych rezultatów.

W następnym kroku zoptymalizowałam warunki usunięcia grupy benzoilowej blokującej funkcję hydroksylową 4-benzoiloksy-4-(*o*-nitrofenylo)-*N*-benzylobutanamidu (**27**). Na podłożu stałym stosowałam do tego celu roztwór NH_3 aq/MeOH w temperaturze 55°C. W tych warunkach następowało jedynie częściowe usunięcie blokady benzoilowej z grupy hydroksylowej związku **27**. Mimo wydłużenia czasu reakcji do 12 godzin nie udało się osiągnąć zadowalającego przereagowania. Użyłam więc w tym celu roztwór metyloaminy w

bezwodnym etanolu. Metyloamina jest zasadą silniejszą od amoniaku. Poza tym, cząsteczki amoniaku w środowisku wodnym są hydratowane, co zmniejsza ich reaktywność w stosunku do substratu. Ten ostatni problem dotyczy również roztworów wodnych metyloaminy, dlatego przeprowadziłam tę reakcję w bezwodnym etanolu. W tych warunkach nastąpiło ilościowe przereagowanie 4-benzoiloksy-4-(*o*-nitrofenylo)-*N*-benzylobutanamidu. W mieszaninie reakcyjnej nawet po 12 godzinach działania metyloaminy nie obserwowałam produktów hydrolizy wiązania amidowego. Dowodzi to trwałości połączenia podłoże-łącznik w warunkach zasadowych.

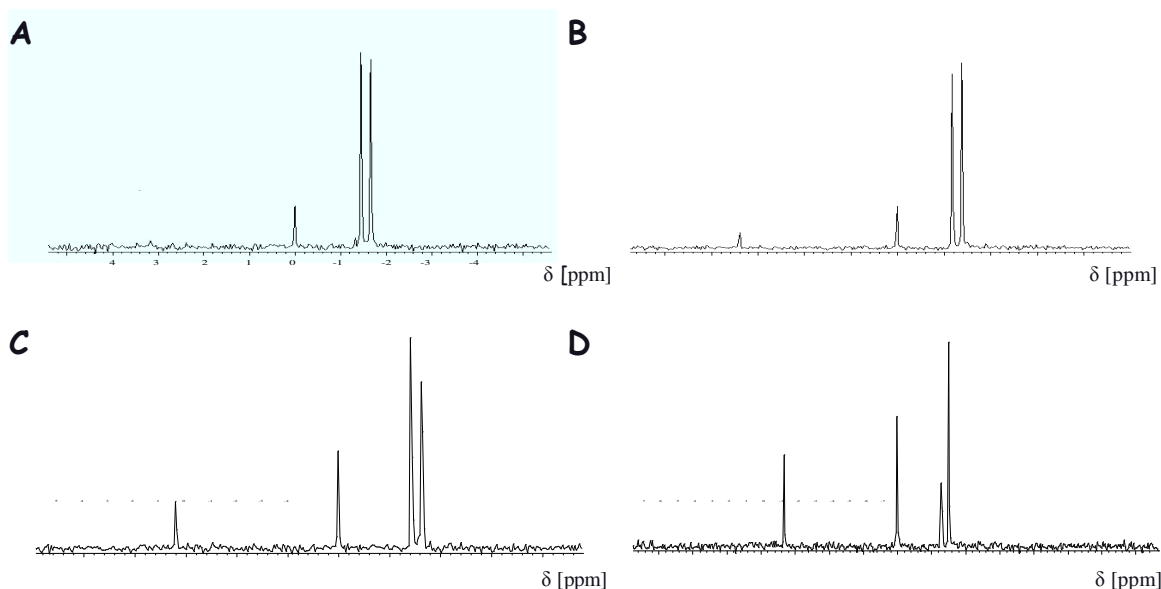


Schemat 8. A: i) CDI, benzyloamina, CH_2Cl_2 ; ii) 30% roztwór CH_3NH_2 w absolutnym etanolu; B: i) 1,2,4-triazol, Et_3N , MeCN ; ii) 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyna, MeCN ; iii) 2-hydroksypropionitryl, MeCN ; iv) Et_3N , Py ; v) TPSCI , Py .

Następnie przygotowałam modelowy 4-(*o*-nitrofenylo)-*N*-benzylobutanamid-4-ylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforan (**34**) (**Schemat 8B**). Do chłodzonego w lodzie roztworu triazolu w acetonitrylu dodałam POCl_3 , a następnie porcjami trietyloaminę. Wygenerowany w ten sposób fosforylotriazolid (**29**) użyłam jako czynnik fosforylujący do otrzymania bis-(2-cyanoetylo) 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforanu (**31**) [221], który następnie przeprowadziłam w 2-cyanoetylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforan (**32**). Użyłam w tym celu roztwór trietyloaminy w bezwodnej pirydynie. Do otrzymania 2-cyanoetylo 4-(*o*-nitrofenylo)-*N*-benzylobutanamid-4-ylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforanu (**33**) zastosowałam metodę

triestrową z użyciem chlorku kwasu 2,4,6-triizopropyllobenzenosulfonowego (TPSCI), jako czynnika aktywującego. Funkcję fosforanową następnie odblokowałam za pomocą roztworu trietyloaminy w pirydynie.

Badałam trwałość otrzymanego w ten sposób 4-(*o*-nitrofenylo)-*N*-benzylobutanamid-4-ylu 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylu fosforanu (**34**) w warunkach zasadowych (32% roztwór wodny NH₃, 55°C). Zmiany kontrolowałam za pomocą ³¹P NMR (**Rys. 38 A-D**). Sygnały pochodzące od fosfodiestru **34** występującego w postaci dwóch diastereoizomerów występują w widmie ³¹P NMR przy około 1,3 ppm (**Rys. 38A**). Po 5 godzinach działania na fosfodiester **34** roztworem amoniaku pojawił się sygnał przy 3,4 ppm i jego intensywność względem sygnału pochodzącego od fosfodiestru **34** rosła w czasie. Po upływie pięciu dni stosunek sygnałów pochodzących od substratu i produktu hydrolyzy wynosił 4:1. Otrzymaną mieszaninę związków oczyściłam chromatograficznie i scharakteryzowałam za pomocą ¹H i ¹³C NMR. Na tej podstawie stwierdziłam, że związek, który dawał w widmie sygnał przy 3,4 ppm to 3'-fosforan 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyny. Na podstawie opisanego powyżej doświadczenia mogłam stwierdzić, że układ łącznik-oligonukleotydu jest trwały w warunkach zasadowych i nie powinien ulegać rozszczepieniu podczas odblokowania oligonukleotydu. Niemniej opisane wcześniej doświadczenia, przeprowadzone z oligonukleotydami połączonymi z podłożem stałym, dały wyniki sprzeczne z powyższym stwierdzeniem.



Rys. 38. Badanie trwałości modelowego fosfodiestru w obecności 32% roztworu amoniaku. Kontrola ³¹P NMR:

A) po 2 h; B) po 5 h; C) po 24 h; D) po 5 dobach.

Powodów tego stanu rzeczy upatruję we właściwościach fotochemicznych cząsteczki *o*-nitrobenzylowej oraz olbrzymich różnicach w skali obu doświadczeń. Wszystkie obserwacje przemawiają za wysoką czułością cząsteczki na działanie nawet najmniejszych ilości światła słonecznego. Wydaje się, że czułość tę wspomaga obecność zasady w roztworze, ponieważ w obojętnym roztworze wodnym nie obserwowałam szczególnej labilności tego układu. Trwałość tego układu w również zasadowym roztworze Et₃N/Py prawdopodobnie wynika z obecności pirydyny, która pochłania promieniowanie ultrafioletowe.

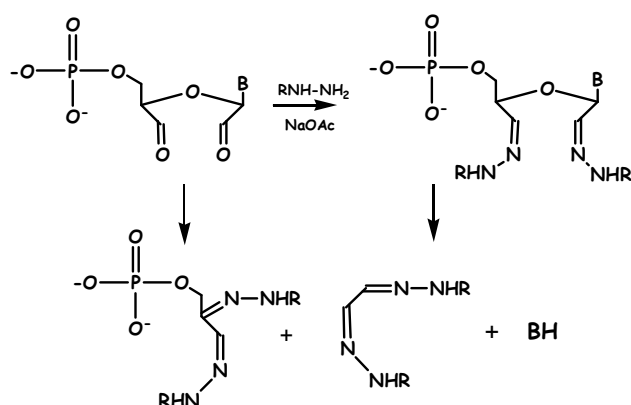
Ze względu na właściwości „podłoża fotolabilnego”, wszelkich manipulacji na nim należałoby dokonywać w ciemnościach. Konieczność ta poważnie komplikuje pracę eksperymentatora, a niektóre etapy syntezy kombinatorycznej nawet uniemożliwia. Selekcja aktywnych elementów biblioteki odbywa się w wyniku hybrydyzacji połączonych z podłożem oligonukleotydów ze znakowaną fluorescencyjnie sondą. Wizualizacji tego procesu dokonuje się poprzez naświetlanie przeszukiwanej biblioteki promieniowaniem o zadanej długości fali. Jednym słowem, w syntezie kombinatorycznej nie da się uniknąć oddziaływania fotolabilnego podłoża ze światłem. Mimo, że zastosowanie światłoczułego połączenia z podłożem może być bardzo wygodne, ze względu na następujące jednocześnie odłączenie oligonukleotydu od podłoża i jego analizę, postanowiłam zrezygnować z tego rozwiązania.

5. Synteza układu *cis*-diolowego jako łącznika do syntezy oligonukleotydu i badanie jego właściwości

Ponownie stanęłam przed problemem wyboru odpowiedniej cząsteczki, która zakotwiczy oligonukleotyd na ziarnie podłoża na czas jego syntezy i odblokowania. Poszukiwałam układu, który spełniałby następujące warunki: z jednej strony, byłby trwały w warunkach kwasowych i zasadowych, z drugiej, umożliwiałby wydajne uwolnienie związku z podłoża przed jego analizą w warunkach, w których nie nastąpi degradacja oligonukleotydu. Ostatnim, równie istotnym warunkiem, który powinien spełniać łącznik jest możliwość użycia do jego rozszczepienia takich substancji, które nie będą utrudniać analizy MALDI. Jednym w możliwych rozwiązaniach tego problemu jest zastosowanie łącznika rozszczepianego w warunkach oksydacyjnych.

Wiadomo, że *cis*-diolowy układ reszty rybozy 5'-fosforanu nukleozydu w obecności nadjodanu sodu łatwo ulega przekształceniu w dialdehyd [222-224]. Powstały układ jest bardzo reaktywny. Grupy karbonyłowe mają silną skłonność do występowania w postaci wodzianów. W obecności amin pierwszorzędowych tworzą się iminy (zasady Schiffa) lub układy cykliczne [225-229]. W wyniku ich rozkładu w środowisku kwaśnym bądź

zasadowym zostaje uwolniony nieorganiczny fosforan oraz zasada azotowa (**Schemat 9**). Reakcje utlenionych nadjodanem nukleotydów po raz pierwszy zostały opisane przez Whitfelda oraz Browna *et al.* [230, 231]. Niezależne badania w tym obszarze prowadzili Ogur i Small [232] i wykazali, że mechanizm uwolnienia nieorganicznego fosforanu jest bardziej skomplikowany niż wcześniej przypuszczano. Trwałość cyklicznych produktów, które utleniony nadjodanem układ rybozy tworzy w obecności amin, jest zależna od pH środowiska [223]. Nieorganiczny fosforan jest uwalniany powoli w pH > 8, kiedy pH zostaje obniżone zwiększa się szybkość reakcji i jest ona zależna od rodzaju zastosowanej aminy.



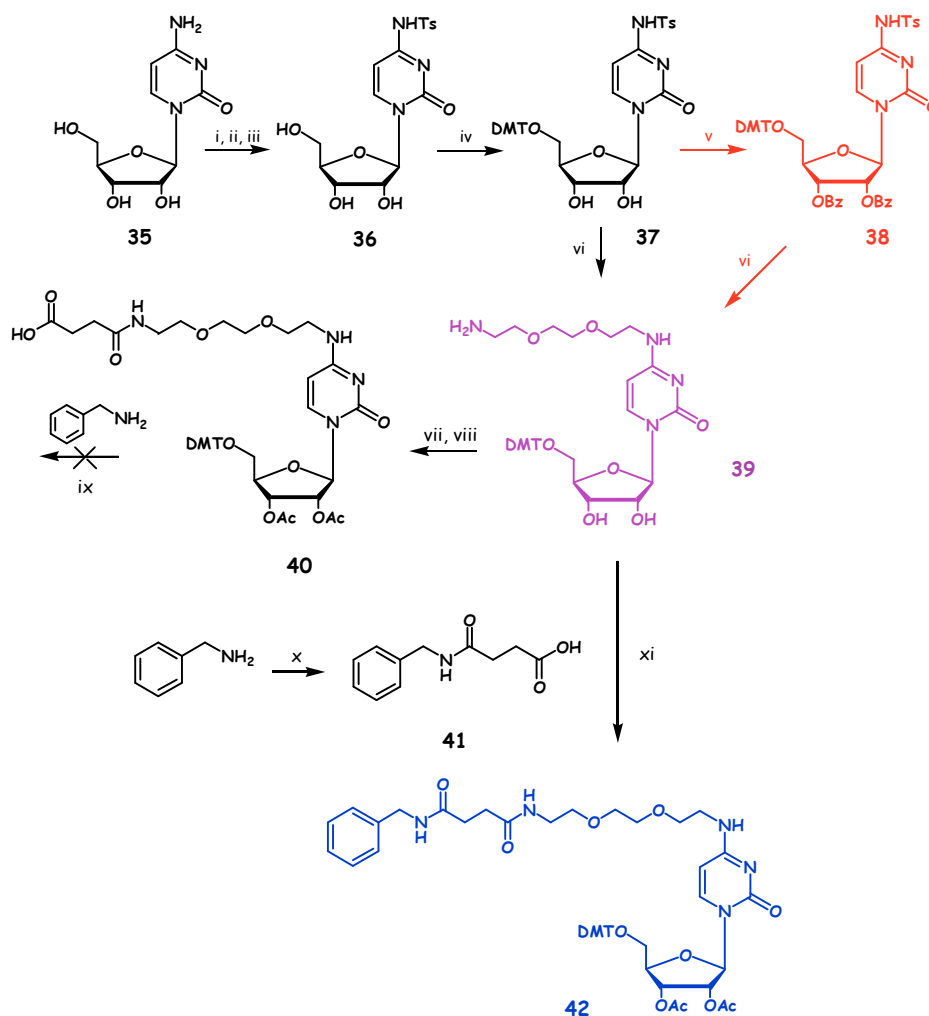
Schemat 9. Degradacja pierścienia rybozy za pomocą nadjodanu i pochodnych hydrazyny.

5.1. Synteza łącznika

W celu opracowania, odpowiednich dla wybranej przeze mnie metodyki, warunków odłączenia oligonukleotydu od podłoża postanowiłam wykorzystać układ rybozy. Jako związek, który ostatecznie zakotwiczony oligonukleotyd na podłożu wybrałam 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-4-N-(8-amino-3,6-dioksaoktylo)cytydynę (**39**). Powodem tego wyboru jest podobieństwo łącznika w obrębie struktury i właściwości chemicznych do elementów budulcowych kwasów nukleinowych.

Procedura otrzymywania 4-N-podstawionych deoksytydyn została opracowana przez Markiewicza *et al.* i wielokrotnie wykorzystywana w różnych zastosowaniach syntetycznych w Pracowni Chemii Biokoniugatów [212, 233-235]. Łącznik zsyntetyzowałam w trzech krokach. W pierwszym etapie, tymczasowo zablokowałam grupy hydroksylowe cytydyny za pomocą TMSCl w pirydynie, następnie dodałam chlorek kwasu *p*-toluenosulfonowego. Mieszaninę reakcyjną ogrzewałam do temperatury wrzenia rozpuszczalnika. Całkowite przereagowanie substratu stwierdziłam po upływie 1,5 godziny. W oryginalnej procedurze stosowano niższą temperaturę, 60°C [212]. Podniesienie temperatury wpłynęło na znaczne skrócenie czasu reakcji (z 12 godzin do 1,5 godziny). Analogicznie jak w opublikowanej

procedurze, ochrony sililowe z grup hydroksylowych usunęłam za pomocą roztworu amoniaku, a produkt bezpośrednio poddałam reakcji dimetoksytrytylowania [212] (**Schemat 10**). Dopiero po tym etapie 4-*N-p*-toluenosulfonylo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyne (**37**) oczyściłam, a jej strukturę potwierdziłam na podstawie analizy widm NMR.



Schemat 10. i) TMSCl, Py; ii) chlorek *p*-toluenosulfonylowy, Py; iii) NH₃ aq; iv) DMTCl, Py; v) BzCl, Py; vi) 2,2'-(etylenodioksy)-bis(etyloamina), Py; vii) bezwodnik kwasu bursztynowego, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂; viii) Ac₂O, Py; ix) DCC, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂; x) bezwodnik kwasu bursztynowego, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂; xi) CDI, CH₂Cl₂.

W początkowej wersji szlaku syntetycznego, na tym etapie zablokowałam funkcje 2'- i 3'- hydroksylową za pomocą chlorku benzoilu. Następnie 4-*N-p*-toluenosulfonylo-2',3'-*O*-dibenzoilo-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyne (**38**) rozpuściłam w pirydynie, dodałam 5-krotny nadmiar molowy 2,2'-(etylenodioksy)-bis(etyloaminy) i ogrzewałam w temperaturze 60°C przez noc. Niestety, w tych warunkach grupy 2' i 3' hydroksylowe ulegały odblokowaniu i w efekcie otrzymywałam 4-*N*-(8-amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-*O*-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyne (**39**). Postanowiłam pominąć w tym miejscu etap blokowania grup

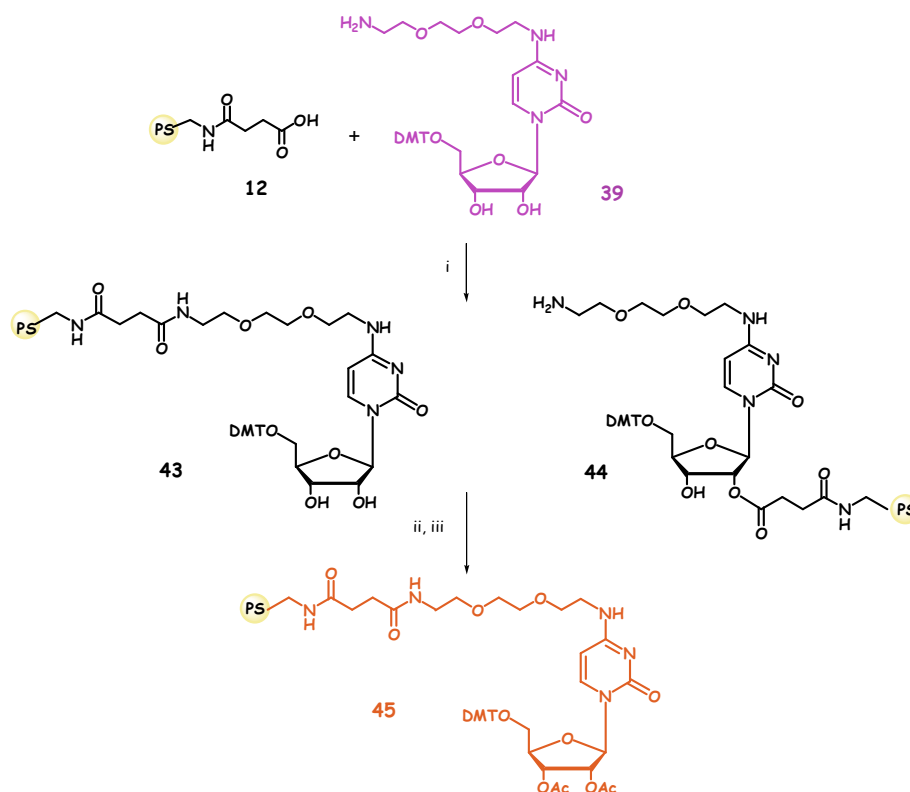
hydroksylowych, ponieważ acylowanie funkcji 2', 3'-OH układu **39** prowadziłyby również do acylowania jego terminalnej grupy aminowej.

Szlak syntetyczny prowadzący do otrzymywania „podłoża oksylabilnego” (**45**) postanowiłam najpierw sprawdzić w serii reakcji w roztworze, żeby mieć możliwość kontroli postępu reakcji i scharakteryzować produkty. 4-N-(8-Amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynę (**39**) poddałam reakcji z bezwodnikiem kwasu bursztynowego w obecności DMAP i trietyloaminy. Następnie zablokowałam funkcje hydroksylowe reszty cytydyny bezwodnikiem kwasu octowego. Otrzymany 4-N-(8-amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2',3'-O-diacetylocytydynylosukcynamid (**40**) oczyściłam i scharakteryzowałam za pomocą analizy NMR. Następnym etapem była kondensacja związku **40** z benzyloaminą jako modelem podłoża. Jednak, pomimo wydłużenia czasu jej trwania i zwiększenia nadmiaru czynnika kondensującego, nie obserwowałam postępu reakcji.

Przypuszczam, że przyczyną tego stanu rzeczy może być uwikłanie długiego i elastycznego łańcucha bocznego związku w oddziaływania w obrębie cząsteczki. Prawdopodobnie efektem jest takie strukturalne ułożenie karboksylowego atomu węgla, które uniemożliwia atak nukleofilowy funkcji aminowej benzyloaminy.

Porzuciłam tę drogę syntetyczną i obrałam alternatywną. W pierwszym kroku przeprowadziłam kondensację benzyloaminy z bezwodnikiem kwasu bursztynowego. W kolejnym przeprowadziłam kondensację otrzymanego kwasu 4-(benzyloamino)-4-oksobutanowego (**41**) z pochodną cytydyny **39** (Schemat 10). Spodziewany 4-N-(8-amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynylo-N-benzylosukcynidamid (**42**) otrzymałam z dobrą wydajnością. Obserwowałam również tworzenie alternatywnego produktu z wydajnością rzędu 5%.

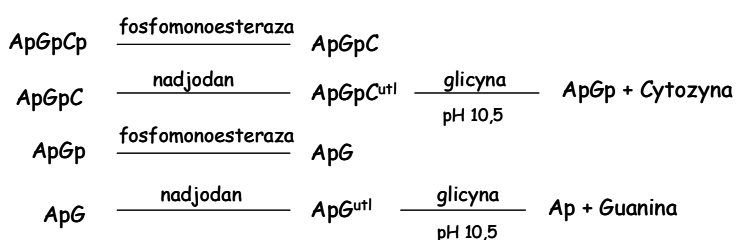
Następnie 4-N-(8-amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynę (**39**) poddałam kondensacji z podłożem **12**, niosącym grupy karboksylowe (Schemat 11). W tych warunkach obok pożądanego produktu **43** mogą powstawać również produkty uboczne, na przykład pochodna **44**, czy jej 3' izomer. W celu usunięcia z podłoża alternatywnie związanych reszt pochodnej cytydyny, ziarna podłoża poddałam działaniu roztworu amoniaku. Założyłam, że uzyskane w ten sposób podłoże będzie zawierało jedynie 4-N-(8-amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynę (**39**) połączoną poprzez podstawnik przy atomie azotu N-4. Pozostałe po tych przekształceniach, wolne grupy aminowe podłoża wraz z funkcjami hydroksylowymi reszty cytydyny acetylowałam za pomocą bezwodnika kwasu octowego, otrzymując „podłoże oksylabilne” **45**.



Schemat 11. i) DCC, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂; ii) NH₃ aq; iii) Ac₂O, N-metyloimidazol, 2,6-lutydyna, MeCN.

5.2. Optymalizacja warunków rozszczepienia reszty rybozy

We wczesnych latach 50' zeszłego stulecia prowadzono badania zmierzające do opracowania metody sekwencjonowania oligorybonukleotydów. Metoda opierała się na usuwaniu kolejnych rybonukleotydów z 3'-końca łańcucha oligorybonukleotydu za pomocą

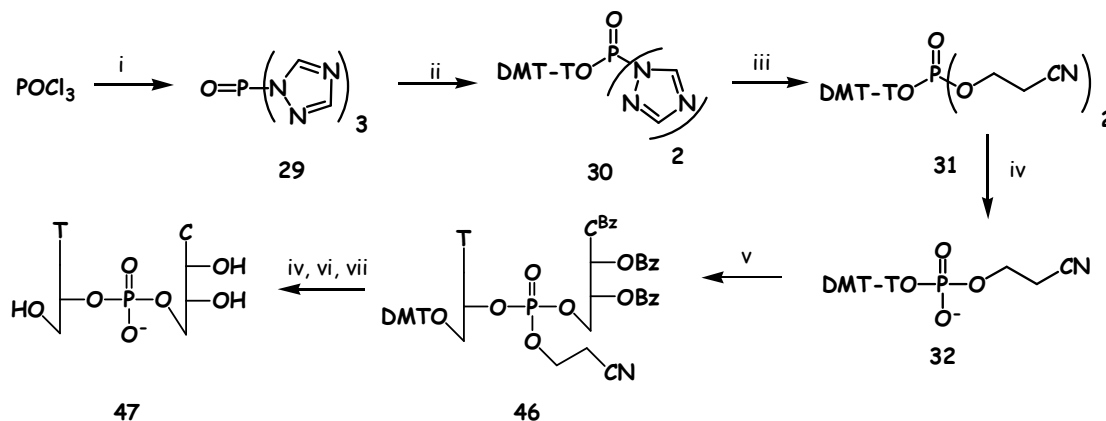


Schemat 12. Cykl reakcji w oksydatywnym sekwencjonowaniu oligorybonukleotydów.

Uwolnioną z terminalnej jednostki zasadę azotową identyfikowano. Krótszy o jeden nukleotyd 3'-fosforan oligorybonukleotydu poddawano działaniu fosfatazy, która usuwała funkcję 3'-fosforanową. Oligonukleotyd ponownie oczyszczano chromatograficznie. Następnie cykl reakcji powtarzano. Proces przedstawiłam schematycznie powyżej (**Schemat 12**).

nadjodanu i odpowiedniej aminy [230]. Po odłączeniu 3'-końcowego rybonukleotydu, otrzymaną mieszaninę rozdzielano za pomocą chromatografii bibułowej.

W latach 70' XX w. Neu i Heppel „odkurzyli” ten temat badawczy [236]. Testowali różne aminy i warunki wpływające na wydajność rozszczepienia pierścienia rybozy oraz badali jej zależność od sekwencji oligonukleotydu. Lektura tej pracy zachęciła mnie do sprawdzenia wpływu różnych amin i optymalizacji warunków rozszczepienia łącznika w roztworze.



Schemat 13. i) 1,2,4-triazol, Et_3N , MeCN; ii) 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyna, MeCN; iii) 2-hydroksypropionitryl, MeCN; iv) $\text{Et}_3\text{N}/\text{Py}$ (10%); v) 4-N-2',3'-O-tri-BzC, TPSCl, Py; vi) NH_3 aq.; vii) $\text{CHCl}_2\text{COOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (5%).

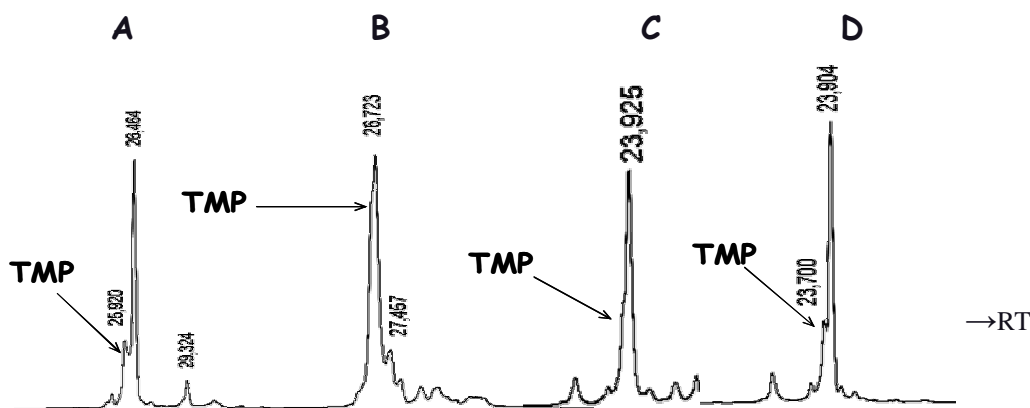
Modelowy tymidyn-3'-ylo cytydyn-5'-ylo fosforan (**47**) otrzymałam w dużej skali (2mmol), ponieważ planowałam kontrolę postępu reakcji za pomocą ^{31}P NMR. Do wykonania jednej analizy potrzebne są ilości rzędu kilkudziesięciu mikromoli substancji. Do otrzymania modelowego związku **47** wykorzystałam szlak syntetyczny, który opracowałam podczas otrzymywania 4-hydroksy-4-(*o*-nitrofenylo)-*N*-benzyllobutanamid-4-ylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforanu (**34**), opisany w rozdziale 4.2.4 niniejszej pracy.

Wygenerowałam fosforylotriazolid (**29**), który wykorzystałam jako czynnik fosforylujący w reakcji otrzymywania bis(2-cyanoetylo) 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforanu (**31**) [221]. Następnie grupę cyanoetylową z fosforanu usunęłam działając 10% roztworem Et_3N w bezwodnej pirydynie. Otrzymany w ten sposób 2-cyanoetylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforan (**32**) użyłam jako substrat do syntezy 2-cyanoetylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo 4-N-2',3'-O-tribenzoilocytydyn-5'-ylo fosforanu (**46**), który otrzymałam stosując metodę triestrową. Grupę cyanoetylową usunęłam za pomocą 10% roztworu Et_3N w pirydynie, grupy benzoilowe – 32% wodnego roztworu amoniaku, a 4,4'-dimetoksytrytylową – 10% roztworu kwasu dichlorooctowego w CH_2Cl_2 , otrzymując finalny produkt, tymidyn-3'-ylo cytydyn-5'-ylo fosforan (**47**) (Schemat 13).

Tymidyn-3'-ylo cytydyn-5'-ylo fosforan (**47**) posłużył mi jako modelowy substrat do testowania wybranych amin pod względem szybkości i wydajności reakcji uwolnienia 3'-fosforanu tymidyny po utlenieniu układu rybozy nadjodanem. Do testów wybrałam cztery aminy: L-metioninę, L-lizynę, metyloaminę oraz amoniak. Wyboru L-lizyny i metyloaminy dokonałam na podstawie danych literaturowych [236], ponieważ według autorów były najskuteczniejsze spośród testowanych amin w procesie uwalniania 3'-fosforanu oligorybonukleotydu z utlenionej formy pierścienia rybozy 3'-końcowej jednostki rybonukleotydu. L-Metioninę umieściłam w tym zestawie, ponieważ chciałam porównać jej efektywność w stosunku do pozostałych amin. Neu i Heppel dodawali L-metioninę po etapie utlenienia pierścienia rybozy 3'-końcowego rybonukleozydu, w celu rozłożenia nadmiaru użytego nadjodanu [236]. Użycie L-metioniny w procesie odłączenia oligonukleotydu od podłoża wydawało się więc korzystne, ponieważ pozwoliłoby ominąć jeden etap w sekwencji prowadzących do tego zdarzenia reakcji. Amoniak znalazł się w serii testowanych amin, ponieważ jego obecność może wręcz ułatwiać analizę MALDI. Jak pisałam w rozdziale 4.1 (Część II) pracy, sole sodowe i potasowe oligonukleotydu trudniej, niż wolny oligonukleotyd, przeprowadzić w stan gazowy. Poza tym, sole sodowe i potasowe oligonukleotydu obserwowane są w widmach MALDI w postaci serii sygnałów utrudniających ich interpretację. Nadmiar jonów amonu w analizowanej próbce może powodować częściowe wypieranie kationów metali z soli oligonukleotydu. Sole amonowe oligonukleotydu, tworzące się w tych warunkach, nie utrudniają analizy, ponieważ podczas jonizacji łatwo ulegają rozkładowi z wytworzeniem wolnego kwasu nukleinowego i amoniaku.

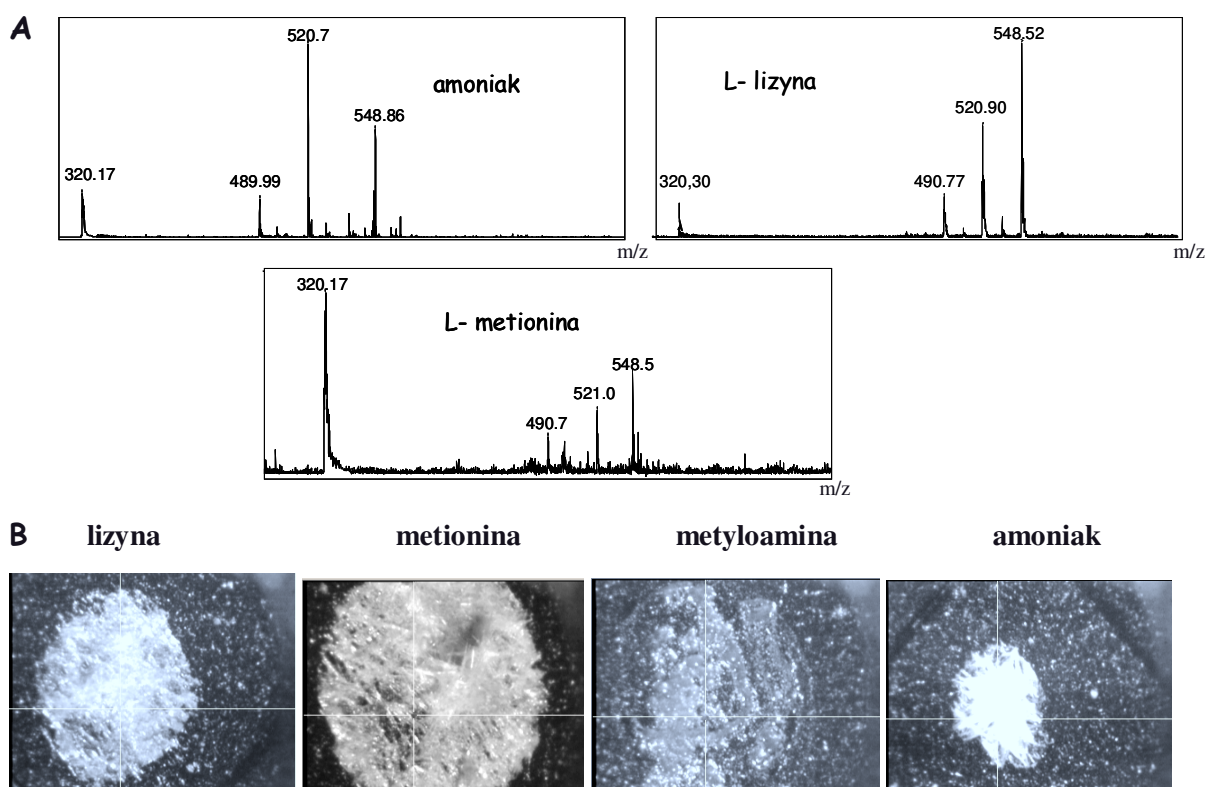
Przeprowadziłam doświadczenie mające na celu uszeregowanie efektywności wybranych amin w reakcji uwolnienia 3'-fosforanu tymidyny z utlenionej nadjodanem formy tymidyn-3'-ylo cytydyn-5'-ylo fosforanu (**47**). Wyniki tego doświadczenia zamierzałam wykorzystać do optymalizacji warunków odłączenia oligonukleotydu od podłoża. W pierwszym etapie modelowy fosfodiester **47** potraktowałam 0,2M wodnym roztworem nadjodanu sodu i wykonałam kontrolne widmo ^{31}P NMR. Niestety na tym etapie okazało się, że obecność nadjodanu w mieszaninie utrudnia wykonanie czytelnego widma NMR. Zmieniłam więc metodę kontroli postępu reakcji. Wygodniejszą metodą wydała mi się wysokosprawna chromatografia cieczowa – HPLC. Z jej pomocą ustaliłam szereg skuteczności działania wybranych amin. Przedstawia się on następująco: L-Met \gg L-Lys, $\text{MeNH}_2 > \text{NH}_3$. Po 30 minutach działania na tymidyn-3'-ylo cytydyn-5'-ylo fosforan (**47**) nadjodanem, reszta rybozy ulegała całkowitemu utlenieniu (kontrola HPLC). Po tym czasie próbę podzieliłam na cztery równe części, do każdej dodałam 0,3M roztwory poszczególnych amin i po dwóch godzinach wykonałam analizę HPLC. Obecność amin w analizowanych mieszaninach

reakcyjnych powodowała niewielkie zmiany czasu retencji produktów, dlatego w różnych próbach są one nieco inne. Obecność amin miała również wpływ na sam rozdział chromatograficzny. Nie udało mi się go niestety poprawić. Produkt, 3'-fosforan tymidyny, najwydajniej powstawał w obecności L-metioniny. Roztwór amoniaku, L-lizyny i metyloaminy wykazywały podobną efektywność w reakcji eliminacji utlenionego układu rybozyłowego (**Rys. 39**).



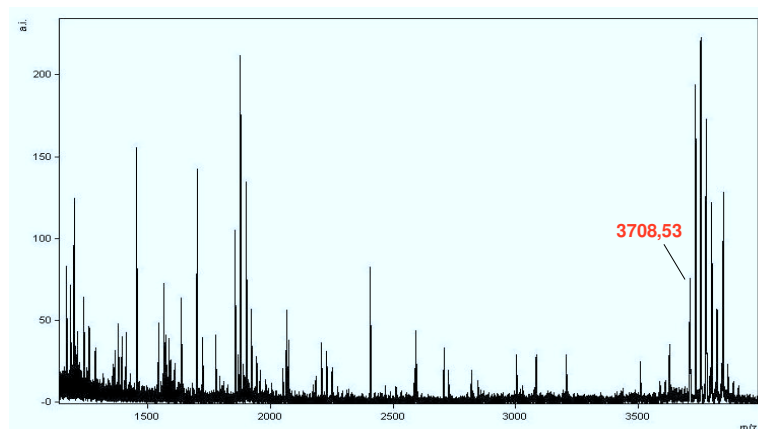
Rys. 39. Chromatogramy przedstawiające fosfodiester **48** traktowany kolejno: **A** – 0,1M roztworem NaIO_4 (30min.), a następnie 0,3M roztworem L-lizyny; **B** - L-metioniny; **C** - NH_3 ; **D** – metyloaminy (2h). TMP – monofosforan tymidyny.

Następnie sprawdziłam jak obecność poszczególnych amin w próbie wpływa na proces krystalizacji matrycy MALDI. Jako matrycę użyłam 2,4,6-THAP (2,4,6-trihydroksyaceton). Matryca oraz kryształy, które tworzy, mają kluczowe znaczenie dla procesu jonizacji analitu, a co za tym idzie dla jakości widm MALDI (**Część II; 4.3**). Udało mi się zarejestrować jedynie trzy widma spośród czterech przygotowanych do analizy próbek (**Rys. 40**). Analiza MALDI potwierdziła poprzednie wnioski, wyciągnięte na podstawie analizy HPLC, dotyczące efektywności działania poszczególnych amin w reakcji eliminacji utlenionej nadjordanem reszty rybozy, a tym samym uwalniania 3'-fosforanu tymidyny (**Rys. 39**). W obecności metyloaminy cząsteczki matrycy w ogóle nie tworzyły kryształów, dlatego niemożliwa była rejestracja widma. Testowałam trzy różne matryce MALDI – THAP, HPA i 6-aza-2-tiotymidynę. Żadna z nich nie tworzyła kryształów w obecności metyloaminy. Obecność amoniaku utrudniała krystalizację matrycy. Zarówno metionina, jak i lizyna współkrystalizowały z matrycą. Do dalszych doświadczeń wybrałam metioninę, która wykazała najwyższą skuteczność spośród badanych amin w reakcji uwalniania 3'-fosforanu tymidyny (**Rys. 40**).



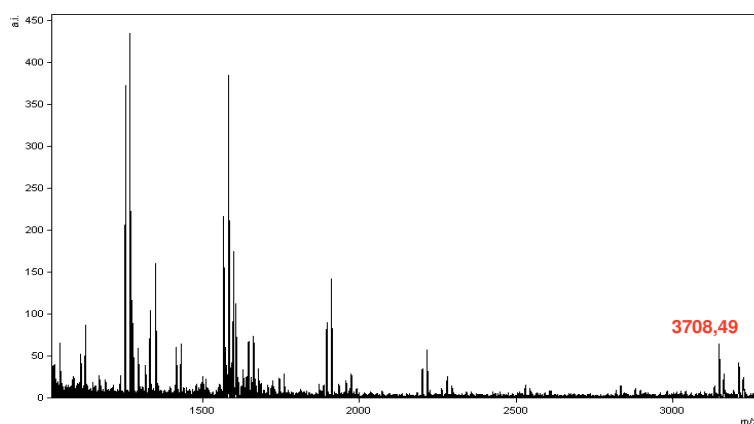
Rys. 40. A: Widma MALDI wykonane po 2 h działania wybranych amin. Sygnały przy m/z 548 Da - tymidyn-3'-ylo cytydyn-5'-ylo fosforan, 320 Da - 3'-fosforan-tymidyny; **B:** Zdjęcia próbek nałożonych na płytkę MALDI (matryca THAP).

Następnym etapem było opracowanie warunków odłączenia oligonukleotydu od podłoża. Na „podłożu oksylabilnym” **45** zsyntetyzowałam dodekamer o sekwencji 5'-d(CCG ATG ATC TAA)-3' (**OXPC**), którego grupy ochronne usunęłam w standardowych warunkach (32% wodny roztwór NH_3 , 55°C, przez noc). Odłączenie oligonukleotydu od podłoża wymaga zastosowania dwuetapowej procedury: utlenienia układu *cis*-diolowego rybozy nadjodaniem oraz jego eliminacji za pomocą nadmiaru aminy. Przygotowałam zawiesinę podłoża w 1mL wody. Pobrałam 1 μL zawiesiny, w której zawarte było kilkadziesiąt ziaren podłoża i dodałam 0,1M roztwór nadjodanu sodu. Po 30 minutach zawiesinę zwirowałam i zebrałam roztwór nadjodanu znad podłoża. Roztwór poddałam kontrolnej analizie MALDI. W widmie obserwowałam serię sygnałów, których obecność świadczyła o tym, że w roztworze już na tym etapie znajdowały się znaczne ilości oligonukleotydu (**Rys. 41**). Sygnały obecne w widmie pochodzą od oligonukleotydu pełnej długości i jego krótszych fragmentów powstałych podczas chemicznej syntezy. Multipletowość sygnałów jest wynikiem tworzących się w tych warunkach soli sodowych oligonukleotydu.



Rys. 41. Widmo MALDI oligomeru OXPC ($[M-H]^-$ 3708,48Da) odłączonego od podłoża 45 w wyniku działania NaIO_4 .

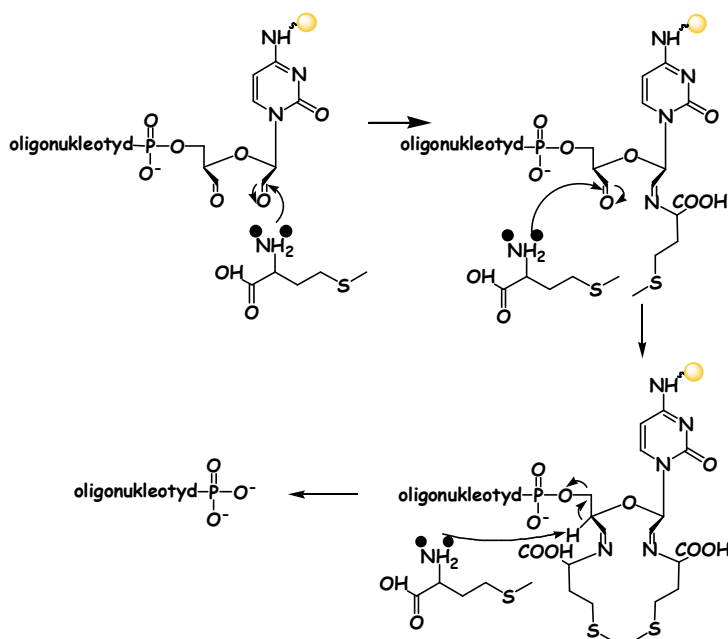
Pozostałe po dekantacji ziarna podłoża przemyłam wodą i dodałam do nich 0,3M roztwór metioniny. Po upływie 2 godzin pobrałam roztwór z nad podłoża i wykonałam analizę MALDI. W widmie ponownie pojawiła się seria sygnałów. Fakt ten dowodził, że na ziarnach podłoża nadal znajdowała się znaczna ilość oligonukleotydu. Widoczne w widmie „ogony” sygnałów w kierunku wyższych mas świadczą o obecności jonów sodu w próbce (**Rys. 42**).



Rys. 42. Widmo MALDI oligonukleotydu OXPC uwolnionego za pomocą L-lizyny z podłoża 45 utlenionego nadjodanem.

Jak pisałam w rozdziale 1 tej części pracy, ilość oligonukleotydu zgromadzona na jednym ziarnie podłoża nie przekracza kilku pikomoli. Analiza skomplikowanych mieszanin tak granicznie małych ilości substancji jest zadaniem trudnym. Nie mogłam pozwolić więc na wprowadzanie do próbki substancji, które mogłyby zaburzać proces krystalizacji matrycy lub jonizacji analitu. Nie brałam również pod uwagę oczyszczania próbki przed analizą, ponieważ to prowadziłoby do znaczących strat oligonukleotydu [237]. Odmycie podłoża po etapie

utlenienia pozwala jedynie na częściowe usunięcie jonów sodu z próby. Poza tym w ten sposób dochodzi również do utraty uwolnionego w tych warunkach oligonukleotydu. Najprostszym rozwiązaniem w tej sytuacji byłoby użycie do odcięcia oligonukleotydu z podłoża takich substancji, które nie będą negatywnie wpływać na wykonanie analizy i jakość widm MALDI. Taka sytuacja wyeliminowałaby konieczność usuwania ich przed analizą.

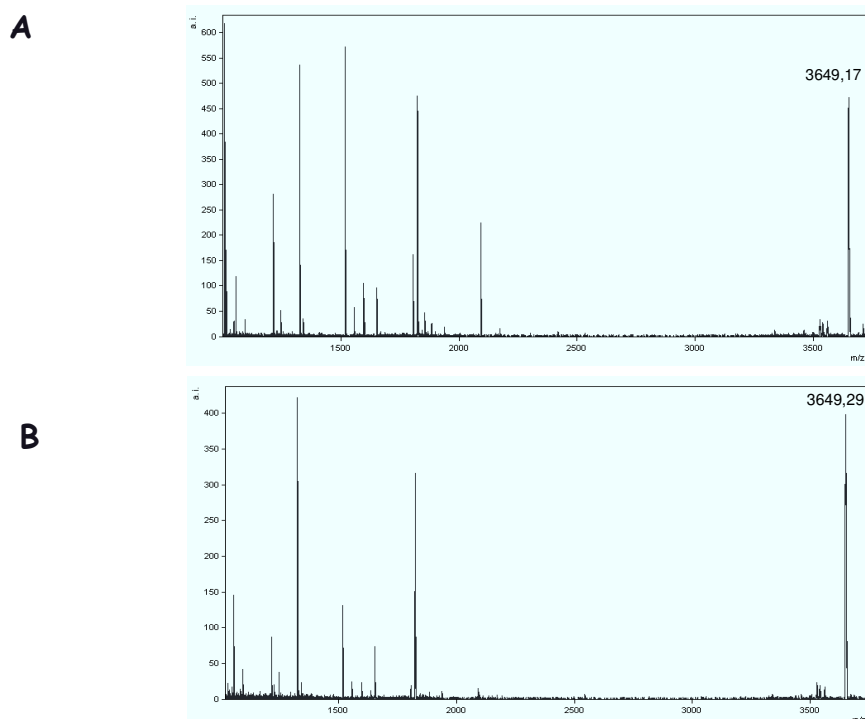


Rys. 43. Proponowany mechanizm uwolnienia oligonukleotydu z podłoża.

Głównym problemem związanym z procedurą odcięcia oligonukleotydu od podłoża **45** jest wprowadzanie do próby jonów sodu w postaci soli kwasu nadjodowego, ponieważ w tych warunkach powstają sole sodowe oligonukleotydu, które nie tylko są mniej lotne od wolnego kwasu nukleinowego, ale również tworzą w widmie serię sygnałów. Możliwym rozwiązaniem tego problemu jest zastosowanie innej niż sodowa soli kwasu nadjodowego. Niestety, w obecności kationów metali powstają sole oligonukleotydu, obniżając jego lotność w warunkach MALDI [238]. Wyjątek stanowią sole amonowe, które są nietrwałe i w warunkach analizy MALDI łatwo ulegają rozkładowi do wolnego oligonukleotydu i amoniaku. Zdecydowałam się wypróbować nadjodan amonu, który nie jest związkiem handlowo dostępnym. Zgodnie z moją wiedzą, użycie tego związku do utlenienia układu *cis*-diolowego, nie zostało wcześniej opisane w literaturze. Do otrzymania nadjodanu amonu użyłam roztworu kwasu nadjodowego i wodnego roztworu amoniaku.

Na podłożu oksylabilnym zsyntetyzowałam oligonukleotyd o sekwencji 5'-d(ATT AGC CTC CAA)-3' (ARNT), którego grupy ochronne odblokowałam w standardowych warunkach. Korzystając z odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego Nikon DIAPHOT-

TMD wybrałam jedno ziarenko podłoża, które poddałam procedurze uwolnienia oligonukleotydu. Do utlenienia reszty rybozy łącznika wykorzystałam 0,1M roztwór nadjodanu amonu (30 minut). Następnie bezpośrednio do tego roztworu dodałam 0,3M roztwór metioniny. Po dwóch godzinach wykonałam analizę MALDI. Otrzymany obraz oraz jakość widma MALDI nie różnią się znacznie od tego, który otrzymałam w wyniku analizy oligonukleotydu odłączonego z wielu ziaren podłoża. Jediną różnicą jest intensywność sygnałów w obu widmach (**Rys. 44**).



Rys. 44. Widma MALDI otrzymane w wyniku analizy oligonukleotydu ARNT ($[M-H]^-$ 3649,39Da) uwolnionego z: **A** – kilkudziesięciu ziaren podłoża, **B** – jednego ziarna.

Podsumowując:

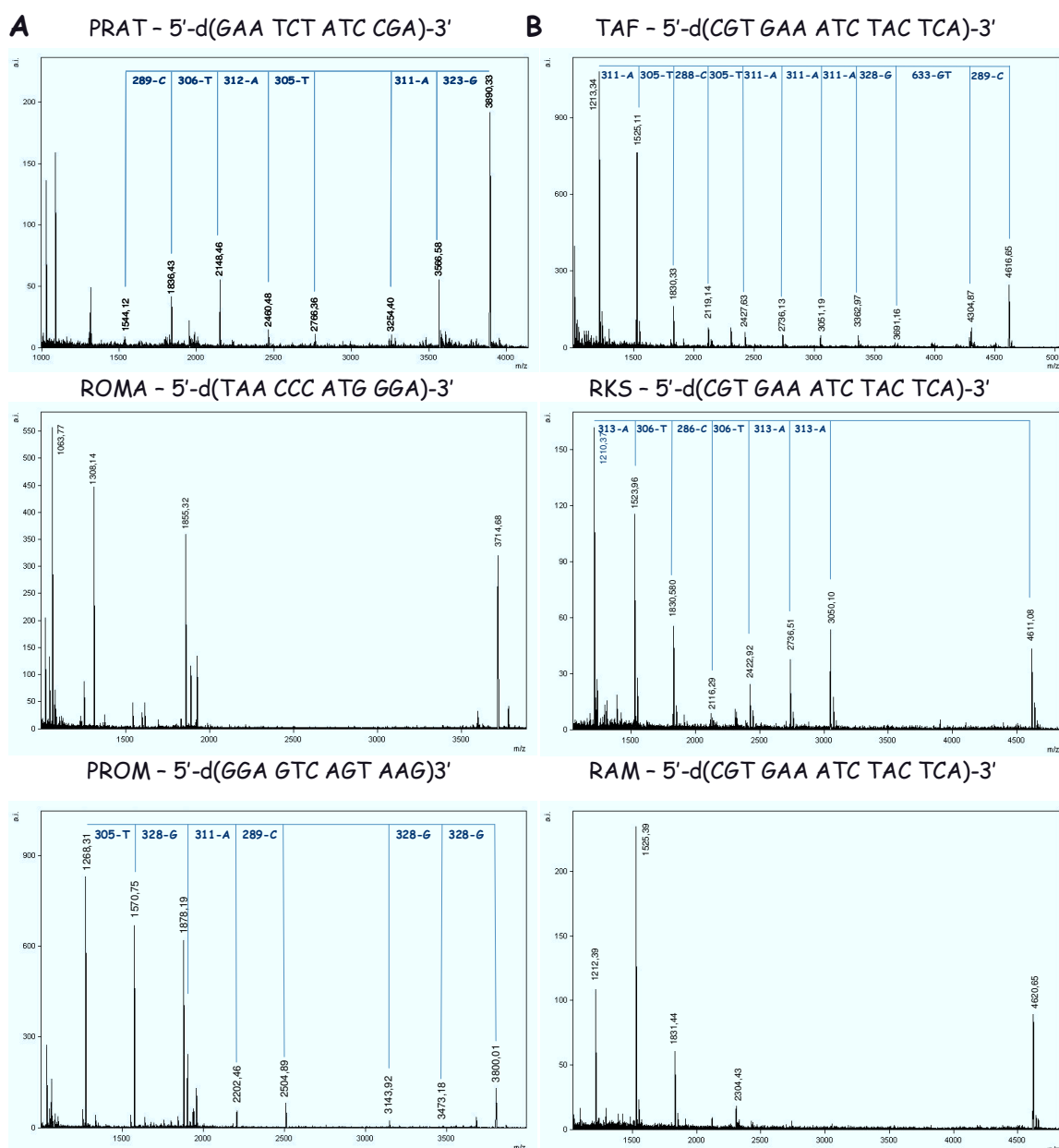
- opracowałam warunki eliminacji pierścienia rybozy na modelowym tymidyn-3'-ylo cytydyn-5'-ylo fosforanie (**47**),
- zoptymalizowałam czas ekspozycji pierścienia rybozy na działanie nadjodanu,
- sprawdziłam efektywność działania czterech różnych amin w procesie eliminacji utlenionej formy reszty rybozy, wybrałam najskuteczniejszą spośród testowanych (L-metionina) i określiłam ilość czasu niezbędną do ilościowego uwolnienia 3'-fosforanu tymidyny,

- opracowałam procedurę odłączenia oligonukleotydu od „podłoża oksylabilnego” **45**, kompatybilną z wykonaniem analizy MALDI,
- zoptymalizowałam warunki tak, by możliwa była analiza ilości oligonukleotydu zgromadzonej na jednym ziarnie podłoża.

6. Opracowanie warunków analizy MALDI produktów syntezy oligonukleotydu

W widmach MALDI wykonanych po uwolnieniu oligonukleotydu z jednego ziarna podłoża obecne są sygnały pochodzące od oligonukleotydu pełnej długości i jego krótszych fragmentów. Fragmenty te powstają podczas chemicznej syntezy oligonukleotydu. Ich obecność związana jest z wydajnością etapową syntezy, która mieści się w przedziale 99,00-99,9%. O zjawisku tym pisałam w rozdziale **4.2.3** tej części pracy. Na tym fakcie chciałam oprzeć metodę sekwencjonowania oligonukleotydów bibliotek kombinatorycznych. Zauważyłam jednak, że ilość obserwowanych w widmie sygnałów jest zmienna i nie zawsze pokrywa zakres mas wzdłuż całej sekwencji oligonukleotydu.

Postanowiłam sprawdzić jak ilość widocznych w widmie sygnałów będzie się zmieniać w zależności od sekwencji oligonukleotydu, przebiegu jego syntezy oraz warunków wykonania widma MALDI. Zsyntezowałam 16 oligonukleotydów o różnych i identycznych sekwencjach. Dla każdego z nich zarejestrowałam szereg widm MALDI. Następnie zestawiałam ze sobą otrzymane wykresy. Stwierdziłam, że dla oligonukleotydów o różnych sekwencjach, a nawet dla tych samych sekwencji oligonukleotydowych otrzymanych w trzech niezależnych doświadczeniach, ilość obserwowanych w widmie masowym sygnałów jest różna. Nie zaobserwowałam powtarzalnych zależności pomiędzy ilością krótszych fragmentów powstających podczas syntezy oligonukleotydu a jego sekwencją. Niemniej, na podstawie analizy masowej oligonukleotydów o tej samej sekwencji, powstałych w wyniku niezależnych syntez, mogłam stwierdzić, że ilość sygnałów obserwowanych w widmie jest ściśle zależna od przebiegu syntezy. W niektórych widmach obserwowałam „komplet” sygnałów, pochodzących od fragmentów oligonukleotydu reprezentujących całą sekwencję. W innych widmach serie pików były „niekompletne” i w związku z tym niemożliwe było ustalenie kolejności nukleotydów w sekwencji. Poniżej przedstawiam tylko reprezentatywne widma wybranych oligomerów: 12-merów (**Rys. 45A**) i 15-merów (**Rys. 45B**).



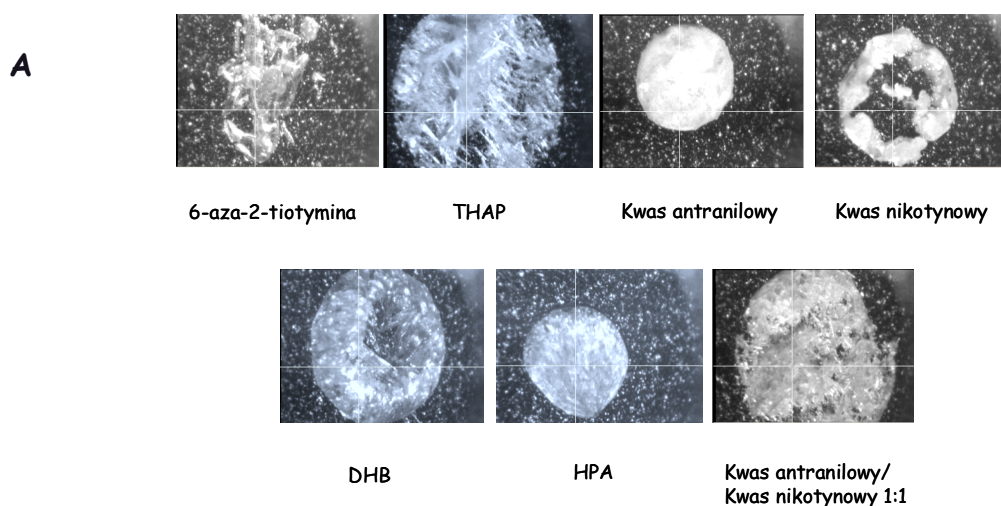
Rys. 45. Widma MALDI: **A** – 12-merów; **B** – 15-merów.

Zbadałam również wpływ warunków analizy na otrzymany obraz w widmie MALDI. Powszechnie wiadomo, że rodzaj matrycy stosowanej do analizy MALDI ma wpływ zarówno na jakość, jak i na intensywność sygnałów otrzymanych w widmie. Jest to związane między innymi z dystrybucją energii pomiędzy cząsteczkami matrycy i analitu oraz nierównomiernym rozkładem stężenia analizowanego związku w kryształach matrycy. Idealna byłaby sytuacja, w której w obrębie nałożonej na płytkę próbki, nie pojawiałyby się tak zwane „sweet spots”. Są to niewielkie obszary, w których tworzą się skupiska cząsteczek analitu. Sposobom przygotowania próbki do analizy poświęcono wiele publikacji [149, 170-174, 184]. Olbrzymie znaczenie ma tu dobór odpowiedniej matrycy oraz dodatków, które mają przyczynić się do kompleksowania lub wymiany niepożądanych jonów. Postanowiłam

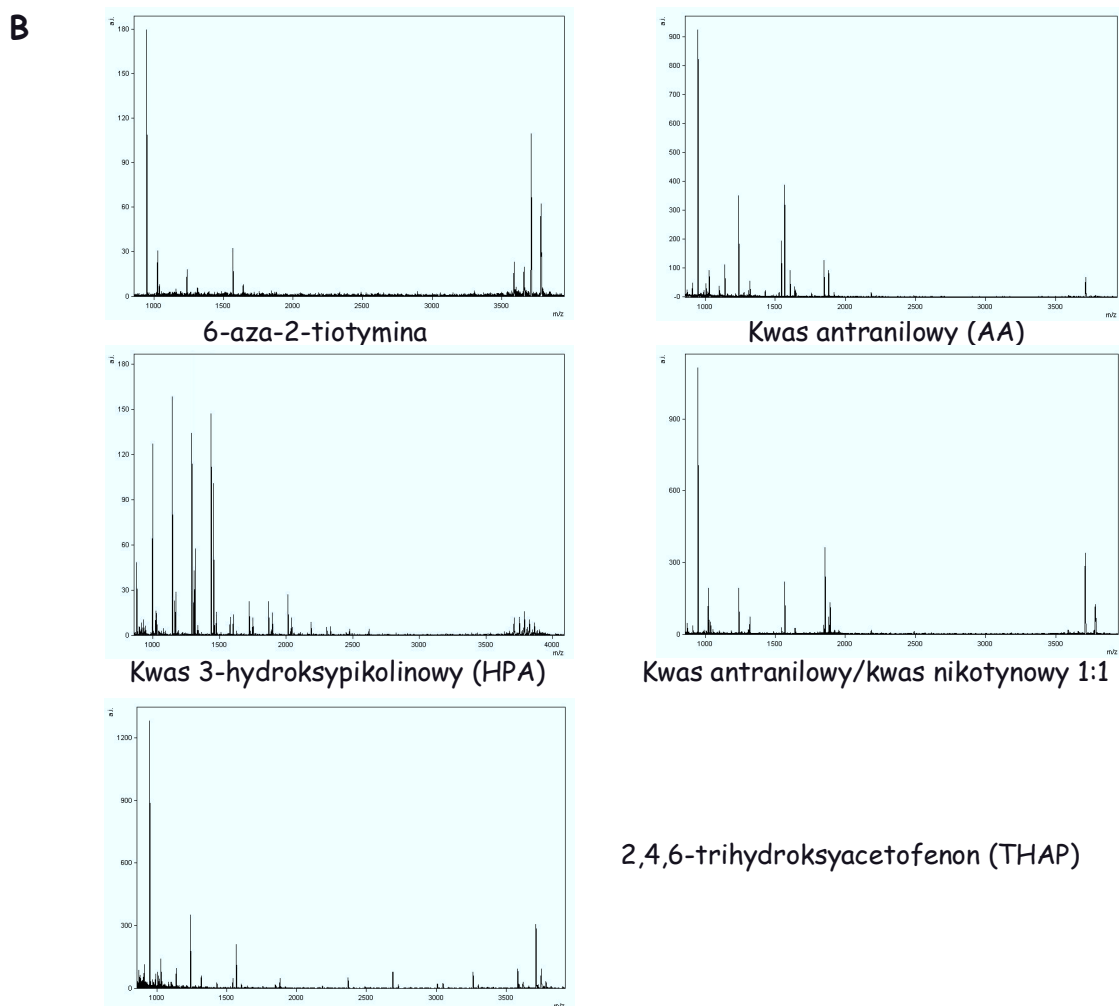
sprawdzić jak rodzaj stosowanej matrycy wpłynie na obraz w widmie MALDI modelowego oligonukleotydu. Na podstawie danych literaturowych, wzięłam pod uwagę następujące matryce:

- kwas 3-hydroksypikolinowy – HPA,
- kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy – DHBA,
- 6-aza-2-tiotyminę – ATT,
- 2,4,6-trihydroksyacetonfenon – THAP,
- kwas nikotynowy – NA,
- kwas antranilowy – AA,
- kwas antranilowy/kwas nikotynowy (1:1) – AA/NA.

W wyborze odpowiedniej do moich celów, matrycy kierowałam się dwiema przesłankami. Po pierwsze, rodzajem kryształów, które tworzą jej cząsteczki. Po wtóre, liczbą rejestrowanych za jej pomocą sygnałów, pochodzących od produktów syntezy oligonukleotydu. Zależało mi na znalezieniu takiej matrycy, która tworzyłaby drobne kryształki pokrywające cały obszar spotu równomierną cienką warstwą. Efekty tych poszukiwań przedstawiam w postaci zdjęć spotów pokrytych kryształkami poszczególnych matryc oraz widm oligonukleotydu o sekwencji 5'-d(CCA GTT AGC AAT)-3' (**KON29**), [M-H]⁻ 3708,41Da, z użyciem tych matryc (**Rys. 46**).



Rys. 43. A – Zdjęcia spotów pokrytych kryształami różnych matryc.



Rys. 46. B – Widma MALDI oligonukleotydu **KON29** o sekwencji 5'-d(CCA GTT AGC AAT)-3' wykonane z użyciem pięciu różnych matryc.

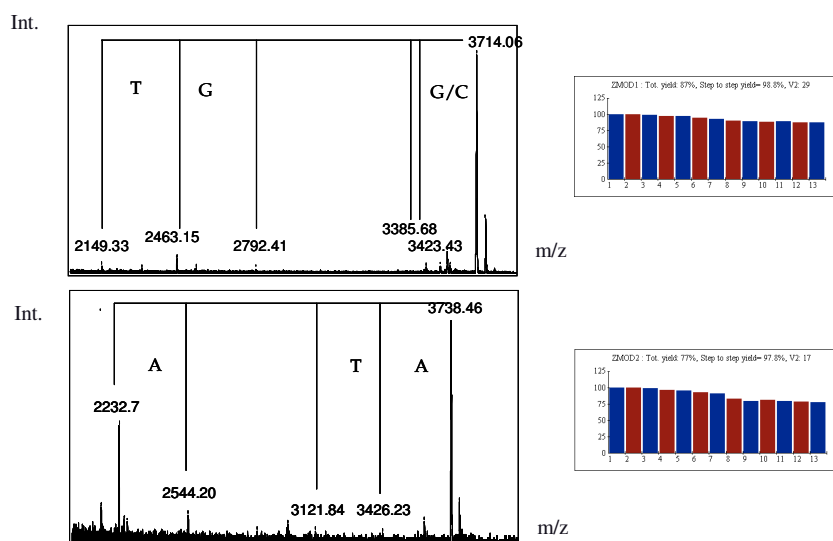
Nie udało mi się zarejestrować widm oligonukleotydu przy użyciu dwóch spośród wybranych matryc: kwasu nikotynowego oraz DHB. W widmach wykonanych z zastosowaniem HPA oraz kwasu antranilowego dominują sygnały pochodzące od krótkich fragmentów oligonukleotydu. Z kolei użycie 6-aza-2-tiotyminy, jako matrycy MALDI, pozwala na rejestrację głównie sygnału pochodzącego od oligonukleotydu o pełnej długości. Poza tym otrzymałam sygnały o niskiej intensywności. Spośród testowanych matryc wybrałam 2,4,6-trihydroksyacetofofenon (THAP) i tę matrycę stosowałam konsekwentnie w dalszych badaniach. Wybór ten podyktowany był najlepszymi, według mnie, właściwościami tego związku jako matrycy do analizy MALDI elementów oligonukleotydowych bibliotek kombinatorycznych. THAP tworzy drobne kryształki pokrywające cały spot cienką warstwą, a wykonane z jej użyciem widma są dobrej jakości (rozdzielczość, intensywność sygnałów, stosunek sygnału do szumu). Jednakże najważniejszą zaletą stosowania THAP jako matrycy MALDI w rozpatrywanym tu przypadku jest fakt, że, inaczej niż w przypadku pozostałych

matrycy, w otrzymanych z jej użyciem widmach obserwowałam sygnały pochodzące od wszystkich produktów chemicznej syntezy badanego oligonukleotydu.

6.1. Sterowanie wydajnością syntezy oligonukleotydu

Opisany powyżej eksperyment ukazuje wpływ matrycy na obraz obserwowany w widmie odciętego od podłoża oligonukleotydu, a co za tym idzie, na możliwość odczytania sekwencji oligonukleotydu. W niektórych przypadkach, zależnych od przebiegu syntezy, obserwacja wszystkich krótszych fragmentów oligonukleotydu powstałych podczas chemicznej syntezy nie jest możliwa. Jak pisałam w rozdziałach 4.2.3 i 4.3.2 tej części pracy, wydajność etapowa chemicznej syntezy oligonukleotydu wynosi nie więcej niż 99,9%. Ilości krótszych fragmentów stanowią zaledwie ułamek procenta głównego produktu syntezy, którym jest najdłuższy oligonukleotyd. W widmie obserwowany jest jako sygnał o najwyższym stosunku masy do ładunku i raczej wysokiej intensywności. Rzadko jednakże bywa najintensywniejszym sygnałem w widmie MALDI. Najwyższą intensywność wykazują sygnały pochodzące od krótkich fragmentów – do 2,4kDA. Jest to związane z faktem, że im wyższą masę posiada dany oligonukleotyd tym większy nakład energii jest potrzebny, by przeprowadzić go w stan gazowy (**Część II; 3**). Sygnały o wysokiej intensywności pochodzące od fragmentów nikocząsteczkowych obniżają względną intensywność sygnałów pochodzących od fragmentów o wyższej masie, które „giną w tle” i nie są obserwowane w widmie. Odczytanie sekwencji oligonukleotydu staje się niemożliwe [95].

W celu zwiększenia liczby krótszych fragmentów powstających podczas chemicznej syntezy oligonukleotydu, podjęłam próby sterowania wydajnością syntezy. W tym celu zmodyfikowałam cykl syntetyczny automatycznego syntetyzera DNA/RNA, skracając o połowę wartości początkowej czasu operacji: podawania (z 6” do 3”) oraz przebywania (z 3’50” do 1’55”) amidofosforynów nukleozydów w wypełnionej podłożem kolumnie (zmniejszyłam tym samym stosowane nadmiary amidofosforynów nukleozydów). Zsyntezowałam następnie 10 oligonukleotydów o różnych sekwencjach. Analizator spektralny syntetyzera wskazywał stopniowy spadek wydajności syntezy. Wykonałam analizę MALDI produktów tych syntez. Reprezentatywne widma przedstawiam na rysunku (**Rys. 47**).



Rys. 47. Widma MALDI oraz graficzne przedstawienie przebiegu syntezy oligonukleotydów na podstawie pomiaru absorpcji UV względem kationu trytylowego w zmodyfikowanym cyklu. **ZMOD1:** 5'-d(CTG GGT CGA TAA)-3' i **ZMOD2:** 5'-d(ATA CAA GGT AAA)-3'.

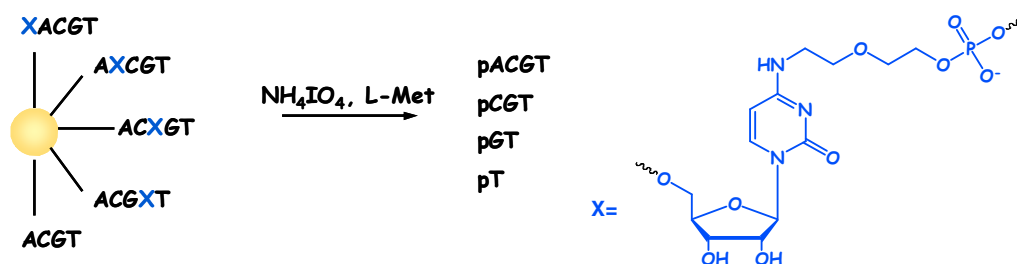
Niestety, nie udało się osiągnąć w ten sposób zamierzonego efektu. W widmach MALDI oligonukleotydów zsyntetyzowanych według zmodyfikowanego protokołu syntezy w dalszym ciągu nie obserwowałam sygnałów pochodzących od wszystkich krótszych fragmentów powstających podczas syntezy oligonukleotydu, reprezentujących jego sekwencję. W różnych miejscach w widmach pojawiały się luki w seriach sygnałów. Niemożliwa była więc rekonstrukcja sekwencji. Prawdopodobnie wydajność etapowa syntezy na poziomie 95%-98% nie jest wystarczająco niska, by powstałe w jej wyniku fragmenty były widoczne w widmie MALDI. Poza tym, ze względu na budowę syntetyzera, w ten sposób może dochodzić do niejednorodności syntezy w całej puli podłoża. Główną wadą tego działania jest zatem brak kontroli nad całkowitą wydajnością syntezy i jej poszczególnych etapów, a co za tym idzie nad ilością powstających podczas syntezy krótszych oligonukleotydów.

6.2. Kontrolowane generowanie krótszych fragmentów

6.2.1. Metoda rozcinania łańcucha polimeru

Sterowanie wydajnością syntezy poprzez zmniejszenie stosowanych do syntezy nadmiarów amidofosforynów nukleotydów nie doprowadziło do rozwiązania problemu. Jednak sama idea generowania krótszych fragmentów wydała mi się bardzo ciekawa. Rozpatrzyłam więc inne drogi prowadzące do tego celu.

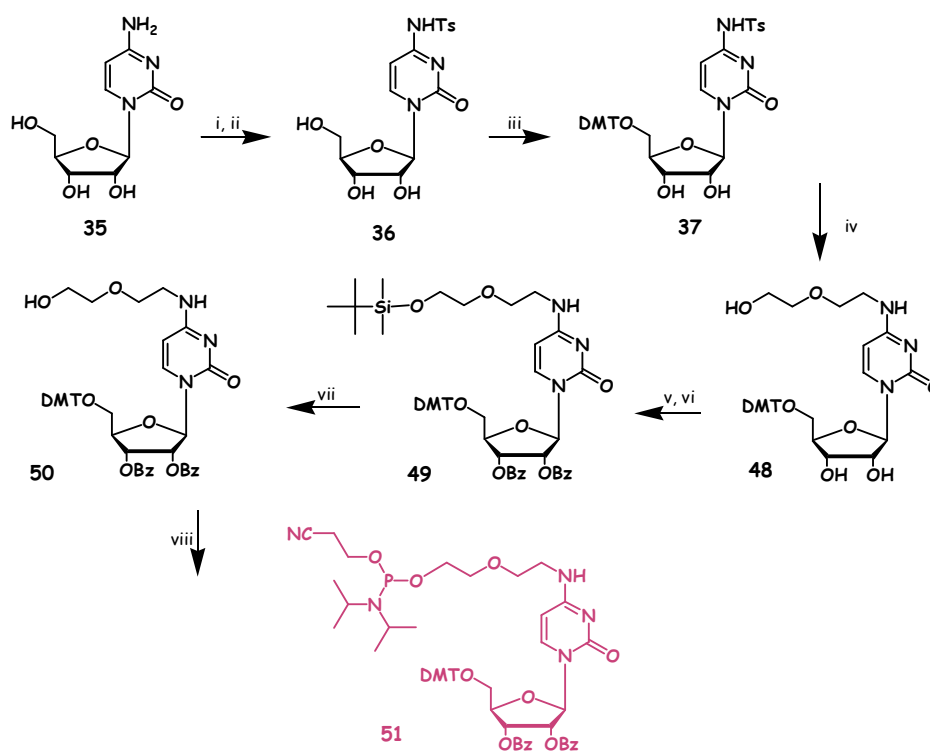
Jedną z możliwości uznałam za wyjątkowo atrakcyjną. Jest to generowanie różnej długości fragmentów polimeru w wyniku rozcięcia łańcucha oligomeru. To podejście, w różnych wersjach, stosowano do sekwencjonowania elementów bibliotek peptydowych [76-78]. Metodę szerzej opisałam w rozdziale 3.2.3 (Część I) pracy. Polega ona na wprowadzeniu w każdą pozycję polimerycznego łańcucha, takiego elementu strukturalnego, który w określonych warunkach może ulec rozszczepieniu. Ugrupowanie to musi pojawić się tylko w pewnej, niewielkiej części łańcuchów zgromadzonych na ziarnie podłoża i nie częściej niż jeden raz w każdym z nich, aby w warunkach, w których następuje degradacja tego układu możliwe było wygenerowanie fragmentów różnej długości.



Rys. 48. Zasada metody kontrolowanego generowania krótszych fragmentów w wersji wykorzystanej w niniejszej pracy

Zaadaptowałam to rozwiązanie do swoich celów. Postanowiłam trwale zakotwiczyć bibliotekę oligonukleotydową na ziarnie podłoża, a w roli „przecinka” obsadzić modyfikowaną cytydynę (Rys. 48). Przy takiej konstrukcji biblioteki, pod wpływem nadjodanu, a następnie aminy, może nastąpić uwolnienie tylko tych fragmentów oligonukleotydu, w których sekwencji znalazł się „przecinek”. Większość materiału musi pozostać związana z podłożem. W przypadku syntezy dekamerów wprowadzenie „przecinka” do około 10% oligonukleotydowych łańcuchów pozwala przypuszczać, że w każdym z nich pojawi się on nie częściej niż raz, a otrzymane w wyniku jego rozszczepienia fragmenty będą reprezentowały całą sekwencję. Według rozkładu prawdopodobieństwa liczba powstałych fragmentów będzie w przybliżeniu jednakowa niezależnie sekwencji oligonukleotydu. Piszę tu o pewnym oszacowaniu, rozkładzie statystycznym, ponieważ dokładne określenie liczby cząsteczek, która zostanie włączona do jednej nici oligonukleotydu nie jest możliwe. Niemniej, ilość uwolnionych fragmentów teoretycznie powinna być wystarczająca do wykonania analizy MALDI. Z drugiej strony, niewielki udział procentowy „przecinka” w ogólnej ilości oligonukleotydu nie powinien mieć dużego wpływu na właściwości chemiczne i biologiczne otrzymanego związku.

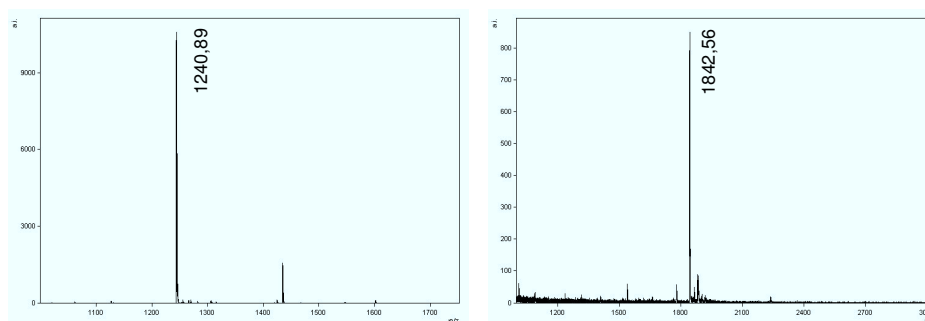
Synteze „przecinka”, czyli 4-N-[2-(2-O-amidofosforyno)etylo]etylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyny (**51**), przeprowadziłam w siedmiu krokach (**Schemat 14**). Funkcje hydroksylowe cytydyny zablokowałam czasowo grupami trimetylosililowymi, a następnie przeprowadziłam reakcję z chlorkiem kwasu *p*-toluenosulfonowego. Następnie zablokowałam funkcję 5'-hydroksylową za pomocą chlorku 4,4'-dimetoksytrytylu. Otrzymany produkt (**37**) oczyściłam i poddałam działaniu aminoetoksyetanu, otrzymując 4-N-(2-(2-hydroksyetoksy)etylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynam (**48**). Pierwszorzędową funkcję hydroksylową podstawnika etoksyetylowego zablokowałam chlorkiem *tert*-butyloдимetylosililowym, a drugorzędowe grupy 2'- i 3'-OH chlorkiem benzoilu. Następnie blokadę sililową usunęłam za pomocą fluorku trietyloamoniowego. Otrzymałam 4-N-(2-(2-hydroksyetoksy)etylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynam (**50**), którą przeprowadziłam w amidofosforin **51** według standardowej procedury.



Schemat 14. i) TMSCl, Py; ii) TsCl, Py; iii) DMTCl, Py; iv) aminoetoksyetanol, Py; v) *tert*-BDMSCl, Py; vi) BzCl, Py; vii) TEAF, THF; viii) bis(diizopropylamino)-(2-cyanoetylo)-fosfina, tioetylotetrazol, CH₂Cl₂.

Zsyntezowałam trzy krótkie oligonukleotydy, wprowadzając amidofosforin 4-(2-(2-hydroksyetoksy)etyloamino)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynam (**Cyt^{OFA}**) na początku i w środku sekwencji: 5'-TTT TTTX-3' (**KON3**), 5'-TTTTXTTT-3' (**SROD**). Doświadczenie to miało na celu sprawdzenie zachowania reszty 4-N-(2-(2-hydroksyetoksy)etylo)cytydynam w roli „przecinka”. Syntezę przeprowadziłam na podłożu polistyrenowym sfunkcjonalizowanym

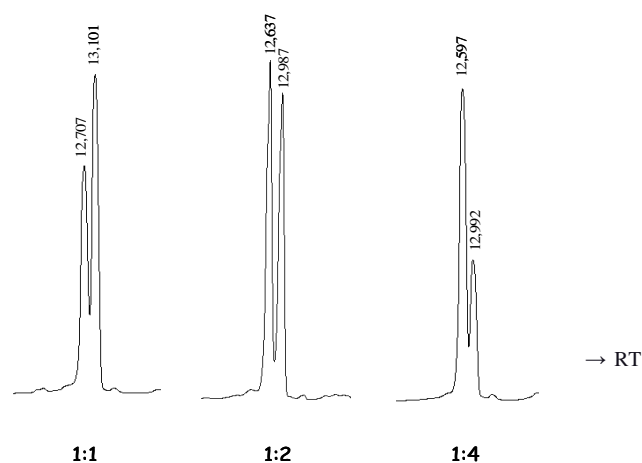
grupami metyloaminowymi, uzyskując trwałe połączenie oligonukleotydu z podłożem. Po odblokowaniu grup funkcyjnych obu oligonukleotydów, wybrałam po jednym ziarnie z każdej sekwencji i poddałam działaniu roztworów NH_4IO_4 oraz metioniny. Następnie roztwory zebrane znad ziaren podłoża poddałam analizie MALDI. Otrzymane widma prezentuję na rysunku (**Rys. 49**).



Rys. 49. Widma MALDI: **A** – oligonukleotydu **SROD** $[\text{M-H}]^-$ 1240,79, **B** – oligonukleotydu **KON** $[\text{M-H}]^-$ 1842,19.

Struktura „przecinka” odbiega od budowy standardowych amidofosforynów nukleozydów. Centrum fosforowe nie znajduje się w strukturalnie sztywnej części cukrowej, lecz na końcu giętkiego łańcucha etoksyetylowego. Przypuszczałam, że fakt ten może mieć wpływ na reaktywność „przecinka” względem standardowych amidofosforynów nukleozydów. Przygotowałam roztwory, w których mieszałam amidofosforyny: 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyny oraz 4-(2-(2-hydroksyetoksy)etyloamino)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyny w różnych stosunkach molowych (1:1; 1:2; 1:4). Następnie użyłam je do syntezy oligonukleotydu **T/Cyt**, o sekwencji 5'-d(XTT TTT)-3'. Pod symbolem X kryje się mieszanina fosforanów: 4-(2-(2-hydroksyetoksy)etyloamino)cytydyny oraz tymidyny. Syntezę przeprowadziłam na handlowo dostępnym podłożu 5'-DMT-T-SuccCPG.

Po odłączeniu od podłoża i odblokowaniu, oligonukleotyd poddałam analizie HPLC w celu wyznaczenia reaktywności względnej „przecinka”. Czasy retencji oligonukleotydów 5'-d(TTT TTT)-3' (**6T**) oraz 5'-Cyt d(TTT TT)-3' (**5TCyt**) różniły się nieznacznie. Zgodnie z przewidywaniami czas retencji **5TCyt** był krótszy od **6T**. Stwierdziłam, że amidofosforyn 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-4-(2-(2-hydroksyetoksy)etyloamino)cytydyny charakteryzuje nieco niższa reaktywność w stosunku do amidofosforynu 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyny (**Rys. 50**). Na podstawie stosunku powierzchni pików obliczyłam średni stosunek molowy, w którym należy mieszać amidofosforyn nukleozydu oraz Cyt^{OFA} , aby podczas syntezy oligonukleotydu wbudowały się do nici w stosunku 9:1 (**Tabela 4**).



Rys. 50. Chromatogramy przedstawiające oligonukleotyd **T/Cyt**, o sekwencji 5'-d(TTT TTX)-3', w którym na ostatniej pozycji włączono amidofosforyny: 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyny oraz 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-4-(2-(2-hydroksyetoksy)etyloamino)cytydyny zmieszane w różnych stosunkach molowych (1:1; 1:2; 1:4).

Tabela 4. W tabeli przedstawione są dane eksperymentalne, które posłużyły do wyznaczenia stosunku molowego standardowych amidofosforynów i czynników terminujących, w którym należy je ze sobą mieszać do syntezy oligonukleotydu.

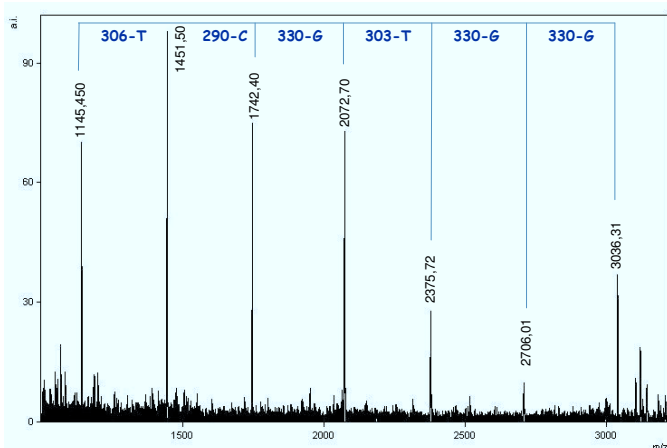
Reczywisty stosunek molowy FAdT:Cyt ^{OFA}	Czas retencji	Powierzchnia piku	Stosunek pow. pików	Obliczony stosunek molowy FAdT/Cyt ^{OFA} *	Średnia arytmetyczna	Stosunek molowy FAdT/Cyt ^O FA do syntezy											
1:1	12,707	3161142	0,821	1:1,21	1:1,52	9:1,368											
	13,101	2850507					1:2	12,637	6227844	1,100	1:1,81	12,987	5657521	1:4	12,597	8428939	2,555
1:2	12,637	6227844	1,100	1:1,81													
	12,987	5657521					1:4	12,597	8428939	2,555	1:1,56	12,992	3298464				
1:4	12,597	8428939	2,555	1:1,56													
	12,992	3298464															

* taki stosunek molowy FAdT/Cyt^{OFA}, którego zastosowanie podczas syntezy skutkuje przyłączeniem do nici oligonukleotydu obu jednostek w stosunku 1:1

Przygotowałam 0,1M roztwory wszystkich czterech amidofosforynów nukleozydów i Cyt^{OFA}, które mieszałam w stosunku molowym 9:1,368 (**Tabela 4**). Użyłam je następnie do syntezy oligonukleotydu o sekwencji: 5'd(GCT ACA GCA)-3' (**WMSC**). Oligonukleotyd syntetyzowałam na podłożu polistyrenowym funkcjonalizowanym grupami metyloaminowymi **11**, bez stosowania łącznika. W ten sposób uzyskałam trwałe połączenie oligonukleotydu z podłożem, a pod wpływem działania nadjodanu, a następnie metioniny może nastąpić odłączenie tylko tych fragmentów oligonukleotydu, w których znalazł się „przecinek” (około 10% sekwencji zgromadzonych na ziarnie podłoża). Po odblokowaniu,

wybraniu jednego ziarna i rozszczępieniu układu *cis*-diolowego „przecinka” roztwór zebrany znad podłoża poddałam analizie MALDI. Okazało się, że dziesiąta część materiału zgromadzonego na jednym ziarnie podłoża jest ilością za małą do otrzymania widma, w którym obserwowane byłyby sygnały pochodzące od oligonukleotydu pełnej długości oraz wszystkich fragmentów powstałych w wyniku rozszczępienia „przecinka”. W widmach widoczne są jedynie sygnały pochodzące od fragmentów oligonukleotydu, których masy nie przekraczają 3kDa. Poza tym wszystkie otrzymane widma charakteryzuje zła jakość (niski stosunek sygnału do szumu).

Zwiększyłam udział procentowy „przecinka” w ogólnej liczbie łańcuchów oligonukleotydowych poprzez użycie do syntezy oligonukleotydu mieszaniny standardowych amidofosforynów nukleozydów z Cyt^{OFA} w stosunku molowym 1:1. Zwiększyłam tym samym ilość modyfikowanej cytydyny 50-krotnie. Następnie przeprowadziłam syntezę oligonukleotydu o sekwencji 5'-d(GGT GCT TTA T)-3' (**WMSCP**). Po odłączeniu fragmentów oligonukleotydu od podłoża (NH₄IO₄ i L-metionina) zaobserwowałam w widmie wszystkie sygnały niezbędne do rekonstrukcji sekwencji oligonukleotydu (**Rys. 51**).



Rys. 51. Widmo MALDI oligonukleotydu WMSCP po odłączeniu fragmentów od podłoża za pomocą NaIO₄ i L-metioniny.

Mimo, że zwiększenie ilości substancji pomocniczej na ziarnie podłoża pozwoliło osiągnąć cel, jest to działanie ryzykowne, ponieważ znaczny wzrost liczby modyfikacji obecnych w łańcuchu oligonukleotydu prowadzi do zmiany właściwości docelowego związku. Idea syntezy bibliotek kombinatorycznych jest ściśle związana z poszukiwaniem substancji o określonych właściwościach. W związku z tym zmiana własności związków otrzymanych na drodze syntezy kombinatorycznej, poprzez wprowadzenie „obcych” elementów strukturalnych, pozostaje w bezpośrednim konflikcie z celowością tworzenia bibliotek. To rozwiązanie sprawdziło się w przypadku zastosowania do niskocząsteczkowych

łańcuchów peptydowych, niemniej jego ograniczeniem okazała się długość, a co za tym idzie masa oligomeru.

6.1.2. Metoda czynników terminujących chemiczną syntezę oligonukleotydu

Ze względu na napotkane problemy, zrezygnowałam z użycia „przecinka” i wykorzystałam inną metodę kontrolowanego generowania krótszych fragmentów podczas chemicznej syntezy oligonukleotydu. Po raz pierwszy podejście to zastosowano w celu rozwiązania problemu sekwencjonowania bibliotek peptydowych [73, 74]. Polegało ono na zatrzymywaniu wydłużania około 10% łańcuchów na każdym z etapów syntezy biblioteki peptydowej. Czynnikiem zatrzymującym wzrost łańcucha była N-acetylo-D,L-alanina. Użyto ją jako 10% dodatek do standardowych jednostek aminokwasowych stosowanych do syntezy peptydów. Metodę opisałam szerzej w podrozdziale 3.2.3 (Część I).

Zasadniczym celem mojej pracy doktorskiej było opracowanie ogólnej procedury sekwencjonowania dla bibliotek oligonukleotydowych, pozwalającej na poznanie struktury jej elementów, niezależnie od ich sekwencji, długości, czy też rodzaju i liczby wprowadzonych modyfikacji. Procedura terminacji chemicznej syntezy powstała na użytek sekwencjonowania bibliotek peptydowych. W związku z tym w oryginalnej postaci można ją było wykorzystać jedynie w stosunku do krótkich oligomerów. Zastosowanie jej w chemii oligonukleotydów wymagało wprowadzenia pewnych modyfikacji.

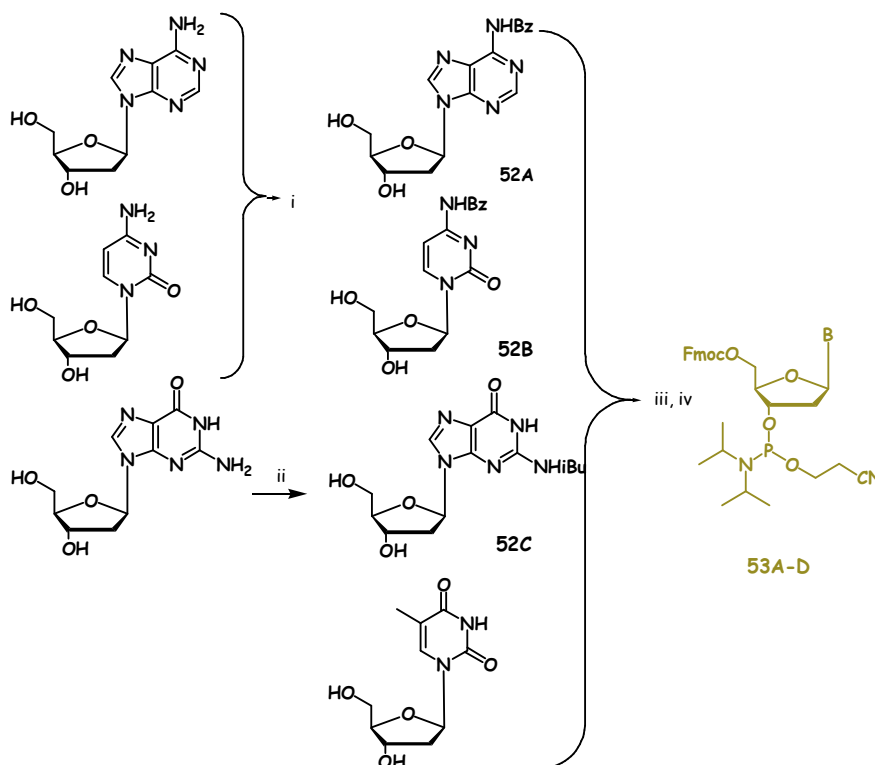
Zastosowanie jednego czynnika terminującego, niezależnie od rodzaju przyłączanej w danym etapie jednostki prowadzi do otrzymania dwóch rodzajów produktów – będących wynikiem terminacji i tych, które powstają w wyniku niekompletnego sprzęgania kolejnych jednostek oligomeru. W przypadku bibliotek peptydowych argumentem przemawiającym za takim rozwiązaniem było duże zróżnicowanie rodzaju stosowanych monomerów. Jednakże zastosowanie takiego podejścia w chemii dłuższych oligomerów, jakimi są oligonukleotydy wprowadziłoby chaos utrudniający interpretację oraz jednoznaczną identyfikację sygnałów w widmach MALDI. Moim zamiarem było wzbogacenie liczby krótszych fragmentów oligonukleotydu powstających podczas jego syntezy chemicznej, a nie wprowadzenie nowych.

Zaprojektowałam serię terminatorów syntezy oligonukleotydu tak, by odpowiadały opisanym powyżej założeniom. Chemiczna synteza oligonukleotydu biegnie w kierunku odwrotnym do enzymatycznej ($3' \rightarrow 5'$). Standardowe 3'-amidofosforyny nukleotydów mają zablokowaną funkcję 5'-hydroksylową za pomocą kwasolabilnej grupy 4,4'-dimetoksytrytylowej. Podczas syntezy oligonukleotydu po każdym etapie kondensacji nukleotydu, acetylowaniu pozostałych po tym procesie wolnych grup hydroksylowych, a w

końcu utlenieniu centrum fosforowego, następuje odblokowanie funkcji 5'-OH i cykl się powtarza. Jedną z możliwości wygenerowania czynnika terminującego jest użycie do syntezy oligonukleotydu 3'-amidofosforynu nukleozydu z funkcją 5'-hydroksylową zablokowaną za pomocą grupy trwałej w jej warunkach. Postanowiłam użyć do tego celu blokadę fluorenylometyloksykarbonylową (Fmoc). Jest to grupa zasadolabilna, która w roztworze amoniaku, stosowanym do usunięcia grup ochronnych oligonukleotydu, bardzo łatwo ulega odblokowaniu na drodze β -eliminacji, uwalniając funkcję 5' hydroksylową reszty nukleozydowej.

Syntezę amidofosforynów nukleozydów z zasadolabilną grupą Fmoc w pozycji 5' hydroksylowej przeprowadziłam w trzech etapach:

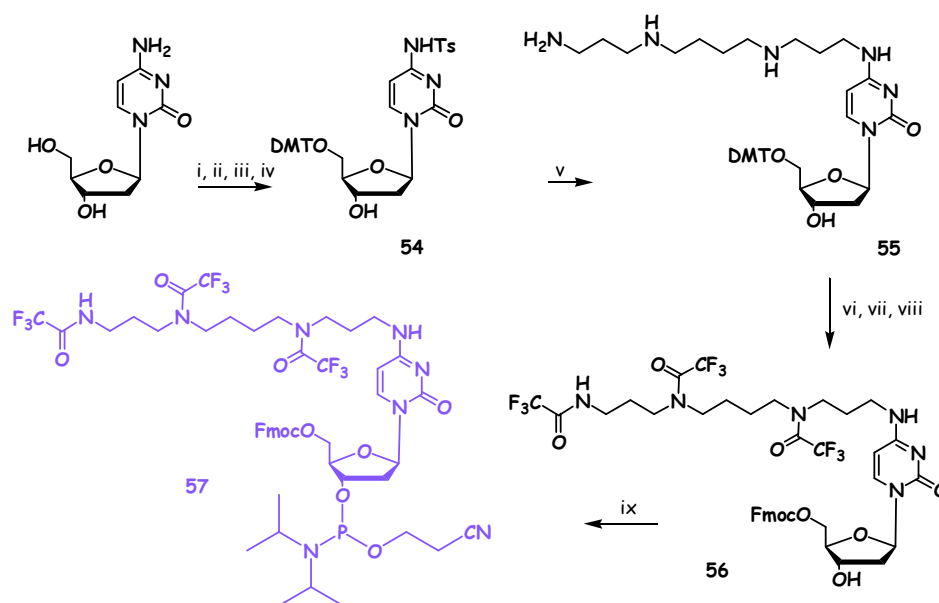
- blokowanie funkcji aminowej, w przypadku adeniny i cytydyny użyłam blokady benzoilowej, dla guanozyny – *izo*-butyrylowej,
- blokowanie funkcji 5'-hydroksylowej grupą fluorenylometyloksykarbonylową,
- otrzymanie 3'-amidofosforynów nukleozydów (**Schemat 15**).



Schemat 15. i) chlorek benzoilu, Py; ii) chlorek *izo*-butyrylu, Py; iii) chlorek fluorenylometyloksykarbonylu, Py; iv) bis(diizopropylamino)-(2-cyanoetylo)-fosfina, tioetylotetrazol, CH_2Cl_2 .

Otrzymałam również 3'-amidofosforyn 4-N-[tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksycytydyny (**57**), który miał następnie posłużyć mi do syntezy modelowej biblioteki kombinatorycznej. Posłużyłam się

procedurą opracowaną przez dr Przemysława Godzinę [239, 240]. Funkcje hydroksylowe cytydyny zablokowałam na czas reakcji z chlorkiem kwasu *p*-toluenosulfonowego grupami trimetylosililowymi. Następnie funkcję 5'-OH zablokowałam chlorkiem 4,4'-dimetoksytrytylu, otrzymując 4-N-*p*-toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deokscytydynam (54). W następnym etapie związek 54 poddałam reakcji z 10-krotnym nadmiarem sperminy. Blokadę 4,4'-dimetoksytrytylową wprowadziłam po to, by zwiększyć lipofilowość związku i umożliwić następnie oddzielenie go od nadmiaru aminy. Nie mogłam bezpośrednio wprowadzić blokady fluorenylometyloksykarbonylowej (Fmoc), ponieważ w obecności sperminy nastąpiłaby jej β -eliminacja. Następnie zablokowałam funkcje aminowe reszty sperminy 4-N-(4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deokscytydynam (55) za pomocą bezwodnika kwasu trifluorooctowego, odblokowałam funkcję 5' hydroksylową kwasem dichlorooctowym i ponownie zablokowałam za pomocą chlorku fluorenylometyloksykarbonylowego. 4-N-[Tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-fluorenylometyloksy-karbonylo-2'-deokscytydynam (56) przeprowadziłam w amidofosforyn 57 według standardowej procedury.



Schemat 16. i) TMSCl, Py; ii) chlorek kwasu *p*-toluenosulfonowego, Py; iii) 32% roztwór wodny NH₃; iv) DMTCl, Py; v) spermina, Py; vi) bezwodnik kwasu trifluorooctowego, Py; vii) CHCl₂COOH, CH₂Cl₂; viii) FmocCl, Py; ix) bis(diizopropylamino)-(2-cyanoetylo)-fosfina, tioetylotetrazol, CH₂Cl₂.

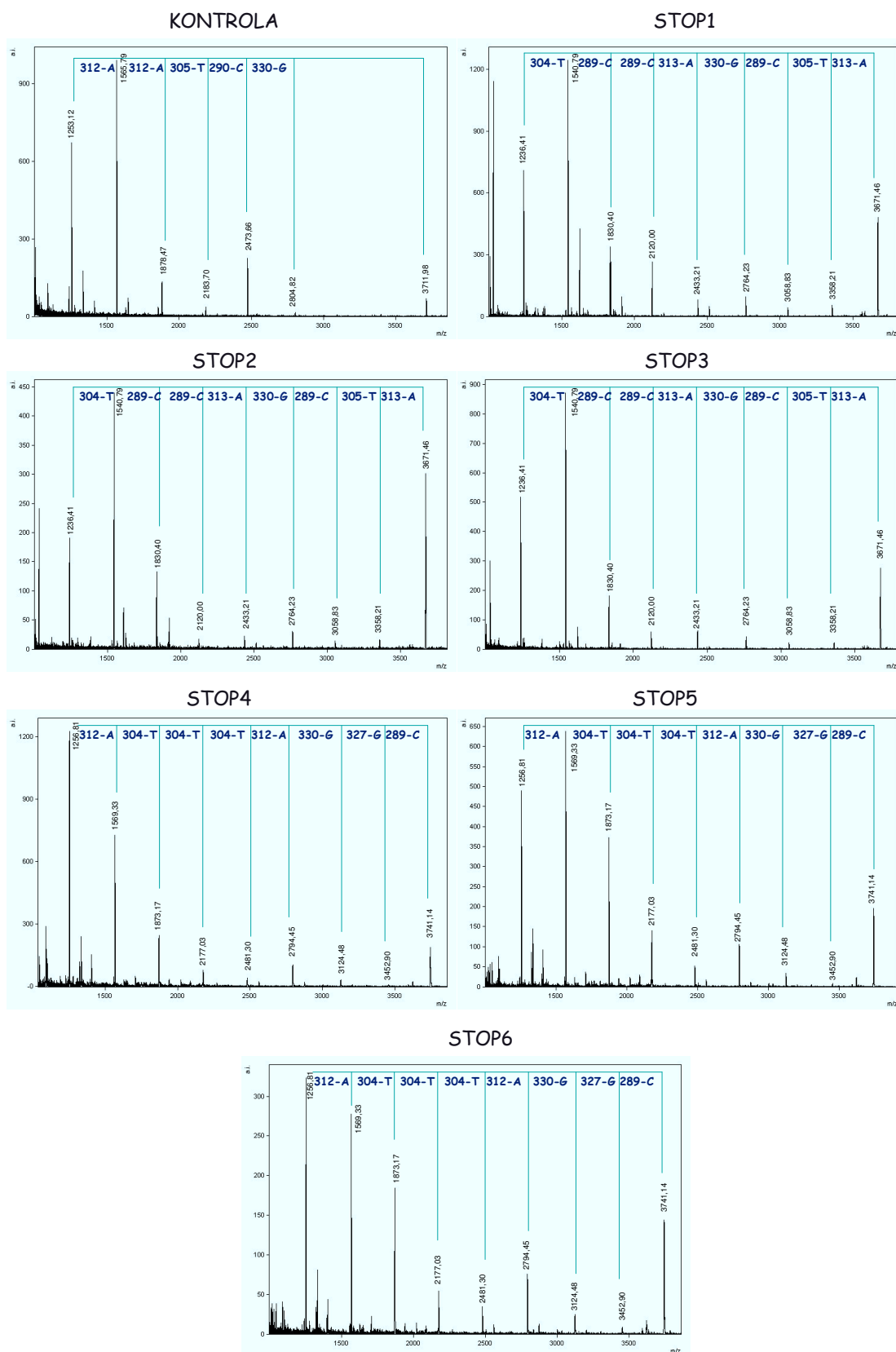
Na podstawie przeprowadzonych i opisanych wcześniej doświadczeń mogłam stwierdzić, że w widmach MALDI surowej mieszaniny oligonukleotydu otrzymanego w wyniku chemicznej syntezy według standardowego protokołu widoczne są intensywne sygnały

pochodzące od krótkich fragmentów oligonukleotydu. Masy tych fragmentów rzadko przekraczają 2400Da. Jest to masa odpowiadająca oktamerowi. Kolejnym sygnałem widocznym w widmie jest najczęściej dopiero pik pochodzący od oligonukleotydu pełnej długości. W widmie w zakresie mas od 2400Da do masy (niezależnie od jej wielkości) oligonukleotydu pełnej długości znajduje się rejon, w którym nie obserwowałam w widmach MALDI sygnałów pochodzących od fragmentów powstałych w wyniku chemicznej syntezy. Uznałam za bezcelowe stosowanie terminatorów syntezy od samego jej początku i wprowadziłam je dopiero od ósmej pozycji oligonukleotydu, by wygenerować tylko deficytowe fragmenty.

Zmieszałam standardowe 3'-amidofosforyny nukleozydów wraz czynnikami terminującymi w stosunku molowym 9:1. Przygotowane roztwory użyłam do syntezy oligonukleotydów. Na podłożu oksylabilnym **45** (Schemat 11) zsyntezowałam 20 dodekamerów o różnej i tej samej sekwencji, aby przetestować powtarzalność wyników metody. Następnie z każdej zsyntetyzowanej puli wybrałam po trzy ziarna podłoża i każde z osobna poddałam procedurze odłączenia od podłoża. Uwolnioną mieszaninę oligonukleotydów analizowałam za pomocą MALDI. Za każdym razem w widmie MALDI obserwowałam sygnały pochodzące od wszystkich krótszych fragmentów oligonukleotydu. To doświadczenie, pozwoliło mi przekonująco wykazać, że zastosowanie czynników terminujących do syntezy oligonukleotydu umożliwia odczytanie sekwencji oligomeru na podstawie różnicy mas pomiędzy sąsiednimi sygnałami obecnymi w widmie MALDI. Przykładowe widma przedstawiłam na rysunku (Rys. 52).

Podsumowując:

- zaprojektowałam i zsyntezowałam serię czynników terminujących chemiczną syntezę oligonukleotydu,
- na podłożu **45** zsyntezowałam 20 oligonukleotydów o różnych oraz takich samych sekwencjach, wykorzystując czynniki terminujące jako 10% dodatek do standardowych amidofosorynów nukleotydów,
- czynniki terminujące wprowadziłam do sekwencji oligonukleotydu dopiero od ósmej pozycji, co pozwoliło wygenerować brakujące fragmenty,
- wykonałam analizę MALDI oligonukleotydów zgromadzonych na jednym ziarnie podłoża i pochodzącym z 20 różnych eksperymentów. W każdym przypadku obserwowałam serię sygnałów reprezentujących całą sekwencję oligonukleotydu.



Rys. 52. Zestawienie widm MALDI: oligonukleotydu kontrolnego KONTROLA – 5'-d(ATC GCT AAA TGC)-3' i oligonukleotydów zsytyzowanych z użyciem czynników terminujących STOP1-3 – 5'-d(ATC GAC CTC AAT)-3', STOP4-6 – 5'-d(CGG ATT TAT GCA)-3'.

7. Sprawdzenie opracowanej metody sekwencjonowania na modelowej kombinatorycznej bibliotece oligonukleotydojowej

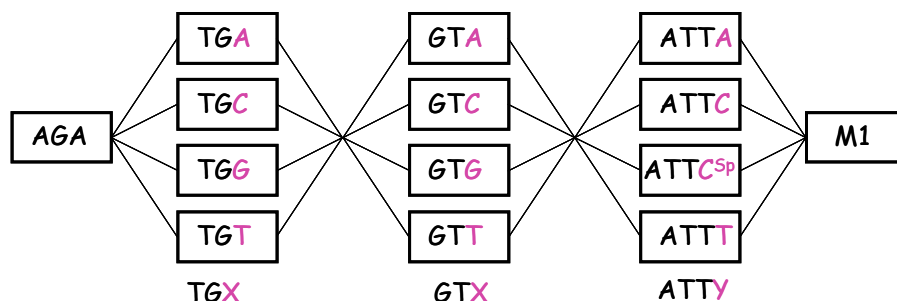
W celu sprawdzenia w praktyce opracowanej przeze mnie metody sekwencjonowania elementów kombinatorycznych bibliotek oligonukleotydojowych zaprojektowałam i zsyntezowałam modelową bibliotekę oraz sondę fluorescencyjną do jej analizy. Do zaprojektowania sekwencji biblioteki kombinatorycznej skorzystałam z programu OLIGO, opracowanego do projektowania starterów oligonukleotydojowych do reakcji PCR [241]. Pozwala on na analizę sekwencji oligonukleotydojów pod kątem ich właściwości, takich jak autokomplementarność, zdolność do tworzenia struktur szpilkowych itp. Chodziło mi o to, by oligonukleotydy wchodzące w skład biblioteki kombinatorycznej nie były zaangażowane w oddziaływania utrudniające proces hybrydyzacji z sondą. Ostatecznie wybrałam sekwencję, w której umieściłam trzy zrandomizowane pozycje: 5'-d(ATT YGT XTG XAG A)-3', gdzie X jest jedną z czterech zmiennych: dA, dC, dG lub dT, a Y: dA, dT, dC lub dC^{Sp}. Otrzymany w ten sposób zbiór związków składa się z $4 \times 4 \times 4 = 64$ różnych elementów. Sekwencję sondy fluorescencyjnej wybrałam tak, by była w pełni komplementarna do jedynie dwóch spośród 64 możliwych sekwencji modelowej biblioteki. W warunkach tworzenia dupleksu nie zamierzałam różnicować oddziaływań reszt dC i dC^{Sp}. Sekwencja sondy jest następująca: 5'-d(C^{Ts}TC TGC AGA CGA AT)-3', gdzie dC^{Ts} jest tosylowaną w pozycji N-4 resztą cytydyny. Sekwencja modelowej biblioteki:



7.1. Synteza modelowej oligonukleotydojowej biblioteki kombinatorycznej

Kombinatoryczną bibliotekę oligonukleotydojową otrzymałam metodą dzieloną opisaną w rozdziale 2 pracy (Część I), na zaprojektowanym i zsyntezowanym przeze mnie „podłożu oksylabilnym” (45). Na umieszczonej w kolumnie porcji podłoża zsyntezowałam sekwencję 5'-d(AGA)-3'. Następnie podłoże wyjęłam z kolumnienki, podzieliłam na mniej więcej cztery równe części i na każdej z nich zsyntezowałam sekwencję 5'-d(TGX)-3', gdzie X był jedną z czterech standardowych jednostek nukleotydojowych inną dla każdej porcji podłoża. Ponownie zmieszałam podłoże i rozdzieliłam je na cztery porcje, na których zsyntezowałam sekwencję 5'-d(GTX)-3'. Po skończonej syntezie powtórzyłam mieszanie i rozdzielanie. Następnie zsyntezowałam końcową sekwencję 5'-d(ATTY)-3', przy czym Y był

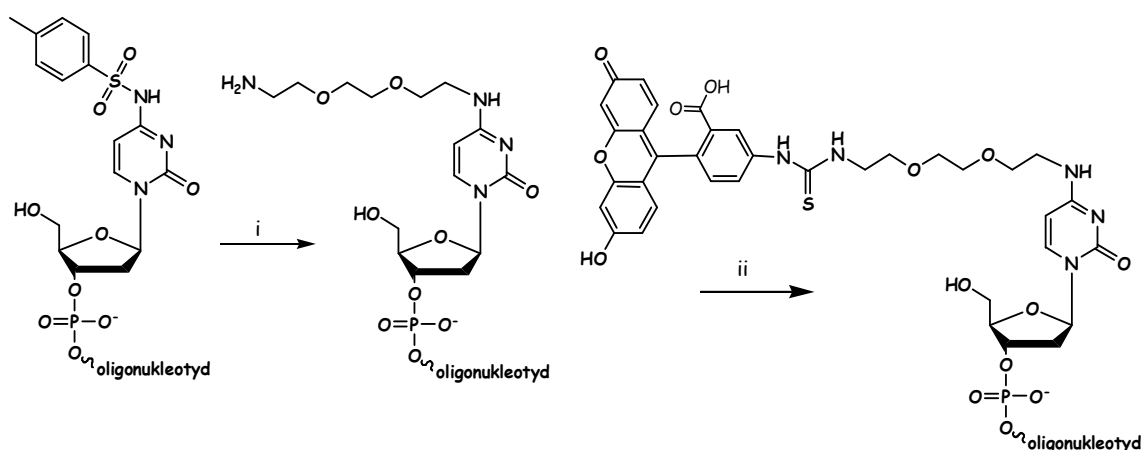
jedną z możliwych jednostek: dA, dT, dC lub dC^{Sp}. Otrzymaną bibliotekę oligonukleotydów **M1** połączonych z podłożem poprzez, trwałe w warunkach kwasowych i zasadowych, łącznik oksylabilny poddałam procedurze odblokowania grup funkcyjnych (NH₃ aq, 55°C, noc).



Rys. 53. Schemat blokowy syntezy biblioteki kombinatorycznej **M1** metodą dzieloną.

7.2. Synteza sondy fluorescencyjnej

Syntezę oligonukleotydowej sondy hybrydacyjnej przeprowadziłam zgodnie z opublikowaną procedurą [212]. Na handlowo dostępnym podłożu CPG zsyntezowałam oligonukleotyd o sekwencji 5'-d(C^{Ts}TC TGC AGA CGA AT)-3'. Na 5'-końcu oligonukleotydu włączyłam 2'-deoksycytydnę modyfikowaną resztą kwasu *p*-toluenosulfonowego w pozycji N-4.



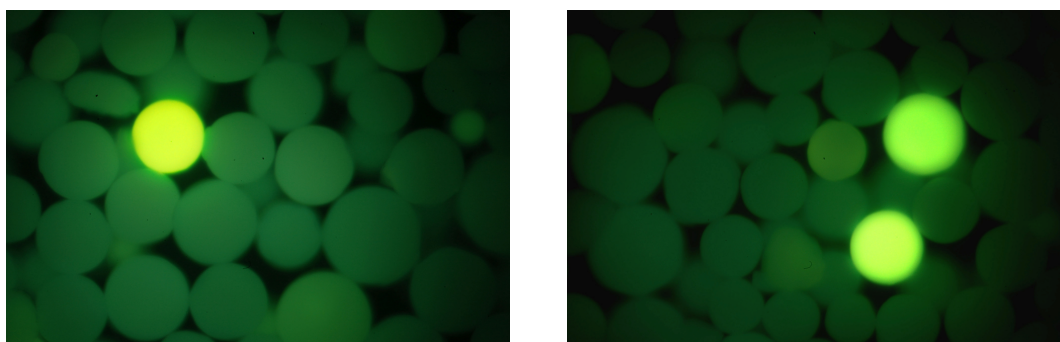
Schemat 17. i) 40% wodny roztwór 2,2'-(etylenodioksy)-bis(etyloaminy); ii) bufor boranowy, FITC [212].

Po odłączeniu oligonukleotydu od podłoża poddałam go reakcji z 40% wodnym roztworem 2,2'-(etylenodioksy)-bis(etyloaminy). Tosylowana w pozycji N-4 cytydyna jest podatna na atak nukleofili, w odpowiednich warunkach następuje podstawienie atomu C-4 modyfikowanej cytydyny aminą [212] (**Schemat 17**). Modyfikowany oligonukleotyd oddzieliłam od nadmiaru aminy na kolumnie NAP-25 wypełnionej Sephadexem. Wykonałam

analizę MALDI mieszaniny reakcyjnej i stwierdziłam, że 90% wydajność reakcji. Produkt oczyściłam i poddałam reakcji z izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC). Reakcja biegnie w środowisku zasadowym. Na podstawie analizy MALDI wydajność reakcji oceniłam na 80%.

7.3. Selekcja i analiza elementów biblioteki kombinatorycznej za pomocą spektrometrii mas MALDI

Modelową kombinatoryczną bibliotekę oligonukleotydową **M1** zawiesiłam w 1mL wody i pobrałam 100µL zawiesiny. Po odparowaniu ziaren podłoża do sucha dodałam do nich bufor hybrydyzacyjny (20mM MOPS, 0,1M NaCl oraz 20nM sonda fluorescencyjna). Doświadczenie hybrydyzacyjne prowadziłam w temperaturze 37°C przez 1 godzinę. Następnie usunęłam bufor znad podłoża i przemyłam je wodą. W wyniku analizy elementów biblioteki pod mikroskopem fluorescencyjnym stwierdziłam pozytywny wynik hybrydyzacji. Następnie, w celu pozbycia się niespecyficznie związanych cząsteczek sondy ziarna podłoża wielokrotnie przemywałam wodą. Ta procedura odmywania sondy hybrydyzacyjnej nie była wystarczająco skuteczna i w dalszym ciągu większość ziaren wykazywała fluorescencję. Przygotowałam więc bufor elucyjny składający się z 1M roztworu NaCl z 5% dodatkiem formamidu. Obecność formamidu osłabia wiązania wodorowe typu Watsona-Cricka. Po elucji buforem zawierającym 5% formamidu sonda hybrydyzacyjna pozostała związana tylko z tymi elementami biblioteki, z którymi oddziałuje najsilniej. Ziarna podłoża, które dały pozytywną odpowiedź w eksperymencie hybrydyzacyjnym emitowały jasno zielone światło, pozostałe ziarna podłoża nie wykazywały fluorescencji ale były widoczne w ich poświacie (**Rys. 53**).



Rys. 53. Zdjęcia biblioteki oligonukleotydów po hybrydyzacji z sondą fluorescencyjną i przemyciu ziaren podłoża 1M roztworem NaCl z 5% dodatkiem formamidu. Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Diaphot-TMD.

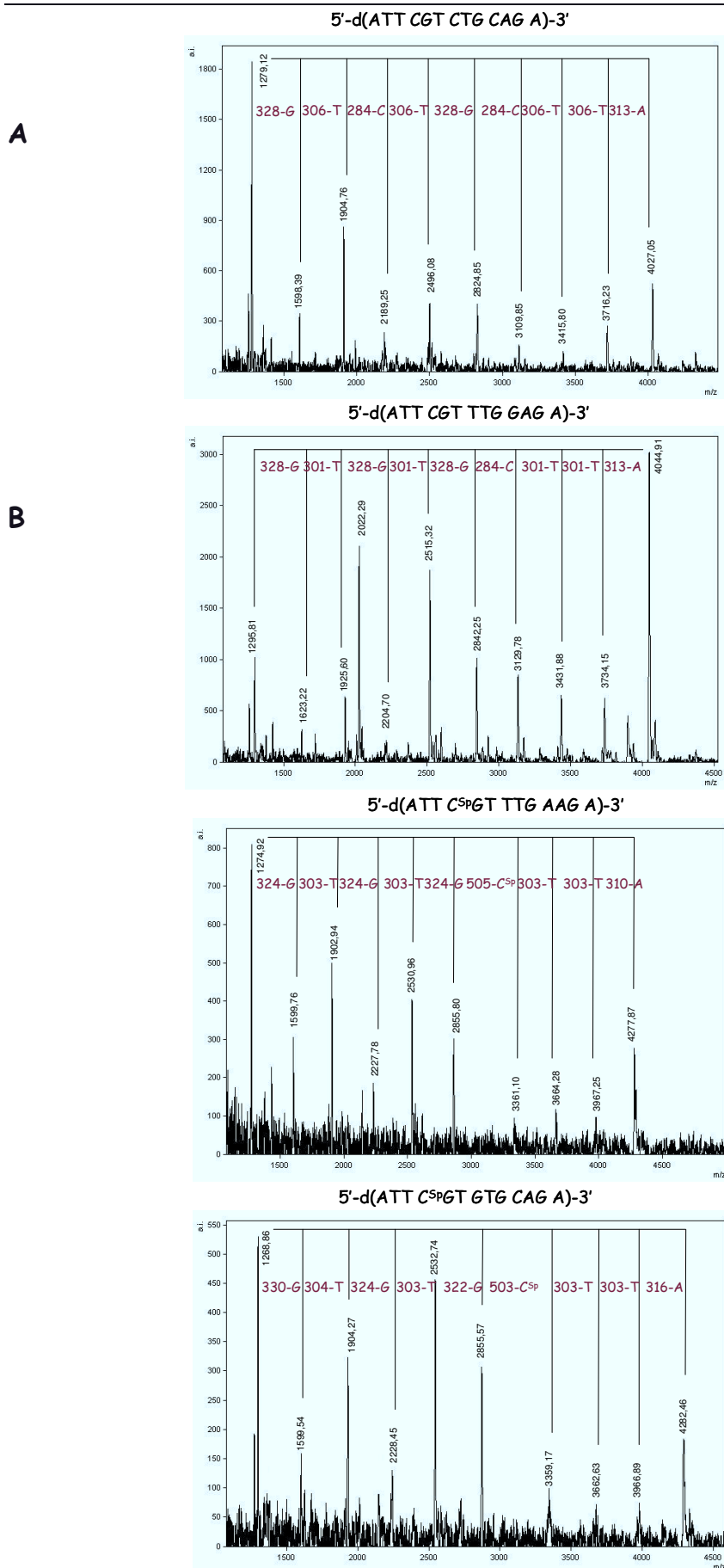
Następnie za pomocą mikropipety wybrałam po 4 elementy, które dały pozytywny i negatywny wynik eksperymentu hybrydyzacyjnego. Każde z ziaren podłoża przemyłam 10% roztworem formamidu w celu pozbycia się związanej z nimi sondy, przepłukałam wodą i

poddałam procedurze odcięcia od podłoża. Następnie wykonałam analizę MALDI uwolnionych oligonukleotydów. W widmie widoczne są serie sygnałów reprezentujących całą sekwencję oligonukleotydu. Na podstawie różnicy mas pomiędzy sąsiednimi sygnałami możliwe jest odczytanie sekwencji w kierunku 3'→5' z wyłączeniem czterech pierwszych jednostek. Ostatnich randomizowanych pozycji od końca 3' oligonukleotydów nie udało się odczytać bezpośrednio z widma. Sygnały pochodzące od reprezentujących je fragmentów występują w rejonie sygnałów pochodzących od matrycy i nie można ich było wyodrębnić. Niemniej możliwe było określenie rodzaju tej jednostki na podstawie różnicy mas oligonukleotydu i pozostałych znanych jednostek. Wszystkie oligonukleotydy, które dały pozytywny wynik w eksperymencie hybrydacyjnym miały tę samą sekwencję 5'-d(ATT CGT CTG CAG A)-3'. Sekwencja tych oligonukleotydów, które nie hybrydowały w zastosowanych warunkach z sondą wykazuje większe zróżnicowanie. Otrzymane wyniki zestawiałam w tabeli i prezentuję na rysunku (Rys. 55).

Tabela 5. Zestawienie sekwencji wyselekcjonowanych elementów biblioteki.

	Sekwencja elementu biblioteki	Liczba powtórzeń	Liczba wybranych elementów
Oligonukleotyd komplementarny z sondą fluorescencyjną	5'-d(ATT CGT CTG CAG A)-3' 3'-d(TAA GCA GAC TGC T C*)-5'	4	4
	5'-d(ATT CGT TTG GAG A)-3' 3'-d(TAA GCA GAC TGC T C*)-5'	2	
Oligonukleotydy niekomplementarne	5'-d(ATT C^{Sp}GT TTG AAG A)-3' 3'-d(TAA G CA GAC TGC T C*)-5'	1	4
	5'-d(ATT C^{Sp}GT TTG CAG A)-3' 3'-d(TAA G CA GAC TGC T C*)-5'	1	

C* - cytydina znakowana fluoresceiną



Rys. 55. Przykładowe widna MALDI elementów kombinatorycznej biblioteki oligonukleotydowej: **A** – elementu, który dał pozytywny wynik w eksperymencie hybrydacyjnym; **B** – elementów, które nie oddziaływały z sondą.

Sekwencje wszystkich wyselekcjonowanych elementów biblioteki zostały odczytane na podstawie widm MALDI i należą do zbioru sekwencji biblioteki **M1** (Tabela 5). Sekwencja wszystkich elementów, które dały pozytywny wynik hybrydyzacji z sondą fluorescencyjną jest identyczna i w pełni komplementarna z sondą. Wśród wyselekcjonowanych elementów znalazły się dwa oligonukleotydy, które w sekwencji zawierały cytydynę modyfikowaną sperminą (C^{Sp}). Wykazano, że obecność reszty sperminy w łańcuchu oligonukleotydu nie tylko nie zakłóca oddziaływań Watsona-Cricka, ale wpływa również stabilizująco na trwałość dupleksów, niemniej te elementy biblioteki nie ulegały hybrydyzacji z sondą w zastosowanych warunkach [239, 240]. Jest to związane z faktem, że pozostałe pozycje zmienne oligonukleotydu wykazywały brak pełnej komplementarności z sondą.

Łatwo zauważyć, że we wszystkich sekwencjach oligonukleotydów nieoddziałujących z sondą hybrydyzacyjną występuje niesparowanie w centralnej (7-mej) pozycji dupleksu. Nie jest więc zaskoczeniem, że takie właśnie elementy biblioteki **M1** nie przetrwały warunków elucji (5% roztwór formamidu). Jest to dodatkowe potwierdzenie użyteczności opracowanej przeze mnie metody sekwencjonowania oligonukleotydów bibliotek kombinatorycznych w analizie właściwości kwasów nukleinowych.

W najbliższej przyszłości zamierzamy wykorzystać opracowaną metodę sekwencjonowania elementów oligonukleotydowych bibliotek kombinatorycznych do poszukiwania aptamerów oligonukleotydowych zawierających różne modyfikacje strukturalne. Została otwarta droga do tego typu analiz, które znajdą szersze zastosowanie w poszukiwaniu oligonukleotydów przydatnych w nowoczesnych metodach terapii.

PODSUMOWANIE

Synteza kombinatoryczna liczy sobie w chwili obecnej ponad 20 lat. Dzisiaj metodę w pełnym rozkwicie wykorzystuje się przede wszystkim do poszukiwania związków wiodących w przemyśle farmaceutycznym. Jednakże służy również jako narzędzie do badania właściwości oligonukleotydów pod kątem ich zastosowania w eksperymentalnej terapii antysensowej, czy antygenowej. Jednakże problem metody „odczytywania” struktury wyselekcjonowanego elementu biblioteki nadal jest problemem otwartym. Nie można opracować jednego uniwersalnego sposobu określenia budowy wybranego elementu biblioteki, ponieważ jest on zależny od rodzaju związków, które tę bibliotekę tworzą i projektowany dla konkretnej klasy związków.

Celem pracy doktorskiej było **opracowanie metody sekwencjonowania elementów kombinatorycznych bibliotek oligonukleotydowych**. Metody na tyle ogólnej, by można było za jej pomocą „poznać” sekwencję dowolnie modyfikowanego oligonukleotydu. Pomysły na rozwiązanie tego problemu pojawiały się i ewoluowały w czasie studiów nad zupełnie dla mnie nową dziedziną kwasów nukleinowych, by w efekcie zakończyć się sukcesem. Na drodze do osiągnięcia tego celu postawione zostały następujące cele cząstkowe:

Cel 1. Badanie zachowania oligonukleotydów w warunkach analizy MALDI – rozległość fragmentacji

Mniej więcej na początku mojej „znajomości” ze spektrometrią mas MALDI oligonukleotydów dokonałam zaskakującego wówczas dla mnie „odkrycia”. W wyniku bezpośredniej analizy MALDI oligonukleotydu uzyskanego na drodze chemicznej syntezy obok sygnału pochodzącego od oligonukleotydu o docelowej długości obserwowałam w widmach serię sygnałów o masach pośrednich.

- **Zaprojektowałam i wykonałam doświadczenie, które miało na celu ustalenie pochodzenia tych sygnałów. Określiłam tym samym zakres fragmentacji oligonukleotydu połączonego z podłożem poprzez łącznik fotolabilny bezpośrednio poddanego analizie MALDI.**

Cel 2. Wybór odpowiedniego łącznika do syntezy biblioteki oligonukleotydów, synteza i badanie właściwości wybranego układu:

A) Synteza nowego łącznika fotolabilnego

Do zakotwiczenia biblioteki oligonukleotydów na podłożu stałym wybrałam łącznik fotolabilny.

- **Zsyntezowałam kwas 4-benzoiloksy-4-(*o*-nitrofenylo)butanowy (16), który posłużył mi jako łącznik fotolabilny do syntezy oligonukleotydów na podłożu stałym.**
- **Dobrałam optymalne warunki odblokowania oligonukleotydu.**
- **Na związku modelowym przetestowałam właściwości tego układu w dużej skali, w roztworze.**

B) Synteza nowego łącznika oksylabilnego

- **Zaprojektowałam i zsyntezowałam układ rozszczepiany chemicznie, 4-N-(8-amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynę (39).**
- **Otrzymałam odpowiednie podłoże (45), kompatybilne z chemiczną syntezą oligonukleotydów i zbadalam jego właściwości.**

Cel 3. Opracowanie warunków uwolnienia i analizy oligonukleotydu zgromadzonego na jednym ziarnie podłoża

- **Posługując się związkiem modelowym – tymidyn-3'-ylo cytydyn-5'-ylo fosforanem (47), opracowałam optymalne warunki uwolnienia 3'-fosforanu tymidyny.**
- **Zoptymalizowałam warunki odłączenia oligonukleotydu od podłoża tak, by były kompatybilne z analizą MALDI i by możliwa była analiza ilości oligonukleotydu uwolnionej z jednego ziarna podłoża. Zastosowałam do tego celu NH_4IO_4 . Jest to oryginalne rozwiązanie, które pozwoliło na obniżenie skali analizy MALDI skomplikowanych mieszanin oligonukleotydów do ilości subpikomolowych [242].**

Cel 4. Opracowanie metody sekwencjonowania elementów bibliotek oligonukleotydowych

Zabłądziłam w wiele zaułków zanim dotarłam do rozwiązania tego problemu. Rozpoczęłam od analizy fosforanotriestrów oligonukleotydów, które są nietrwałe w warunkach MALDI i ulegają rozległej fragmentacji w źródle jonów. Na tym fakcie chciałam oprzeć metodę sekwencjonowania. Następnie porzuciłam ten pomysł i zdecydowałam, że metodę sekwencjonowania oprę na analizie produktów syntezy oligonukleotydu. Okazało się

jednak, że ilość fragmentów rejestrowanych w wyniku analizy MALDI jest zależna od przebiegu syntezy i nie zawsze możliwa jest rekonstrukcja sekwencji oligonukleotydu na podstawie różnicy mas pomiędzy sąsiednimi sygnałami obserwowanymi w widmie. W celu wygenerowania większych ilości krótszych fragmentów oligonukleotydu wykorzystałam następnie pomysły stosowane dotychczas w chemii peptydów.

- **Opracowałam syntezę „przecinka” [4-N-[2-(2-O-amidofosforyno)etoksy]etylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksy-trytylo)cytydyna (51)] i zbadałam jego właściwości.**
- **Opracowałam warunki włączenia go do sekwencji oligonukleotydu i zoptymalizowałam metodę rozcinania łańcucha.**
- **Zaprojektowałam i zsyntezowałam czynniki terminujące syntezę oligonukleotydu.**
- **Opracowałam warunki włączenia ich do nici oligonukleotydu w chemicznej syntezie oraz warunki analizy jej produktów.**

Cel.5. Sprawdzenie metody na wyselekcjonowanym elemencie modelowej biblioteki

W końcu, przeprowadziłam doświadczenie mające na celu sprawdzenie metody w praktyce i ono stanowi zwieńczenie moich studiów nad sekwencjonowaniem elementów kombinatorycznych bibliotek oligonukleotydowych.

- **Zsyntezowałam modelową oligonukleotydową bibliotekę kombinatoryczną, składającą się z 64 elementów.**
- **Zsyntezowałam sondę fluorescencyjną do przeszukiwania biblioteki.**
- **Przeprowadziłam hybrydyzację elementów biblioteki ze znakowaną fluorescencyjnie sondą.**
- **W wyniku selekcji mechanicznej wybrałam te ziarna, które najsilniej oddziaływały z zaprojektowaną sondą. Po odłączeniu oligonukleotydów od podłoża poddałam je analizie MALDI i na podstawie otrzymanego widma odczytałam ich sekwencję.**

Postawiony w tytule pracy cel został osiągnięty. **Opracowałam metodę sekwencjonowania elementów kombinatorycznych bibliotek oligonukleotydowych i potwierdziłam jej działanie na modelowej bibliotece.** Jest to metoda uniwersalna, pozwala na poznanie sekwencji szerokiego spektrum związków o budowie oligomerycznej, niezależnie od ich budowy i długości, oraz nie wymaga dużych nakładów pracy i kosztów.

IV CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

1. Odczynniki chemiczne

1.1. Odczynniki

2,4,6-trihydroksyacetofofenon – Fluka 99,9%	1,2,4-triazol – Fluka 99%
L-metionina – SERVA	Spermina – Fluka 99%
L-lizyna – Reanol Budapest Hungary	Benzyloamina – Aldrich 99%
Kwas antranilowy – Fluka 99%	TiCl ₄ – Aldrich
<i>tert</i> -butylodimetylosilowy chlorek – Aldrich do syntezy	2,2'-(etylo-dioksy)bis-(etyloamina) – Aldrich 98%
2-(2-aminoetoksy)-etanol – Merck 99%	Chlorek kwasu <i>p</i> -tolueonosulfonowego – Fluka 99%
4-Dimetyloaminopirydyna – Aldrich 99%	BH ₃ *Me ₂ S – 2M roztwór w THF Aldrich
Kwas nikotynowy – Fluka 99,5%	HJO ₄ – Aldrich 99,999%
<i>N,N'</i> -dicykloheksylokarbodiimid – Koch-Light	Metyloamina – 30% roztwór w absolutnym etanolu Aldrich
Alilotrimetylosilan – Gestelt 98%	6-aza-2-tiotymina – Fluka 99% HPLC
NaIO ₄ – P.P.H. Polskie Odczynniki Chemiczne	Kwas 3-hydroksypikolinowy – Fluka 99%
3-butenylotrimetylosilan – Gestelt 97%	1,1'-karbonylodiimidazol – Aldrich 90%
N-chlorometyloftalimid – Fluka 97%	<i>o</i> -nitrobenzaldehyd – Dembach&Co
18-korona-6 – Aldrich	
Bezwodnik kwasu bursztynowego – Aldrich 99%	
Bezwodnik kwasu trifluorooctowego – Fluka 99%	

1.2. Rozpuszczalniki

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

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

2. Aparatura

Widma magnetycznego rezonansu jądrowego wykonano na spektrometrze Bruker AVANCE II 400 i Unity 300 firmy Varian (USA) w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu. Wartości przesunięć chemicznych δ (ppm) podano względem:

- tetrametylosilanu (TMS – stosowany jako wzorzec wewnętrzny) dla widm ^1H NMR oraz ^{13}C NMR w rozpuszczalnikach organicznych;
- 85 % H_3PO_4 (wzorzec zewnętrzny) dla widm ^{31}P NMR;
- kwasu trifluorooctowego (wzorzec zewnętrzny) dla widm ^{19}F NMR.

Analizę masową związków wykonano przy użyciu:

- spektrometru masowego Bruker Autoflex MALDI-TOF (Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań);

Oligonukleotydy i ich pochodne syntetyzowano na aparatach do automatycznej syntezy DNA: Gene Assembler Plus Pharmacia LKB (Szwecja) oraz syntetyzerze DNA i RNA firmy K&A Laborgeräte GbR (Niemcy).

Analizy HPLC oligonukleotydów i ich pochodnych prowadzono na aparacie Prominence UFLC firmy Shimadzu. Mieszaniny oligonukleotydowe rozdzielano na kolumnie z fazą odwróconą *Lichrospher*. Jako bufor stosowano 0,01 M octan amonu ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$).

Widma UV wykonano przy użyciu spektrofotometru Beckman DU-65 oraz Jasco.

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

3. Techniki ogólne

Chromatografia cienkowarstwowa – TLC:

Mieszaniny reakcyjne i związki chemiczne oczyszczano 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 żelem krzemionkowym 60 HF_{254} * (* absorbent zawiera czynnik fluoryzujący przy długości fali światła wzbudzającego 254 nm)

Kolumnowa chromatografia cieczowa

Związki oczyszczano stosując technikę kolumnowej chromatografii cieczowej. Jako wypełnienia kolumn użyto dwa rodzaje żelu krzemionkowego firmy Merck o następujących uziarnieniach: (i) 0,040-0,063 mm oraz (ii) 0,063-0,200 mm. Związki wymywano z kolumn stosując dwie metody: (i) metodę polegającą na zmianie składu procentowego eluentu, a tym samym zmianie siły jego eluowania lub (ii) metodę izokratyczną, w której skład procentowy eluentu nie ulega zmianie.

Etylotiotetrazol

Tiocyanian etylu (21 ml, 0,25 mola), NaN_3 (19,6 g, 0,3 mola) oraz NH_4Cl (17 g, 0,31 mola) rozpuszczono w toluenie (50 ml) z dodatkiem H_2O (25 ml). Następnie dodano katalizator międzyfazowy bromek heksametylenododekanotrimetyloaminy (2,5 g, 6,8 mola). Mieszaninę reakcyjną ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 80 °C przez 3 dni. Mieszanka reakcyjna została oziębiona, zakwaszona do pH ~ 2 i pozostawiona w lodzie przez kilka godzin. Następnie jeszcze raz zakwaszona. Wykryształowany biały osad odsączono, przemyto kilkakrotnie toluenem i wysuszono. Otrzymano 24,7 g produktu; wyd. 79%.

Synteza bis-(*N,N*-diizopropylamino)(2-cyanoetoksy)fosfiny

Fosfinę zsyntezowano wg standardowej procedury: Zabezpieczoną przed dostępem wilgoci przechowywano w zamrażarce.¹²⁹

4. Przepisy szczegółowe

4.1. Funkcjonalizacja podłoża

W celu aktywacji podłoża CPG zastosowałam następującą procedurę: Podłoże szklane gotowałam w stężonym kwasie chlorowodorowym przez 2 godziny. Następnie przemyłam je wodą, metanolem, chlorkiem metylenu i eterem etylowym. Wysuszyłam, zawiesiłam ziarna w toluenie i dodałam 3-aminopropylotrimetoksylan (4mL na 1g podłoża w 5mL toluenu). Mieszaninę reakcyjną ogrzewałam w temperaturze 70°C przez noc. Następnie ponownie przemyłam podłoże metanolem, chlorkiem metylenu i eterem etylowym.

Podłoże polistyrenowe przygotowałam według procedury: Sporządziłam zawiesinę 1g podłoża polistyrenowego w mieszaninie chlorku metylenu z kwasem trifluoroctowym (1:1, 10mL) i dodałam kwasu metanosulfonowego (5mL) oraz *N*-metylochloftalimidu (895mg). Całość wytrząsałam przez 4h. Następnie podłoże odsączyłam, przemyłam chlorkiem metylenu, metanolem i ponownie chlorkiem metylenu, wysuszyłam i poddałam hydrazynolizie. W tym celu roztwór wodzianu hydrazyny w *n*-butanolu (1:9, 10mL) dodałam do podłoża, kolbkę szczelnie zamknęłam i umieściłam na 2h w suszarce, w temperaturze 80°C. Po tym czasie podłoże odsączyłam, przemyłam jak wyżej i wysuszyłam.

Obecność wolnych grup aminowych kontrolowałam przy użyciu ninhydryny, której roztwór przygotowałam jak następuje: kilka kryształków ninhydryny rozpuściłam w mieszaninie EtOH:H₂O (1:1, 1mL). Około 100µL roztworu dodawałam do 1mg podłoża i

podgrzewałam. O obecności grup aminowych świadczyło ciemnofioletowe zabarwienie podłoża, wywołane tworzeniem zasady Schiffa.

4.2. Synteza 3-amidofosforynu 1-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-1-(*o*-nitrofenylo)-1,3-propanodiolu (5)

4.2.1. 1-(*o*-Nitrofenylo)but-3-en-1-ol (2)

o-Nitrobenzaldehyd (2g, 13mmol, 1ekw.) rozpuściłam w suchym nitrometanie (50mL). Mieszaninę schłodziłam w łaźni lodowej (mieszanina chłodząca: H₂O/KCl/lód) do temperatury około -20°C. Dodałam alilotrimetylosilanu (2,3mL, 20mmol, 1,5ekw.) oraz porcjami, czterochlorek tytanu (1mL, 13mmol, 1ekw.). Mieszanie kontynuowałam przez kolejne 5 minut. Po upływie tego czasu reakcję zatrzymałam poprzez dodanie nasyconego roztworu NaHCO₃ (30mL). Warstwę wodną ekstrahowałam trójrotnie chlorkiem metylenu (3 × 30mL). Warstwy organiczne połączyłam ze sobą i suszyłam nad bezwodnym Na₂SO₄, a następnie odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (CH₂Cl₂:heksan, 4:1). Czysty produkt w postaci piany otrzymałam z wydajnością 95% (2,5g).

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 7,88 (d, J = 8,06Hz, 1H, H-Ar); 7,80 (d, J = 8,06Hz, 1H, H-Ar); 7,72 (t, J = 8,06Hz, 1H, H-Ar); 7,48 (t, J = 7,68Hz, 1H, H-Ar); 5,92-5,79 (m, 1H, -CH=); 5,63 (d, J = 4,64Hz, 1H, -OH); 5,1-5,02 (m, 2H, -CH₂-); 4,98 (t, J = 1,22Hz, 1H, H-C-Ph); 2,51-2,30 (m, 2H, =CH₂).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 147,78 (C-NO₂, Ar); 139,20 (=CH-); 133,41, 133,96 (Ar); 128,09,128,11 (Ar); 124,38 (Ar); 119,06 (=CH₂); 68,36 (benzylowy); 42,84 (-CH₂-).

4.2.2. 1-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-1-(*o*-nitrofenylo)-but-3-en-1-ol (3)

1-(*o*-Nitrofenylo)but-3-en-1-ol (2) (1g, 5,2mmol, 1ekw.) odparowałam trójrotnie z pirydyną (3 × 10mL). Następnie ponownie rozpuściłam w pirydynie (35mL) i dodałam chlorku 4,4'-dimetoksytrytylu (5,3g, 15,6mmol, 3ekw.), a następnie trójetyloaminę (738μL, 535mg, 5,2mmol, 1ekw.) i DMAP (20mg). Mieszaninę reakcyjną pozostawiłam na mieszkadle magnetycznym na 4 godziny w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu, za pomocą analizy TLC (CH₂Cl₂:heksan, 7:3), stwierdziłam całkowite przereagowanie substratu do dwóch wyżej migrujących produktów. W celu dezaktywacji nadmiaru chlorku 4,4'-dimetoksytrytylu dodałam nasycony roztwór NaHCO₃, który ekstrahowałam trójrotnie chlorkiem metylenu. Fazy organiczne połączyłam i suszyłam nad bezwodnym Na₂SO₄. Następnie rozpuszczalniki odparowałam, a surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie

w układzie CH₂Cl₂:heksan (7:3). Czysty 1-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-1-(*o*-nitrofenylo)-but-3-en-1-ol (**3**) otrzymałam w postaci białej piany (1,5g, 58%).

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 7,68 (d, J = 4,4Hz, 1H, H-Ar); 7,54 (t, J = 7,2Hz, 1H, H-Ar); 7,42 (d, J = 7,2Hz, 2H, H-Ar); 7,29-7,20 (m, 4H, H-Ar); 7,13-7,18 (m, 3H, H-Ar); 7,01 (d, J = 8,8Hz, 1H, H-Ar); 6,88 (d, J = 12Hz, 1H, H-Ar); 6,75 (d, J = 8,8Hz, 2H, H-Ar); 6,68 (d, J = 8,8Hz, 2H, H-Ar); 5,72-5,83 (m, 1H, =CH-); 5,26 (t, J = 4,4Hz, 1H, H-C-Ph); 5,00 (d, J = 12,4Hz, 1H, =CH₂); 4,90 (d, J = 16,8Hz, 1H, =CH₂); 3,74 (s, 6H, -OCH₃); 2,52-2,40 (m, 1H, -CH₂-); 2,64-2,56 (m, 1H, -CH₂-).

4.2.3. 1-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-1-(*o*-nitrofenylo)-1,3-propanodiol (**4**)

1-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-1-(*o*-nitrofenylo)-but-3-en-1-ol (**3**) (1,5g, 3mmol, 1ekw.) rozpuściłam w 20mL THF i dodałam 1,5mL świeżo przygotowanego 1M wodnego roztworu OsO₄ (0,15mmol). Następnie dodałam roztwór buforu fosforanowego (pH 7) i 2mL wodnego roztworu NaIO₄ (1,3g, 6mmol, 2ekw.). Mieszaninę reakcyjną pozostawiłam na mieszadle magnetycznym na godzinę w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu na podstawie analizy TLC (eluent AcOEt:heksan, 3:2) stwierdziłam całkowite przereagowanie substratu. Produktu utlenienia nie izolowałam. Mieszaninę rozcieńczyłam etanolem (5mL) i schłodziłam w łaźni lodowej do 0°C. Następnie dodałam NaBH₄ (114mg, 3mmol, 1ekw.) i pozostawiłam na 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie analiza TLC (AcOEt:heksan, 3:2) wskazywała całkowite przereagowanie substratu. Reakcję zakończyłam dodając 20mL nasyconego roztworu NaHCO₃, który ekstrahowałam trójrotnie CH₂Cl₂. Warstwy organiczne połączyłam i suszyłam nad bezwodnym Na₂SO₄. Następnie rozpuszczalniki odparowałam, a surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (AcOEt:heksan, 7:3). Otrzymałam czysty produkt w postaci oleju, który liofilizowałam z benzenu otrzymując białe ciało stałe z 60% wydajnością (870mg).

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 7,63 (d, J = 8,1Hz, 1H, H-Ar); 7,50 (dd, J = 5,4Hz, 7,2Hz, 1H, H-Ar); 7,05-7,42 (m, 11H, H-Ar); 6,76 (d, J = 5,4Hz, 2H); 6,71 (m, 2H, H-Ar); 6,16 (s, 1H, -OH); 4,38 (t, J = 5,2Hz, 1H, H-C-Ph), 3,67 (s, 6H, -OCH₃); 3,41-3,51 (m, 2H, -CH₂-); 2,04-2,16 (m, 2H, -CH₂-).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 158,1 (C-OCH₃); 148,36 (C-NO₂, Ar); 145,41 (Ar); 135,26 (Ar); 129,83 (Ar); 128,92 (Ar); 127,65 (Ar); 126,45 (Ar); 123,64 (Ar); 113,06 (Ar); 86,80 (4°C-Tr); 79,91 (C-Ph); 56,85 (CH₂); 54,99 (-OCH₃); 40,54 (CH₂).

4.2.4. 3-Amidofosforyn 1-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-1-(*o*-nitrofenylo)-1,3-propanodiolu (5)

1-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-1-(*o*-nitrofenylo)-1,3-propanodiol (**4**) (870mg, 1,74mmol, 1ekw.) i tioetylotetrazol (204mg, 1,56mmol, 0,9ekw.) suszyłam w eksykatorze próżniowym nad P₂O₅ przez noc. Następnie rozpuściłam substrat **4** w bezwodnym chlorku metylenu (15mL) i dodałam bis(N,N'-diizopropylamino)(2-cyanoetoksy)fosfinę (580μL, 1,91mmol, 1,1ekw.). Po całkowitym rozpuszczeniu reagentów dodałam tioetylotetrazol. Po upływie godziny reakcja zaszła ilościowo. Do mieszaniny reakcyjnej dodałam nasycony roztwór NaHCO₃ i wytrząsałam w celu pozbycia się aktywatora. Warstwę organiczną suszyłam nad bezwodnym Na₂SO₄, a następnie odparowałam. Surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (AcOEt:heksan:Et₃N, 5:4:1). Otrzymałam 1,1g czystego produktu w postaci piany (90%).

³¹P NMR (CH₂Cl₂): δ (ppm) 147,12; 147,04.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 7,76 (d, J = 8,1Hz, 1H, H-Ar); 7,07-7,50 (m, 13H, H-Ar); 6,65-6,78 (m, 4H, H-Ar); 4,41 (t, J = 5,2Hz, 1H, H-C-Ph), 3,68 (s, 6H, OCH₃); 3,89-3,96 (m, 2H, CH₂ cyanoetylu); 3,46-3,54 (m, 2H, CH₂); 2,87-3,01 (m, 2H, CH grup iPr); 2,57-2,67 (m, 2H, -CH₂- cyanoetylu); 2,10-2,18 (m, 2H, CH₂); 1,12-1,34 (m, 12H, CH₃ grup iPr).

4.3. Synteza kwasu 3-benzoiloksy-3-(*o*-nitrofenylo)propanowego (8)

3.3.1. 1-O-Benzoilo-1-(*o*-nitrofenylo)but-3-en-1-ol (7)

1-(*o*-Nitrofenylo)but-3-en-1-ol (**2**) (1g, 5,2mmol) odparowałam trójrotnie z pirydyną (3 × 10mL). Następnie rozpuściłam w pirydynie (35mL) i dodałam chlorku benzoilu (660μL, 0,8g, 5,7mmol, 1,1ekw.). Otrzymaną mieszaninę umieściłam na mieszadle magnetycznym na 1h w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu reakcji dodałam nasyconego roztworu NaHCO₃ (20mL) w celu rozłożenia nadmiaru chlorku benzoilu. Otrzymany wodny roztwór ekstrahowałam chlorkiem metylenu (3 × 30mL). Warstwy organiczne połączyłam ze sobą i suszyłam nad bezwodnym Na₂SO₄, następnie rozpuszczalniki odparowałam. Otrzymany w ten sposób olej oczyszczałam chromatograficznie (CH₂Cl₂:heksan, 7:3). Czysty produkt w postaci żółtego oleju otrzymałam z 88% wydajnością (1,45 g).

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 8,04-7,99 (m, 3H, H-Ar); 7,84-7,74 (m, 2H, H-Ar); 7,72-7,66 (m, 1H, H-Ar); 7,61 (d, J = 1,95Hz, 1H, H-Ar); 7,59-7,52 (m, 2H, H-Ar); 6,35 (dd, J = 7,08Hz, 1H, H-C-Ph); 5,97-5,84 (m, 1H, =CH-); 5,21-5,09 (m, 2H, CH₂); 2,86-2,80 (m, 2H, =CH₂).

^{13}C NMR (DMSO): δ (ppm) 39,41 (=CH-); 70,66 (C-Ph); 118,56 (CH_2); 124,32; 127,84; 128,50; 128,83; 129,06; 129,24; 130,74; 132,78; 133,13; 133,72 (Ar); 134,01 (=CH₂); 135,01 (Ar); 147,67 (C-NO₂ Ar); 164,93 (COOPh).

4.3.2. Kwas 3-benzoiloksy-3-(*o*-nitrofenylo)propanowy (8)

a) 1-O-Benzoilo-1-(*o*-nitrofenylo)but-3-en-1-ol (7) (200mg, 0,67mmol, 1ekw.) rozpuściłam w 5mL chlorku metylenu. Mieszaninę reakcyjną schłodziłam w lodzie. Dodałam następnie 5mL 2M wodnego roztworu KMnO_4 (10mmol, 15ekw.) i wrzuciłam kilka kryształków eteru koronowego 18-korona-6. Reakcja była silnie egzotermiczna. Proces dobiegł końca po około 30 minutach. Mieszaninę rozcieńczyłam wodą i ekstrahowałam chlorkiem metylenu. Połączone warstwy organiczne suszyłam nad bezwodnym Na_2SO_4 i odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczałam chromatograficznie (CH_2Cl_2 :MeOH, 3%). Czysty produkt w postaci białego ciała stałego otrzymałam po liofilizacji z dioksanu (100mg, 43%).

b) 1-O-Benzoilo-1-(*o*-nitrofenylo)but-3-en-1-ol (7) (1g, 3,35mmol, 1ekw.) rozpuściłam w 10mL *tert*-butanolu. Następnie sporządziłam roztwór: NaIO_4 (4,3g, 20mmol, 6ekw.) i KMnO_4 (97mg, 0,61mmol, 0,18ekw.) rozpuściłam w 40mL mieszaniny H_2O :*tert*-BuOH (2:1). Roztwory zmieszałam ze sobą i pozostawiłam na mieszadle magnetycznym na 5h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie analiza TLC (CH_2Cl_2 :MeOH, 9:1) wskazywała na całkowite przereagowanie substratu. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczyłam wodą. Warstwę wodną ekstrahowałam trzema porcjami CH_2Cl_2 . Połączone warstwy organiczne suszyłam nad bezwodnym Na_2SO_4 . Po odparowaniu rozpuszczalników surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (CH_2Cl_2 :MeOH, 3%). Czysty kwas 8 liofilizowałam z dioksanu, otrzymując białe ciało stałe (916mg, 86%).

^1H NMR (DMSO): δ (ppm) 12,71 (s, 1H, COOH); 7,97-8,06 (m, 3H, H-Ar); 7,52-7,87 (m, 6H, H-Ar); 6,64 (dd, $J = 3,6\text{Hz}$, 6Hz, 1H, H-C-Ar); 3,00-3,18 (m, 1H, CH_2).

^{13}C NMR (DMSO): δ (ppm) 170,36 (COOPh); 164,82 (COOH); 147,52 (C-NO₂ Ar); 134,57; 134,25; 133,82; 129,51; 129,28; 128,87; 127,95; 124,40 (Ar); 68,51 (C-Ph); 39,90 (CH_2).

4.4. Synteza kwasu 4-benzoiloksy-4-(*o*-nitrofenylo)butanowego (16)

4.4.1. 1-(*o*-Nitrofenylo)pent-4-en-1-ol

O-Nitrobenzaldehyd (2g, 13mmol, 1ekw.) rozpuściłam w 50mL bezwodnego nitrometanu. Mieszaninę schłodziłam w łaźni lodowej (H_2O /KCl/lód) do około -20°C i dodałam 3-butenylotrimetylosilanu (2,5mL, 19mmol, 1,5ekw.) oraz TiCl_4 (1,5mL, 13mmol,

lekw.). Mieszaninę reakcyjną pozostawiłam na 15 minut na mieszadle magnetycznym w temperaturze -20°C . Po upływie tego czasu analiza TLC (CH_2Cl_2 :heksan, 7:3) wskazywała ilościowe przereagowanie substratu. Reakcję zakończyłam dodając nasycony roztwór NaHCO_3 . Wodną warstwę ekstrahowałam trzema porcjami chlorku metylenu. Połączone warstwy organiczne suszyłam nad bezwodnym Na_2SO_4 . Następnie rozpuszczalniki odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (CH_2Cl_2 :heksan, 6:4). Otrzymałam 2,2g czystego 1-(*o*-nitrofenylo)pent-4-en-1-olu (**15**) w postaci białej piany (80%).

Analiza widm NMR wskazywała na powstającą mieszaninę związków. Związki były nierozróżnialne chromatograficznie. Mimo to przeprowadziłam dalsze etapy szlaku syntetycznego:

4.4.2. 1-O-Benzoilo-1-(*o*-nitrofenylo)pent-4-en-1-ol (**15**)

1-(*o*-Nitrofenylo)pent-4-en-1-ol (**15**) (2,2g, 10,6mmol, 1ekw.) odparowałam trójrotnie z pirydyną. Rozpuściłam następnie w 40mL bezwodnej pirydyny i dodałam chlorku benzoilu (1,34mL, 11,66mmol, 1,1ekw.). Po godzinie na podstawie analizy TLC (CH_2Cl_2 :heksan, 7:3) stwierdziłam całkowite przereagowanie substratu. Dodałam nasycony roztwór NaHCO_3 , warstwę wodną ekstrahowałam trzema porcjami chlorku metylenu. Warstwy organiczne połączyłam i suszyłam nad bezwodnym Na_2SO_4 . Rozpuszczalniki odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt oczyszczałam chromatograficznie (CH_2Cl_2 :heksan, 7:3). Otrzymałam 3,2g czystego produktu w postaci piany (91%).

4.4.3. Kwas 4-benzoiloksy-4-(*o*-nitrofenylo)butanowy (**16**)

a) Kwas 4-benzoiloksy-4-(*o*-nitrofenylo)butanowy (**16**) otrzymałam z 1-(*o*-nitrofenylo)pent-4-en-1-olu (**15**) według procedury opisanej w punkcie [3.2. b)]. Analiza TLC wskazywała połowiczne przereagowanie substratu. Produkty **16** i **19** rozdzieliłam na kolumnie chromatograficznej (CH_2Cl_2 :MeOH; **19** – 100% CH_2Cl_2 ; **16** – 3% MeOH).

2-Cyklopropylo-1-(*o*-nitrofenylo)etanol (**19**):

^1H NMR (DMSO): δ (ppm) 7,99-8,06 (m, 3H, H-Ar); 7,65-7,82 (m, 3H, H-Ar); 7,52-7,59 (m, 3H, H-Ar); 6,37 (dd, $J = 3,9\text{Hz}, 5,1\text{Hz}$, 1H, H-C-Ph); 2,09-2,19 (m, 1H, CH_2); 1,69-1,78 (m, 1H, CH_2); 0,81-0,94 (m, 1H, $>\text{CH}-$, z pierścienia cyklopropanowego); 0,37-0,49 (m, 2H, $>\text{CH}_2$ z pierścienia), 0,07-0,21 (m, 2H, $>\text{CH}_2$ z pierścienia).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 165,10 (COOPh); 147,65 (NO₂-C Ar); 133,95; 133,67; 129,26; 129,19; 129,07; 128,83; 128,31; 128,00; 127,68; 124,21 (Ar); 71,96 (C-Ph); 40,14 (CH₂); 7,63 (>CH-); 4,70 (>CH₂), 3,63 (>CH₂).

b) 1-O-Benzoilo-1-(*o*-nitrofenylo)but-3-en-1-ol (**7**) (1g, 3,35mmol, 1ekw.) rozpuściłam w 25mL suchego chlorku metylenu. Następnie dodałam kompleks boranu z dimetylosiarczkiem (3,19mL, 5,02mmol, 1,5ekw.). Mieszaninę reakcyjną pozostawiłam na mieszadle magnetycznym na 2h w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu na podstawie analizy TLC (CH₂Cl₂:MeOH, 9:1) stwierdziłam, że reakcja dobiegła końca, mieszaninę schłodziłam w lodzie i dodałam K₂Cr₂O₇ (1g, 294mmol, 88ekw.) w roztworze H₂O/stęż. H₂SO₄ (1:2). Mieszaninę zostawiłam na noc na mieszadle. Następnego dnia rozcieńczyłam ją wodą i ekstrahowałam chlorkiem metylenu. Połączone ekstrakty suszyłam nad Na₂SO₄ a następnie odparowałam. Produkt oczyściłam chromatograficznie (CH₂Cl₂:MeOH, 3%), a następnie krystalizowałam z metanolu, otrzymując 830mg (75%) kwasu 4-benzoiloksy-4-(*o*-nitrofenylo)butanowego (**16**). Temperatura topnienia 185-187°C.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 12,25 (s, 1H, COOH); 8,00 (d, J = 8,3Hz, 3H, H-Ar); 7,81-7,75 (m, 2H, H-Ar); 7,73-7,66 (m, 1H, H-Ar); 7,61-7,52 (m, 3H, H-Ar); 6,24 (dd, J = 8,3Hz, J 4,8Hz, 1H, H-C-Ph) 2,45 (dd, J = 6,4Hz; 15,5Hz, 2H, CH₂ α); 2,36-2,25 (m, 2H, CH₂ β).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 173,51 (COOH); 165,01 (COOPh); 147,88 (C-NO₂ Ar); 135,24; 134,06; 133,71; 129,32; 129,29; 129,03; 128,82; 127,66; 124,25 (Ar);. 70,84 (C-Ph); 30,59 (-CH₂-); 30,15 (-CH₂-).

4.5. Synteza “podłoży fotolabilnych”: **9, 10, 14, 17 i 18**

4.5.1. „Podłoża fotolabilne” **9, 10 i 18**

Podłoże typu CPG sfunkcjonalizowane grupami propyloaminowymi (200mg), lub podłoże typu PS sfunkcjonalizowane grupami metyloaminowymi (100mg) zawiesiłam w 2mL bezwodnego CH₂Cl₂. Następnie dodałam kwas 3-benzoiloksy-3-(*o*-nitrofenylo)-propanowy (**8**) (100mg, 0,33mmol, 1ekw.), DCC (70mg, 0,33mmol, 1ekw.), Et₃N (45μL, 0,33mmol, 1ekw.) oraz DMAP (20mg). Całość wytrząsałam przez noc w temperaturze pokojowej. Podłoże odsączyłam i przemyłam metanolem (50mL) i chlorkiem metylenu (50mL). Następnie zawiesiłam ziarna podłoża w MeCN (2mL) i dodałam bezwodnik kwasu octowego (50μL), N-metyloimidazol (134μL) i 2,6-lutydynę (50μL). Mieszaninę wytrząsałam przez 2 godziny, po czym podłoże odsączyłam, przemyłam MeOH i CH₂Cl₂. W celu usunięcia grupy benzoilowej dodałam 1mL NH₃ aq. (32%). Reakcję prowadziłam w temperaturze 60°C przez 4 godziny. Podłoże **9/10** po odsączeniu i przemyciu suszyłam na powietrzu.

„Podłoże fotolabilne” **18** otrzymałam według tej samej procedury, z tą różnicą, że użyłam kwasu 4-benzoiloksy-4-(*o*-nitrofenylo)butanowego (**16**), a do odblokowania grupy hydroksylowej użyłam roztworu metyloaminy w bezwodnym etanolu (30%, 3mL/100mg podłoża). Reakcję prowadziłam w suszarce (60°C) przez 2h.

4.5.2. „Podłoże fotolabilne” **14 i 17**

Podłoże polistyrenowe sfunkcjonalizowane grupami metyloaminowymi **11** (50mg) zawiesiłam w 1mL bezwodnego CH₂Cl₂ i dodałam bezwodnika kwasu bursztynowego (50mg), Et₃N (50μL) oraz DMAP (20mg). Zamknęłam szczelnie i wytrząsałam przez noc w temperaturze pokojowej. Rano podłoże odsączyłam i przemyłam MeOH (50mL) i CH₂Cl₂ (50mL). Suszyłam na powietrzu. Podłoże **12** ponownie zwiesiłam w 1ml CH₂Cl₂ i dodałam 2,2'-(etylenodioksy)-bis(etyloaminy) (100μL, 0,68mmol, 1ekw.), DCC (140mg, 0,68mmol, 1ekw.), Et₃N (95μL, 0,68mmol, 1ekw.) oraz DMAP (20mg). Mieszaninę reakcyjną ponownie wytrząsałam przez noc, następnie podłoże **13** odsączyłam, przemyłam MeOH i CH₂Cl₂ i ponownie zawiesiłam w CH₂Cl₂ (1mL). Dodałam kwas 3-benzoiloksy-3-(*o*-nitrofenylo)propanowy (**8**) (50mg, 0,165mmol, 1ekw.), DCC (35mg, 0,165mmol, 1ekw.), Et₃N (25μL, 0,165mmol, 1ekw.) oraz DMAP (20mg) i wytrząsałam przez noc w temperaturze pokojowej. Rano podłoże odsączyłam i przemyłam. Ziarna podłoża zawiesiłam w MeCN (1mL) i dodałam bezwodnik kwasu octowego (25μL), N-metyloimidazol (75μL) oraz 2,6-lutydynę (25μL). Mieszaninę wytrząsałam przez 2 godziny, po czym podłoże odsączyłam i przemyłam. Grupę hydroksylową odblokowałam za pomocą roztworu amoniaku (32%, 1mL), zawiesinę umieściłam na 4h w suszarce (60°C). Podłoże następnie odsączyłam przemyłam MeOH i CH₂Cl₂, i suszyłam na powietrzu.

Do syntezy „podłoża fotolabilnego” **17** użyłam kwasu 4-benzoiloksy-4-(*o*-nitrofenylo)butanowego (**16**), a do odblokowania grupy hydroksylowej użyłam roztworu metyloaminy w bezwodnym etanolu (30%, 3mL/100mg podłoża). Reakcję prowadziłam w suszarce (60°C) przez 2h.

Po każdym etapie syntezy prowadziłam kontrolę obecności grup aminowych na podłożu za pomocą roztworu ninhydryny.

4.6. Synteza 3'-amidofosforynu 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydyny (**23**)

4.6.1. 2'-Deoksyurydyna (**21**)

Deoksycytydynę (2g, 8,8mmol, 1ekw.) rozpuściłam w 50mL H₂O. Następnie dodałam NaNO₂ (20,5g, 228mmol, 26ekw.), KH₂PO₄ (1,56g, 11,44mmol, 1,3ekw.) oraz 90% roztwór

wodny H_3PO_4 (77 μL , 1,32mmol, 0,15ekw.). Mieszaninę reakcyjną pozostawiłam na 3 doby na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej. Wydzielały się tlenki azotu. Po stwierdzeniu całkowitego przereagowania substratu za pomocą analizy TLC (CH_2Cl_2 :MeOH, 6:4), wodę odparowałam do sucha. Powstała zbrylona masa utworzona przez sole, z której czystą deoksyurydynę (**21**) wymywałam na gorąco pirydyną. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymałam 1,8g deoksyurydyny (90%).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 11,32 (s, 1H, H-N3); 7,58 (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H, H6); 6,21 (t, $J = 6,4\text{Hz}$, 1H, H1'); 5,39 (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H, H6); 5,34 (d, $J = 4,4\text{Hz}$, 1H, 3'OH); 5,21 (t, $J = 2,3\text{Hz}$, 1H, 5'OH); 4,29 (m, 1H, H4'); 3,88 (m, 1H, H3'); 3,18-3,26 (m, 2H, H5', H5''); 2,16-2,19 (m, 2H, H2', H2'').

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 162,99 (C4); 150,55 (C2); 140,52 (C6); 101,64 (C5); 85,53 (C4'); 84,23 (C1'); 70,01 (C3'); 63,50 (C5'); 38,78 (C2').

4.6.2. 5'-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydyna (**22**)

Deoksyurydynę (**21**) (1g, 4,4mmol, 1ekw.) odparowałam trójrotnie z pirydyną. Następnie rozpuściłam substrat w 15mL pirydyny i dodałam chlorek 4,4'-dimetoksytrytylu (1,64g, 4,84mmol, 1,1ekw.). Po upływie 1 godziny analiza TLC (CH_2Cl_2 :MeOH, 9:1) wskazała na całkowite przereagowanie substratu. Do mieszaniny reakcyjnej dodałam nasycony wodny roztwór NaHCO_3 , który następnie ekstrahowałam trzema porcjami CH_2Cl_2 . Połączone ekstrakty suszyłam nad bezwodnym Na_2SO_4 . Po odparowaniu pod zmniejszonym ciśnieniem rozpuszczalników oczyszczałam surowy produkt chromatograficznie (CH_2Cl_2 :MeOH, 3%). Otrzymałam 2,16g czystej 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydyny (**22**) w postaci piany (93%).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 11,33 (s, 1H, H-N3); 7,65 (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H, H6); 7,24-7,41 (m, 9H, H-Ar); 6,91 (m, 4H, H-Ar); 6,16 (t, $J = 6,4\text{Hz}$, 1H, H1'); 5,39 (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H, H6); 5,34 (d, $J = 4,4\text{Hz}$, 1H, 3'OH); 4,30 (m, 1H, H4'); 3,88 (m, 1H, H3'); 3,74 (s, 6H, OCH_3); 3,18-3,26 (m, 2H, H5', H5''); 2,17-2,20 (m, 2H, H2', H2'').

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 162,99 (C4); 158,08 (C-OCH₃, DMT); 150,29 (C2); 144,68 (Ar); 140,42 (C6); 135,42; 135,21; 129,73; 127,86; 127,67; 126,73; 123,88; 113,21 (Ar); 101,53 (C5); 85,75 (4°C, DMT); 85,34 (C4'); 84,12 (C1'); 69,94 (C3'); 63,43 (C5'); 55,03; 55,00 (OCH_3); 38,83 (C2').

4.6.3. 3'-Amidofosforyn 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydyny (**23**)

5'-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydynę (**22**) (2,16g, 4,07mmol, 1ekw.) i tioetylotetrazol (480mg, 3,66mmol, 0,9ekw.) suszyłam w eksykatorze próżniowym nad P_2O_5

przez noc. Blokowaną deoksyurydynę rozpuściłam następnie w chlorku metylenu (20mL), dodałam bis(N,N'-diizopropylamino)(2-cyanoetoksy)fosfinę (1,35mL, 4,48mmol, 1,1ekw.) i porcjami tioetylotetrazol. Po upływie 1 godziny analiza ^{31}P NMR wskazała na całkowity zanik fosfiny. Do mieszaniny reakcyjnej dodałam nasycony roztwór NaHCO_3 , który ekstrahowałam trzema porcjami CH_2Cl_2 . Warstwy organiczne połączyłam, suszyłam nad bezwodnym Na_2SO_4 i odparowałam rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie 3'-amidofosforyn 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksyurydyny (**23**) rozpuściłam w 3mL chlorku metylenu i przeprowadziłam precypitację z *n*-heksanu (800mL). Otrzymałam 2,64g czystego produktu w postaci białego ciała stałego (89%).

^1H NMR (DMSO): δ (ppm) 11,30 (s, 1H, H-N3); 7,68 (d, $J = 8\text{Hz}$, 1H, H6); 7,22-7,39 (m, 9H, H-Ar); 6,90 (m, 4H, H-Ar); 6,16 (dd, $J = 6,4\text{Hz}$, 8Hz, 1H, H1'); 5,43 (m, 1H, H6); 4,53 (m, 1H, H4'); 4,03 (m, 2H, H5', H5''); 3,74 (s, 6H, OCH_3); 3,43-3,64 (m, 3H, H3', cyjanoetylu); 3,24-3,33 (m, 2H, cyjanoetylu); 2,63-2,95 (m, 2H, *i*-Pr); 2,30-2,38 (m, 2H, H2', H2''); 1,21 (s, 12H, *i*-Pr).

^{13}C NMR (DMSO): δ (ppm) 162,99 (C4); 158,12 (C- OCH_3 , DMT); 150,25 (C2); 144,59 (C6); 140,47 (Ar); 135,29; 135,21; 135,14; 135,10; 127,85; 127,67; 127,63; 126,76; 118,94 (Ar); 118,75 (CN); 101,63 (C5); 85,90 (4°C , DMT); 72,63 (C4'); 72,16 (C1'); 62,99 (C3'); 62,82 (C5'); 58,43 (cyjanoetylu); 55,02 (OCH_3); 42,62, 42,50 (*i*-Pr); 38,37 (C2'); 24,28, 24,18 (*i*-Pr); 18,88 (C-CN).

4.7. Synteza 4-(*o*-nitrofenylo)-*N*-benzylobutanamid-4-ylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforanu (**34**)

4.7.1. 4-Benzoiloksy-4-(*o*-nitrofenylo)-*N*-benzylobutanamid (**27**)

Kwas 4-benzoiloksy-4-(*o*-nitrofenylo)butanowy (**16**) (530mg, 1,6mmol, 1ekw.) rozpuściłam w 10mL suchego CH_2Cl_2 . Następnie dodałam 1,1'-karbonylodimidazolu (390mg, 2,4mmol, 1,5ekw.). Mieszaninę reakcyjną zostawiłam na mieszadle magnetycznym na 1h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie analiza TLC (AcOEt:heksan:MeOH; 1:1:0,1) wskazywała ilościowe przereagowanie substratu. Wtedy dodałam benzyloaminy (350mL, 3,2mmol, 2ekw.). Mieszanie kontynuowałam przez kolejne 2h. Po tym czasie na podstawie analizy TLC (CH_2Cl_2 :MeOH; 9:1) stwierdziłam całkowite przereagowanie substratu. W celu zakończenia reakcji, dodałam 10mL H_2O . Warstwę wodną ekstrahowałam trójrotnie CH_2Cl_2 . Warstwy organiczne połączyłam i suszyłam nad bezwodnym Na_2SO_4 . Rozpuszczalniki odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem do pomarańczowego oleju, który oczyszczałam

chromatograficznie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$, 3%). Otrzymałam żółty olej, który liofilizowałam z benzenu otrzymując 630mg kremowego ciała stałego (89%).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 8,34 (t, $J = 5,86\text{Hz}$, 1H, NHCO); 8,04-8,00 (m, 3H, H-Ar); 7,75-7,81 (m, 2H, H-Ar); 7,60-7,53 (m, 2H, H-Ar); 7,34-7,18 (m, 7H, H-Ar); 6,25 (dd, $J = 4,39\text{Hz}$, 9,28Hz, 1H, H-C-Ph); 4,24 (d, $J = 5,86\text{Hz}$, 2H, NH- CH_2 -Ph); 2,51-2,49 (m, 2H, CH_2 α); 2,45-2,28 (m, 2H, CH_2 β).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 170,93 (CONH); 165,04 (COOPh); 147,8 (C- NO_2 Ar); 139,34; 135,44; 134,06; 131,20; 133,71; 129,35; 129,23; 128,79; 128,20; 127,67; 127,22; 126,96; 124,26; 126,69 (Ar); 71,22 (CH-Ph); 42,08 (NH- CH_2 -Ph); 31,25 (CH_2); 31,67 (CH_2).

4.7.2. 4-Hydroksy-4-(*o*-nitrofenylo)-N-benzylbutanamid (28)

4-Benzoiloksy-4-(*o*-nitrofenylo)-N-benzylbutanamid (27) (630mg, 1,5mmol, 1ekw.) rozpuściłam w 2mL metanolu i dodałam 3mL roztworu metyloaminy (40% roztwór w absolutnym etanolu). Mieszaninę reakcyjną umieściłam w suszarce na 2h (60°C). Po tym czasie za pomocą TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$, 9:1) stwierdziłam całkowite przereagowanie substratu. Rozpuszczalniki odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$, 5%), otrzymując 4-hydroksy-4-(*o*-nitrofenylo)-N-benzylbutanamid (28) jako żółte ciało stałe z wydajnością 89% (421mg).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 8,39 (t, $J = 5,89\text{Hz}$, 1H, CONH); 7,88 (d, $J = 7,94\text{Hz}$, 1H, H-Ar); 7,81-7,69 (m, 2H, H-Ar); 7,53-7,42 (m, 3H, H-Ar); 7,33-7,22 (m, 3H, H-Ar); 5,66 (d, $J = 4,54\text{Hz}$, 1H, OH); 4,99 (m, 1H, CH-Ph); 4,24 (d, $J = 5,89\text{Hz}$, 2H, CH_2 -Ph); 2,41-2,20 (m, 2H, CH_2 α); 2,01-1,78 (m, 2H, CH_2 β).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 171,77 (CONH); 147,68 (CH- NO_2 Ar); 140,3; 139,62; 133,10; 131,18; 128,22; 128,17; 128,05; 127,42; 127,16; 126,97; 126,65; 123,65; (Ar); 67,17 (CH-Ph); 42,02 (NH- CH_2 -Ph); 34,36 (CH_2); 32,04 (CH_2).

4.7.3. 5'-O-(4,4'-Dimetoksytrytylo)tymidyna

Tymidynę (2g, 8,25mmol, 1ekw.) odparowałam trójrotnie z bezwodną pirydyną. Następnie rozpuściłam ją w 20mL pirydyny i dodałam chlorku 4,4'-dimetoksytrytylu (3,1g, 9,1mmol, 1,1ekw.). Mieszaninę reakcyjną umieściłam na mieszadle magnetycznym na 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie analiza TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$, 9:1) wskazywała całkowite przereagowanie substratu. Reakcję zakończyłam dodając nasycony wodny roztwór NaHCO_3 , w celu zobojętnienia pH oraz rozłożenia nadmiaru chlorku 4,4'-dimetoksytrytylu. Mieszaninę ekstrahowałam trzema porcjami chlorku metylenu. Połączone warstwy organiczne suszyłam nad bezwodnym Na_2SO_4 i odparowałam pod zmniejszonym

ciśnieniem. Po dokładnym usunięciu śladowych ilości rozpuszczalników organicznych stosowanych w reakcji, surowy produkt krystalizowałam z acetonitrylu. Otrzymałam 4g czystej 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyny (90%).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 11,33 (s, 1H, H-N3); 7,51 (s, 1H, H6); 7,22-7,40 (m, 9H, H-Ar); 6,91 (m, 4H, H-Ar); 6,22 (t, $J = 6,8\text{Hz}$, 1H, H1'); 5,33 (d, $J = 4,8\text{Hz}$, 1H, 3'OH); 4,23-4,34 (m, 1H, H4'); 3,87-3,91 (m, 1H, H3'); 3,73 (s, 6H, OCH₃); 3,16-3,24 (m, 2H, H5', H5''); 2,22 (m, 1H, H2'); 2,12 (m, 1H, H2''); 1,45 (s, 3H, CH₃).

4.7.4. Bis(2-cyanoetylo) 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforan (31)

Serię reakcji prowadzących do otrzymania bis(2-cyanoetylo) 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforanu (31) przeprowadziłam zgodnie z procedurą opracowaną przez A. Kraszewskiego i J. Stawińskiego [221] wprowadzając niewielkie modyfikacje:

POCl₃ (377 μL ; 4,13mmol; 1,5ekw.) i 1,2,4-triazol (854mg; 12,37mmol; 4,5ekw.) rozpuściłam w 20mL bezwodnego acetonitrylu. Mieszaninę reakcyjną schłodziłam w łaźni lodowej do temperatury około -5°C. Trietyloaminę dodawałam porcjami (1,7mL, 12,37mmol, 4,5ekw.) przez około 15 minut. Mieszanie kontynuowałam przez kolejne 20 minut w obniżonej temperaturze, następnie mieszaninę reakcyjną ogrzałam do temperatury pokojowej i pozostawiłam na mieszadle magnetycznym na 30 minut. Po upływie tego czasu dodałam 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidynę (1,5g, 2,75mmol, 1ekw.) i kontynuowałam mieszanie przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodałam 3-hydroksypropionitryl (781 μL , 11mmol, 4ekw.) i mieszaninę reakcyjną pozostawiłam na mieszadle magnetycznym na noc. Rano na podstawie analizy $^{31}\text{P NMR}$ stwierdziłam całkowite przereagowanie substratu. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczyłam nasyconym roztworem NaHCO₃ (20mL) i ekstrahowałam trzema porcjami CH₂Cl₂. Warstwy organiczne połączyłam i suszyłam nad bezwodnym Na₂SO₄. Rozpuszczalniki odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (CH₂Cl₂:MeOH, 2%). Otrzymałam czysty produkt (31) w postaci oleju, który liofilizowałam z benzenu otrzymując 1,6g (80%) białego ciała stałego.

$^{31}\text{P NMR a}$ (CH₂Cl₂): δ (ppm) 2,68.

$^{31}\text{P NMR b}$ (CH₂Cl₂): δ (ppm) sekstet 322,36.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 11,39 (s, 1H, H-N3); 7,49 (s, 1H, H6); 7,36-7,39 (m, 4H, H-Ar); 7,22-7,27 (m, 5H, H-Ar); 6,89 (d, $J = 8,4\text{Hz}$, 4H, H-Ar); 6,25 (t, $J = 7,2\text{Hz}$, 1H, H1'); 5,09 (m, 1H, H4'); 4,15-4,24 (m, 4H, CH₂ β gr. cyanoetylowych); 3,74 (s, 6H, OCH₃); 3,6 (m, 1H,

H3'); 3,30-3,34 (m, 1H, H5'); 3,22-3,26 (m, 1H, H5''); 2,88-2,94 (m, 4H, CH₂ α gr. cyjanoetylowych); 2,50-2,61 (m, 2H, H2',H2''); 1,46 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 163,58 (C4); 158,21 (C-OCH₃); 150,31 (C2); 149,58; 136,12 (Ar); 135,58 (C6); 135,07; 129,72; 127,93; 127,67; 123,89 (Ar); 118,11, 118,06 (CN); 113,26 (Ar); 109,88 (C5); 86,14 (4°C-DMTr); 83,65 (C4'); 83,29 (C1'); 78,13 (C3'); 63,11 (C5'); 62,80; 62,66 (PO-CH₂); 55,04 (OCH₃); 37,33 (C2'); 19,05; 18,98 (CH₂-CN); 11,65 (CH₃).

4.7.5. 2-Cyjanoetylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforan (32)

Do fosfortriestru (**31**) (1,6g, 2,2mmol) dodałam 20mL roztworu trietyloaminy w pirydynie (1:9). Mieszaninę reakcyjną pozostawiłam na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej na noc. Rano na podstawie analizy ³¹P NMR stwierdziłam ilościowe przereagowanie substratu. Rozpuszczalniki odparowałam, a surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (CH₂Cl₂:MeOH:Et₃N, 8:2:0,1). Po liofilizacji z dioksanu otrzymałam 1,4g (93%) 2-cyjanoetylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforanu (**32**) w postaci białego ciała stałego.

³¹P NMR a (H₂O): δ (ppm) 3,27.

³¹P NMR b (H₂O): δ (ppm) kwartet 388,29.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 11,38 (s, 1H, NH₃); 7,50 (s, 1H, H6); 7,36-7,40 (m, 4H, H-Ar); 7,23-7,31 (m, 5H, H-Ar); 6,91 (d, J = 9Hz, 4H, H-Ar); 6,23 (t, J = 8,4Hz, 1H, H1'); 4,72 (m, 1H, H4'); 4,13-4,21 (m, 2H, CH₂ β gr. cyjanoetylowej); 3,73 (s, 6H, OCH₃); 3,67 (m, 1H, H3'); 3,25-3,30 (m, 2H, H5',H5''); 2,66-2,79 (m, 2H, CH₂ α gr. cyjanoetylowej); 2,30-2,37 (m, 2H, H2',H2''); 1,35 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 163,62 (C4); 158,20, 158,17 (2 x C-OCH₃); 150,39 (C2); 144,62; 135,49; 135,38 (Ar); 135,18 (C6); 129,74; 127,93; 127,71 (Ar); 119,29 (CN); 113,27 (Ar); 109,69 (C5); 86,02 (4°C-DMTr); 83,62 (C1'); 74,64 (C4'); 63,96 (C5'); 59,67 (CH₂-PO); 59,36 (C3'); 55,05 (OCH₃); 45,47 (C2'); 19,34 (CH₂-CN); 11,55 (-CH₃).

4.7.6. 4-(*o*-Nitrofenylo)-N-benzylbutanamid-4-ylo 2-cyjanoetylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforan (33)

2-Cyjanoetylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforan (**32**) (1,4g, 2,06mmol, 1ekw.) i 4-hydroksy-4-(*o*-nitrofenylo)-N-benzylbutanamid (**28**) (1,3g, 4,12mmol, 2ekw.) suszyłam przez noc w eksykatorze próżniowym nad P₂O₅. Następnie oba substraty zmieszałam ze sobą, rozpuściłam w mieszaninie CH₂Cl₂ z N-metyloimidazolem (9:1, 20mL) i dodałam chlorku 2,4,6-triizopropylbenzenosulfonowego, TPSCl (3,1g, 10,3mmol, 5ekw.).

Kondensację prowadziłam przez 4 godziny. Postęp reakcji kontrolowałam za pomocą ^{31}P NMR. Po upływie 4h stwierdziłam całkowite przereagowanie 2-cyanoetylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforanu (**32**). Nadmiar TPSCl dezaktywowałam za pomocą wodnego nasyconego roztworu NaHCO_3 . Wodny roztwór ekstrahowałam trójrotnie CH_2Cl_2 . Połączone warstwy organiczne suszyłam nad bezwodnym Na_2SO_4 . Po odparowaniu rozpuszczalników produkt oczyszczałam chromatograficznie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$, 2%). Otrzymałam 1,6g produktu (**33**) w postaci białej piany (85%).

^{31}P NMR a (CH_2Cl_2): δ (ppm) 3,20; 3,26; 3,47; 35,12.

4.7.7. 4-(*o*-Nitrofenylo)-N-benzylbutanamid-4-ylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforan (**34**)

4-(*o*-Nitrofenylo)-N-benzylbutanamid-4-ylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforan (**34**) otrzymałam z 4-(*o*-nitrofenylo)-N-benzylbutanamid-4-ylo 2-cyanoetylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforanu (**33**) (1,6g, 1,64mmol) w wyniku usunięcia grupy cyanoetylowej z fosforanu jak w punkcie **8.4**. Otrzymałam 1,45g (95%) białego ciała stałego.

^{31}P NMR a (H_2O): δ (ppm) 1,02; 1,21.

^{31}P NMR b (H_2O): δ (ppm) dwa tryplety 125,46; 150,19 ($J = 8,24\text{Hz}$).

^1H NMR (DMSO): δ (ppm) 8,95; 9,02 (s, 1H, NHCO); 7,85; 7,95 (d, $J = 8,1\text{Hz}$, 1H, H6); 7,51-7,56; 7,59-7,67 (m, 1H, H-Ar); 7-15-7,32 (m, 18H, H-Ar); 6,89; 6,92 (m, 4H, H-Ar); 6,14; 6,08 (m, 1H, H1'); 5,49-5,59 (m, 1H, CH-Ph); 4,36; 4,48 (m, 1H, H4'); 4,16-4,25 (m, 2H, CONH-CH₂-Ph); 3,74 (s, 6H, OCH₃); 3,63 (m, 1H, H3'); 3,19-3,25 (m, 2H, H5',H5''); 2,24-2,43 (m, 2H, H2',H2''); 1,90-2,00 (m, 2H, CH₂); 1,64-1,81 (m, 2H, CH₂); 1,22; 1,18 (s, 3H, CH₃).

^{13}C NMR (DMSO): δ (ppm) 171,95 (CONH); 163,59 (C4); 158,24 (C-OCH₃); 150,31 (C2); 147,11 (NO₂-C); 144,54; 139,65 (Ar); 138,52 (C6); 134,95; 133,29; 129,74; 128,24; 128,14; 127,97; 127,68; 127,16; 126,54; 113,29 (Ar); 109,82 (C5); 86,12 (4°C-DMTr); 84,61 (C4'); 83,73 (C1'); 75,49 (C2'); 64,06 (C5'); 5,09 (OCH₃); 45,56 (NH-CH₂-Ph); 37,84 (C2'); 34,47 (CH₂); 31,78 (CH₂); 11,37 (CH₃).

4.8. Synteza 4-N-(8-amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynylo-N-benzylosukcyndiamidu (42)

4.8.1. 4-N-*p*-Toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyna (37)

Chlorowodorek cytydyny (2,5g, 8,96mmol, 1ekw.) odparowałam trójrotnie z pirydyną, a następnie rozpuściłam w 20mL pirydyny i dodałam chlorku trimetylosililowego (6,5mL, 44,8mmol, 5ekw.). Po około godzinnym mieszaniu w temperaturze pokojowej nastąpiło ilościowe przereagowanie substratu, co wykazała analiza TLC (CH₂Cl₂:MeOH, 9:1). Produkt sililowania bezpośrednio poddałam kolejnej reakcji. Do mieszaniny reakcyjnej dodałam chlorku *p*-toluenosulfonowego (4g, 17,9mmol, 2ekw.). Otrzymany roztwór ogrzewałam pod chłodnicą zwrotną do temperatury wrzenia pirydyny (96-100°C) przez 1,5-2 godzin. Po upływie tego czasu analiza TLC wskazywała całkowitą konwersję substratu. Nadmiar chlorków sililu i tosyłu rozłożyłam dodając nasycony roztwór NaHCO₃. Wodną warstwę ekstrahowałam trzema porcjami chlorku metylenu. Połączone warstwy organiczne suszyłam nad bezwodnym Na₂SO₄. Rozpuszczalniki odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Następnie surowy produkt rozpuściłam w 10mL MeOH i dodałam 15mL wodnego roztworu NH₃. Mieszaninę reakcyjną pozostawiłam na 45 minut na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej. Po tym czasie na podstawie analizy TLC stwierdziłam pełne odblokowanie grup hydroksylowych 4-N-(*p*-toluenosulfonylo)cytydyny. Rozpuszczalniki odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt suszyłam poprzez trójkrotne odparowanie z pirydyną. Osuszoną 4-N-(*p*-toluenosulfonylo)cytydynę rozpuściłam w 20mL pirydyny i dodałam chlorku 4,4'-dimetoksytrytylu (3,34g, 9,85mmol, 1,1ekw.). Mieszaninę reakcyjną pozostawiłam na mieszadle magnetycznym na około 1h w temperaturze pokojowej. Analiza TLC wskazywała przereagowanie substratu, więc zakończyłam reakcję dodając nasycony roztwór NaHCO₃, który ekstrahowałam trzema porcjami CH₂Cl₂. Po połączeniu warstw organicznych, osuszeniu nad bezwodnym Na₂SO₄ i odparowaniu pod zmniejszonym ciśnieniem, surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (CH₂Cl₂:MeOH, 2%). Otrzymałam czystą 4-N-*p*-toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-cytydynę (37) w postaci piany. Po liofilizacji z benzenu otrzymałam białe ciało stałe 5,44g (85%).

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 12,17 (s, 1H, HN4); 7,63 (d, J = 8,4Hz, 1H, H6); 7,36-7,39 (m, 4H, H-Ar); 7,30-7,34 (m, 5H, H-Ar); 7,24-7,28 (m, 4H, H-Ar); 6,89-6,92 (m, 4H, H-Ar); 6,23 (d, J = 8Hz, 1H, H5); 5,68 (d, J = 2,4Hz, 1H, OH); 5,59 (d, J = 4,8Hz, 1H, OH); 5,16 (d, J = 6,8Hz, 1H, H1'); 4,14-4,17 (m, 1H, H4'); 4,06-4,09 (m, 1H, H2'); 3,96-3,98 (m, 1H, H3'); 3,76 (s, 6H, OCH₃); 3,23-3,32 (m, 2H, H5', H5''); 2,37 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 159,51 (C4); 158,16 (C-OCH₃, DMTr); 149,51 (C2); 144,35 (Ar); 142,34 (C-CH₃, Tos); 142,08 (C6); 139,69; 136,10; 135,45; 135,08; 129,74; 129,63; 129,35; 128,30; 127,92; 127,73; 126,85; 126,04; 123,88; 113,25 (Ar); 95,67 (C5); 89,83 (C1'); 85,96 (4°C, DMTr); 82,06 (C4'); 73,08 (C2'); 68,78 (C3'); 62,04 (C5'); 55,01 (OCH₃); 20,93 (CH₃).

4.8.2. 4-N-*p*-Toluenosulfonylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-cytydyna (38)

4-N-*p*-Toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-cytydynę (37) (1g, 1,43mmol, 1ekw.) odparowałam trzykrotnie z pirydyną, a następnie rozpuściłam w pirydynie (25mL), dodając chloku benzoilu (0,36mL, 3,15mmol, 2,2ekw.). Mieszanie prowadziłam w temperaturze pokojowej przez 1,5h. Po upływie tego czasu nastąpiło całkowite przereagowanie substratu (na podstawie analizy TLC – heksan:CH₂Cl₂:MeOH, 3:7:1). Dodałam nasycony roztwór NaHCO₃, który ekstrahowałam trzema porcjami CH₂Cl₂. Warstwy organiczne połączyłam i suszyłam nad bezwodnym Na₂SO₄. Po doparowaniu rozpuszczalników surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (CH₂Cl₂:heksan, 8:2). Otrzymałam 1,2g (94%) czystej 4-N-*p*-toluenosulfonylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyny (38) w postaci piany.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 12,28 (s, 1H, HN4); 8,02 (d, J = 8Hz, 1H, C6); 7,83-7,88 (m, 4H, H-Ar); 7,62-7,72 (m, 3H, H-Ar); 7,35-7,50 (m, 9H, H-Ar); 7,21-7,32 (m, 7H, H-Ar); 6,81-6,84 (m, 4H, H-Ar); 6,45 (d, J = 8Hz, 1H, H5); 6,11 (d, J = 3,2Hz, 1H, H1'); 5,92 (t, J = 6Hz, 1H, H2'); 5,87 (t, J = 6Hz, 1H, H3'); 4,49-4,52 (m, 1H, H4'); 3,69 (s, 6H, OCH₃); 3,38-3,52 (m, 2H, H5', H5'); 2,37 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 164,49; 164,40 (COOPh); 159,54 (C4); 158,12 (C-OCH₃, DMTr); 149,59 (C2); 144,31 (Ar); 143,26 (C6); 142,50 (C-CH₃, Tos); 139,58; 136,10; 135,12; 135,03; 133,88; 133,82; 129,66; 129,45; 129,34; 129,23; 128,729; 128,48; 127,87; 127,64; 126,80; 126,09; 123,88; 113,20 (Ar); 96,28 (C5); 89,37 (C1'); 86,15 (4°C, DMTr); 80,29 (C4'); 73,79 (C2'); 70,17 (C3'); 62,20 (C5'); 54,97; 54,95 (OCH₃); 20,94 (CH₃).

4.8.3. 4-N-(8-Amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyna (39)

4-N-*p*-Toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynę (37) (4,44g, 6,35mmol, 1ekw.) odparowałam trójrotnie z bezwodną pirydyną w celu pozbycia się śladowych ilości wody. Następnie rozpuściłam substrat w pirydynie (20mL) i dodałam 2,2'-(etylenodioksy)-bis(etyloaminę) (5,5mL, 44,45mmol, 7ekw.). Kolbę zamknęłam szczelnie i umieściłam w suszarce w temperaturze 80°C na noc. Rano wykonałam analizę TLC (MeOH:H₂O:CH₃NH₂,

7:2:1) która wskazała ilościowe przereagowanie substratu. Mieszaninę reakcyjną rozcieńczyłam 30mL H₂O. Warstwę wodną ekstrahowałam trzema porcjami AcOEt (w razie utworzenia emulsji roztwór wirowałam). Warstwy organiczne połączyłam i suszyłam nad bezwodnym Na₂SO₄. Po odparowaniu rozpuszczalników pod zmniejszonym ciśnieniem, surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (CH₂Cl₂:MeOH, 6:4). Otrzymałam 3,5g (82%) czystej 4-N-(8-amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyny (**39**) w postaci białej piany.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 7,86 (t, J = 5,6Hz, 1H, H-N4); 7,72 (d, J = 7,6Hz, 1H, H5); 7,22-7,39 (m, 9H, H-Ar); 6,91 (m, 4H, H-Ar); 5,78 (d, J = 2,8Hz, 1H, H1'); 5,60 (d, J = 7,6Hz, 1H, H6); 4,08 (t, J = 6Hz, H4'); 3,93-3,95 (m, 2H, H2', H3''); 3,75 (s, 6H, OCH₃); 3,50-3,55 (m, 8H, H5', H5'', CH₂ gr. hydroksydietoksyetylowej); 3,20-3,43 (m, 6H, CH₂ gr. hydroksydietoksyetylowej); 2,66 (t, J = 5,6Hz, 2H, NH₂).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 163,43 (C4); 158,12 (C-OCH₃, DMTr); 155,06 (C2); 144,71 (C6); 139,81; 135,46; 135,29; 129,87; 127,72; 126,77; 113,23 (Ar); 94,44 (C5); 89,78 (C1'); 85,77 (4°C, DMTr); 81,65 (C4'); 74,08 (C2'); 71,77 (CH₂ gr. hydroksydietoksyetylowej); 69,58; 69,55 (CH₂ gr. hydroksydietoksyetylowej); 69,27 (C3'); 68,65 (CH₂ gr. hydroksydietoksyetylowej); 62,73 (C5'); 55,03 (OCH₃); 40,77 (CH₂ gr. hydroksydietoksyetylowej).

4.8.4. 4-N-(8-Amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynylo-sukcynamid (**40**)

4-N-(8-Amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynę (**39**) (915mg, 1,35mmol, 1ekw.) rozpuściłam w chlorku metylenu i dodałam bezwodnik kwasu bursztynowego (140mg, 1,35mmol, 1ekw.), trietyloaminę (190μL, 1,35mmol, 1ekw.) oraz DMAP (20mg). Mieszaninę reakcyjną umieściłam na mieszadle magnetycznym i pozostawiłam na 2h w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu analiza TLC (CH₂Cl₂:MeOH, 6:4) wskazywała całkowite przereagowanie substratu. Rozpuszczalniki odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem, a surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (CH₂Cl₂:MeOH, 7:3). Otrzymałam 790mg (75%) czystego produktu w postaci białego osadu.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 8,05 (t, J = 5,6Hz, 1H, H-N4); 8,01 (t, J = 5,2Hz, 1H, CONH); 7,71 (d, J = 7,6Hz, 1H, H6); 7,21-7,39 (m, 9H, H-Ar); 6,95 (m, 4H, H-Ar); 5,78 (d, J = 3,2Hz, 1H, H1'); 5,64 (d, J = 7,6Hz, 1H, H5); 4,07 (t, J = 6,4Hz, 1H, H4'); 3,93-3,95 (m, 2H, H2', H3'); 3,77 (s, 6H, OCH₃); 3,15-3,56 (m, 14H, H5', H5'', CH₂ gr. hydroksydietoksyetylowej); 2,23-2,33 (m, 4H, CH₂ kwasu bursztynowego).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 177,65 (COOH); 171,78 (CONH); 163,42 (C4); 158,09 (C-OCH₃, DMTr); 155,05 (C2); 144,72 (C6); 139,81; 135,46; 135,29; 129,71; 127,87; 127,70; 126,75; 113,23 (Ar); 94,51 (C5); 89,81 (C1'); 85,73 (4°C, DMTr); 81,65 (C4'); 74,12 (C2'); 71,77 (CH₂); 69,58; 69,54 (CH₂ gr. hydroksydietoksyetylowej); 69,30 (C3'); 68,65 (CH₂ gr. hydroksydietoksyetylowej); 62,78 (C5'); 55,04 (OCH₃); 38,51 (CH₂ gr. hydroksydietoksyetylowej); 31,01; 30,72 (CH₂ kwasu bursztynowego).

4.8.5. Kwas 4-(benzyloamino)-4-oksobutanowy (41)

Benzyloaminę (1mL, 9,3mmol, 1ekw.) rozpuściłam w chlorku metylenu i dodałam bezwodnika kwasu bursztynowego (1,05g, 10,4mmol, 1,1ekw.), trietyloaminę (1,3mL, 9,3mmol, 1ekw.) oraz DMAP (20mg). Mieszaninę reakcyjną umieściłam na mieszadle magnetycznym na 2h w temperaturze pokojowej. Analiza TLC (*i*-PrOH:H₂O, 9:1) wykazała całkowitą konwersję substratu. Do mieszaniny reakcyjnej dodałam wody. Warstwę wodną ekstrahowałam trzema porcjami CH₂Cl₂. W trakcie odparowywania warstwy wodnej czysty kwas 4-(benzyloamino)-4-oksobutanowy (41) zaczął wypadać w postaci białych płatków (1,7g, 98%).

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 12,12 (s, 1H, COOH); 8,37 (t, J = 5,6Hz, 1H, CONH); 7,02-7,32 (m, 5H, H-Ar); 4,27 (d, J = 6Hz, 2H, CH₂-Ph); 2,33-2,50 (m, 4H, CH₂).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 173,90 (COOH); 171,00 (CONH); 139,59; 128,20; 127,12; 126,65 (Ar); 42,00 (CH₂-Ph); 29,99; 29,16 (CH₂).

4.8.6. 4-N-(8-Amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynylo-N-benzylosukcyndiamid (42)

4-N-(8-Amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynę (39) (300mg, 0,44mmol, 1ekw.) rozpuściłam w 5mL chlorku metylenu. Do roztworu dodałam kwas 4-(benzyloamino)-4-oksobutanowy (41) (230mg, 1,11mmol, 2,5ekw.), DCC (228mg, 1,11mmol, 2,5ekw.), Et₃N (155μL, 1,11mmol, 2,5ekw.) i DMAP (20mg). Reakcję prowadziłam 12h w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu analiza TLC wykazała całkowite przereagowanie 4-N-(8-amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyny. Do mieszaniny reakcyjnej dodałam H₂O. Warstwę wodną ekstrahowałam trzykrotnie chlorkiem metylenu. Warstwy organiczne połączyłam, suszyłam na bezwodnym Na₂SO₄ i odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (CH₂Cl₂:MeOH, 5%). Otrzymałam 290mg (76%) czystego produktu (42) w postaci białego ciała stałego.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 8,43 (t, 1H, CONH); 8,37 (t, J = 5,1Hz, 1H, CONH); 7,91 (t, 1H, H-N4); 7,22-7,41 (m, 16, H-Ar, H6); 6,88-6,91 (m, 4H, H-Ar); 5,69 (d, 1H, H1'); 5,59 (t, 1H, H3'); 5,45 (d, 1H, H5); 4,27 (d, 2H, CH₂-Ph); 4,95 (m, 1H, H2'); 3,95 (t, 1H, H4'); 3,74 (s, 6H, OCH₃); 3,16-3,52 (m, 14H, H5', H5'', CH₂ gr. hydroksydietoksyetylowej); 2,36-2,51 (m, 4H, CH₂ kwasu bursztynowego).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 171,42 (CONH); 171,36 (CONH); 163,42 (C4); 158,12 (C-OCH₃, DMTr); 156,62 (C2); 144,72 (C6); 139,80; 139,61; 139,43; 135,45; 135,29; 135,17; 129,72; 128,19; 127,15; 127,09; 126,63; 113,23 (Ar); 94,45 (C5); 89,82 (C1'); 85,76 (4°C, DMTr); 81,64 (C4'); 74,08 (C2'); 74,08; 69,56; 69,52 (CH₂ gr. hydroksydietoksyetylowej); 69,24 (C3'); 69,12 (CH₂ gr. hydroksydietoksyetylowej); 62,71 (C5'); 55,01 (OCH₃); 47,48 (CH₂-Ph); 42,07; 38,51 (CH₂ gr. hydroksydietoksyetylowej); 33,32; 30,70 (CH₂ kwasu bursztynowego).

4.9. „Podłoże oksylabilne” (45)

Podłoże polistyrenowe sfunkcjonalizowane grupami metyloaminowymi **11** (1g) zawiesiłam w 10mL bezwodnego CH₂Cl₂ i dodałam bezwodnik kwasu bursztynowego (500mg), Et₃N (500 μ L) oraz DMAP (20mg). Zamknęłam szczelnie i wytrząsałam przez noc w temperaturze pokojowej. Rano podłoże odsączyłam i przemyłam MeOH (100mL) i CH₂Cl₂ (100mL). Suszyłam na powietrzu. Otrzymane w ten sposób podłoże niosące grupy karboksylowe (**12**) zawiesiłam w 10mL chlorku metylenu. Do zawiesiny dodałam 4-N-(8-amino-3,6-dioksaoktylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynę (**39**) (1g, 1,5mmol, 1ekw.), DCC (700mg, 1,5mmol, 1ekw.), Et₃N (450 μ L, 1,5mmol, 1ekw.) i DMAP (20mg). Całość wytrząsałam przez noc w temperaturze pokojowej. Podłoże odsączyłam i przemyłam metanolem (50mL) i chlorkiem metylenu (50mL). W celu rozłożenia produktów ubocznych dodałam 10mL NH₃ aq. (32%). Reakcję prowadziłam w temperaturze 60°C przez 4 godziny. Następnie zawiesiłam ziarna podłoża w MeCN (10mL) i dodałam bezwodnik kwasu octowego (500 μ L), N-metyloimidazol (1,34mL) i 2,6-lutydynę (500 μ L). Mieszaninę wytrząsałam przez 2 godziny, po czym podłoże odsączyłam, przemyłam MeOH, CH₂Cl₂ i suszyłam na powietrzu.

4.10. Synteza tymidyn-3'-ylo cytydyn-5'-ylo fosforanu (47)

4.10.1. 4-N-Benzoilocytydyna

Chlorowodorek cytydyny (2g, 7,2mmol, 1ekw.) odparowałam trójrotnie z pirydyną i rozpuściłam w pirydynie (20mL). Dodałam następnie chlorek trimetylosililu (4,5mL,

36mmol, 5ekw.). Mieszaninę reakcyjną pozostawiłam na mieszadle magnetycznym na 1,5h w temperaturze pokojowej. Po stwierdzeniu całkowitego przereagowania substratu (TLC – CH₂Cl₂:MeOH, 9:1) dodałam chlorku benzoilu (1,8mL, 14,4mmol, 2ekw.) i kontynuowałam mieszanie przez 2h. Po upływie tego czasu stwierdziłam zanik substratu. Mieszaninę reakcyjną schłodziłam w łaźni lodowej i dodałam porcjami 25mL roztworu amoniaku. Po upływie 30 minut odparowałam rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem. Pozostałość rozpuściłam w 35mL H₂O i dodałam 25mL AcOEt. Całość wytrząsnęłam i wstawiłam do lodówki. Po schłodzeniu mieszaniny z wodnej warstwy wypadł biały serowaty osad, który odsączyłam, przemyłam AcOEt i suszyłam pod zmniejszonym ciśnieniem nad P₂O₅. Otrzymałam 2,25g (91%) czystej 4-N-benzoilocytydyny.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 11,03 (s, 1H, HNCO); 7,72 (d, J = 7,2Hz, 1H, H6); 7,39-7,61 (m, 2H, H-Ar); 7,25-7,32 (m, 3H, H-Ar); 5,78 (d, J = 7,2Hz, 1H, H5); 5,68 (d, J = 2,5Hz, 1H, OH); 5,59 (d, J = 5,6Hz, 1H, OH); 5,16 (d, J = 6,8Hz, 1H, H1'); 4,14-4,17 (m, 1H, H4'); 4,06-4,09 (m, 1H, H2'); 3,96-3,98 (m, 1H, H3'); 3,23-3,32 (m, 2H, H5', H5'').

4.10.2. 4-N-2',3'-O-Tribenzoilocytydyna

4-N-Benzoilocytydynę (2,25g, 6,48mmol, 1ekw.) rozpuściłam w 20mL pirydyny i dodałam chlorku 4,4'-dimetoksytrytylu (2,4g, 7,13mmol, 1,1ekw.). Mieszaninę reakcyjną umieściłam na mieszadle magnetycznym na 1h. Dodałam następnie chlorku benzoilu (2mL, 16,2mmol, 2,5ekw.) i kontynuowałam mieszanie przez 1,5h. Po stwierdzeniu całkowitego zaniku substratu dodałam nasycony roztwór NaHCO₃, który ekstrahowałam trzema porcjami chlorku metylenu. Połączone warstwy organiczne suszyłam nad bezwodnym Na₂SO₄. Następnie rozpuszczalniki odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Rozpuściłam go w 15mL chlorku metylenu i dodawałam porcjami kwas dichlorooctowy do momentu, w którym nie obserwowałam zmiany odcienia czerwieni. Po około 30 minutach mieszaninę reakcyjną schłodziłam w łaźni lodowej i dodawałam porcjami nasycony roztwór NaHCO₃ aż do zaniku czerwonej barwy roztworu. Warstwę wodną ekstrahowałam trzema porcjami CH₂Cl₂, które następnie połączyłam i suszyłam nad Na₂SO₄. Rozpuszczalnik odparowałam, a surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (CH₂Cl₂:MeOH, 2%). Otrzymałam 2,45g (68%) 4-N-2',3'-O-tribenzoilocytydyny w postaci białej piany.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 11,31 (s, 1H, H-NCO); 8,03 (d, J = 8Hz, 1H, C6); 7,83-7,88 (m, 3H, H-Ar); 7,62-7,72 (m, 3H, H-Ar); 7,35-7,50 (m, 9H, H-Ar); 6,45 (d, J = 8Hz, 1H, H5); 6,11 (d, J = 3,2Hz, 1H, H1'); 5,92 (t, J = 6Hz, 1H, H2'); 5,87 (t, J = 6Hz, 1H, H3'); 4,49-4,52 (m, 1H, H4'); 3,69 (s, 6H, OCH₃); 3,38-3,52 (m, 2H, H5', H5'').

4.10.3. 2-Cyanoetylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo 4-N-2'3'-O-tribenzoilocytydyn-5'-ylo fosforan (46)

2-Cyanoetylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo fosforan (**32**) (1,3g, 1,8mmol, lekw.), który otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w punktach **8.3**, **8.4** i **8.5** użyłam jako substrat do syntezy 2-cyanoetylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo 4-N-2'3'-O-tribenzoilo-cytydyn-5'-ylo fosforanu (**46**). Otrzymałam go za pomocą metody triestrowej, opisanej w punkcie **8.6** (1,7g, 79%).

³¹P NMR a (CH₂Cl₂): δ (ppm) 2,82; 2,94.

³¹P NMR b (CH₂Cl₂): δ (ppm) 338,46; 352,85.

4.10.4. Tymidyn-3'-ylo cytydyn-5'-ylo fosforan (47)

Grupę cyanoetylową z reszty fosforanowej 2-cyanoetylo 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo 4-N-2'3'-O-tribenzoilocytydyn-5'-ylo fosforanu (**46**) (1,7g, 1,4mmol) usunęłam jak w punkcie **8.7** otrzymując 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo 4-N-2'3'-O-tribenzoilo-cytydyn-5'-ylo fosforan, którego funkcje aminową oraz 2',3' hydroksylowe odblokowałam za pomocą roztworu amoniaku (noc 55°C), a dimetoksytrytylową CHCl₂COOH. Otrzymałam tym samym tymidyn-3'-ylo cytydyn-5'-ylo fosforan (**47**) (1,35g, 83%).

³¹P NMR a (H₂O): δ (ppm) 0,98.

³¹P NMR b (H₂O): δ (ppm) tryplet 120,88, J = 7,3Hz.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 11,36 (s, 1H, H-N3, T); 7,71 (d, J = 7,2Hz, 1H, H6, C); 7,48 (s, 1H, H6, T); 6,22 (t, J = 8Hz, 1H, H1', T); 5,78 (d, J = 2,8Hz, 1H, H1', C); 5,69 (d J = 7,6Hz, 1H, C5, C); 5,33 (d, 1H, OH, C); 5,29 (m, 1H, OH, C); 4,74 (m, 1H, H4', T); 4,13 (m, 1H, H4', C); 3,87-3,91 (m, 5H, H5', H5'', T i C, H3', C); 3,26-3,35 (m, 3H, H2' i H3', C, H3', T); 2,28-2,43 (m, 2H, H2', H2'', T); 1,36 (s, 3H, CH₃, T).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 165,51 (C4, T); 163,63 (C4, C); 155,39 (C2, C); 150,39 (C2, T); 144,60 (C6, T); 141,23 (C6, C); 109,69 (C5, T); 93,99 (C5, C); 84,02 (C1', C); 83,87 (C3', C); 82,38 (C3', T); 73,99 (C1', T); 69,88 (C2', C); 64, 21; 63,93 (C5', T i C); 48,58 (C4', T); 45,36 (C4', C); 38,37 (C2', T); 11,55 (CH₃, T).

4.11. 2-O-Amidofosforyn 4-N-(2-(2-Hydroksyetoksy)etylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksy-trytylo)cytydyny (51)

4.11.1. 4-N-(2-(2-Hydroksyetoksy)etylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyna (48)

4-N-*p*-Toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynę (**37**) (2,5g, 3,6mmol, 1ekw.) rozpuściłam w 15mL pirydyny i dodałam 2-(2-aminoetoksy)etanol (2,5mL, 25mmol, 7ekw.). Mieszaninę reakcyjną wstawiłam do suszarki i zostawiłam w temperaturze 80°C na noc. Rano dodałam do mieszaniny wody i przeprowadziłam ekstrakcję warstwy wodnej trzema porcjami chlorku metylenu. Warstwy organiczne połączyłam, suszyłam nad Na₂SO₄ i odparowałam. Surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (CH₂Cl₂:MeOH, 8:2). Otrzymałam 4-N-(2-(2-hydroksyetoksy)etylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynę (**48**) w postaci piany, którą liofilizowałam z benzenu - 2,2g (97%).

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 7,8 (t, J = 4,1Hz, 1H, H-N4); 7,74 (d, J = 7,5Hz, 1H, H6); 7,24-7,40 (m, 9H, H-Ar); 6,88-6,91 (m, 4H, H-Ar); 5,78 (d, J = 2,7Hz, 1H, H1'); 5,60 (d, J = 7,5Hz, 1H, H5); 5,46 (d, J = 5,1Hz, 1H, OH); 5,06 (d, J = 6,3Hz, 1H, OH); 4,62 (t, J = 5,4Hz, 1H, OH gr. hydroksyetoksyetylowej); 4,01-4,08 (m, 1H, H4'); 3,93-3,96 (m, 2H, H2', H3'); 3,74 (s, 6H, OCH₃); 3,41-3,52 (m, 8H, CH₂ gr. hydroksyetoksyetylowej); 3,21-3,26 (m, 2H, H5', H5'').

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 163,62 (C4); 158,13 (C-OCH₃, DMTr); 154,62 (C2); 144,53 (C6); 141,20; 135,17; 135,13; 129,69; 128,72 127,86; 126,77; 113,20 (Ar); 95,24 (C5); 89,58 (C1'); 86,05 (4°C, DMTr); 79,97 (C4'); 74,08 (C2'); 72,15; 69,58; 69,55 (CH₂ gr. hydroksyetoksyetylowej); 68,86 (C3'); 68,51 (CH₂ gr. hydroksyetoksyetylowej); 63,05 (C5'); 60,15 (CH₂ gr. hydroksyetoksyetylowej); 54,97 (OCH₃); 40,59 (CH₂ gr. hydroksyetoksyetylowej).

4.11.2. 4-N-(2-(2-*tert*-Butylodimetylosililoksyetoksy)etylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyna (49)

4-N-(2-(2-Hydroksyetoksy)etylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynę (**48**) (2,2g, 3,5mmol, 1ekw.) rozpuściłam w pirydynie i dodałam chlorku *tert*-butylodimetylosililu (576mg, 3,8mmol 1,1ekw.). Całość zostawiłam na mieszadle magnetycznym na 1,5h. Po tym czasie analiza TLC wykazała całkowity zanik substratu. Dodałam więc chlorku benzoilu (1mL, 7mmol, 2,2ekw.) i kontynuowałam mieszanie przez 1h. Dodałam następnie nasycony roztwór NaHCO₃. Warstwę wodną ekstrahowałam chlorkiem metylenu. Ekstrakty połączyłam i suszyłam nad Na₂SO₄ i odparowałam. Surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (CH₂Cl₂:heksan, 8:2). Otrzymałam 2,95g (89%) 4-N-(2-(2-*tert*-

butylodimetylosililoksyetoksy)etylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-
cytydyny (**49**) w postaci piany.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 8,51 (t, J = 5,1Hz, 1H, H-N4); 7,79-7,96 (m, 7H, H6, H-Ar); 7,60-7,69 (m, 2H, H-Ar); 7,40-7,52 (m, 5H, H-Ar); 6,31 (d, J = 5,1Hz, 1H, H1'); 5,89 (d, J = 7,5Hz, 1H, H5); 5,64-5,70 (m, 2H, H2', H3'); 4,63 (m, 1H, H4'); 3,97 (t, J = 3,6Hz, 2H, CH₂-OSi); 3,74 (s, 6H, OCH₃); 3,34-3,53 (m, 8H, H5', H5'', CH₂ gr. hydroksyetoksyetylowej); 0,91 (s, 9H, CH₃ gr. *tert*-Bu); 0,12 (s, 6H, CH₃ silanu).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 164,69; 164,43 (COOPh); 163,42 (C4); 158,13 (C-OCH₃, DMTr); 154,73 (C2); 144,53 (C6); 139,72; 134,41; 133,87; 133,81; 131,08; 129,26; 129,22; 128,80 128,71; 128,35; 128,22; 127,13; 113,20 (Ar); 95,39 (C5); 87,19 (C1'); 86,05 (4°C, DMTr); 82,03 (C4'); 73,96 (C2'); 72,14; 71,58 (CH₂ gr. hydroksydietoksyetylowej); 68,86 (C3'); 68,49 (CH₂ gr. hydroksyetoksyetylowej); 62,83 (C5'); 60,18; 60,14 (CH₂ gr. hydroksyetoksyetylowej); 54,97 (OCH₃); 38,45 (CH₂ gr. hydroksyetoksyetylowej); 25,70 (CH₃ gr. *tert*-Bu); 17,92 (4°C gr. *tert*-Bu); -5,63 (CH₃ silanu).

4.11.3. 4-N-(2-(2-Hydroksyetoksy)etylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyna (**50**)

4-N-(2-(2-*tert*-Butylodimetylosililoksyetoksy)etylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynę (**49**) (2,95g, 3,1mmol) rozpuściłam w THF (15mL) i dodałam 1M roztworu fluorku trietyloamoniowego (10mL). Po upływie dwóch godzin na podstawie analizy TLC stwierdziłam całkowite przereagowanie substratu. Do mieszaniny dodałam wody i ekstrahowałam trzema porcjami CH₂Cl₂. Ekstrakty połączyłam i suszyłam nad bezwodnym Na₂SO₄. Po odparowaniu rozpuszczalników surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (CH₂Cl₂:MeOH; 4%), otrzymując 2,5g czystej 4-N-(2-(2-hydroksyetoksy)etylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydynę (**50**) w postaci piany (98%).

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 7,97 (t, J = 5,2Hz, 1H, H-N4); 7,83-7,90 (m, 4H, H-Ar); 7,73 (d, J = 7,6Hz, 1H, H6); 7,68 (m, 2H, H-Ar); 7,36-7,52 (m, 6H, H-Ar); 7,28 (m, 7H, H-Ar); 6,85 (m, 4H, H-Ar); 6,12 (d, J = 3,6Hz, 1H, H1'); 5,81-5,85 (m, 2H, H2', H3'); 5,76 (d, J = 7,6Hz, 1H, H5); 4,61 (t, J = 5,6Hz, 1H, OH gr. hydroksyetoksyetylowej); 4,49 (m, 1H, H4'); 3,70 (s, 6H, OCH₃); 3,42-3,54 (m, 10H, H5', H5'', CH₂ gr. hydroksyetoksyetylowej).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 164,69 (COOPh); 163,42 (C4); 158,13 (C-OCH₃, DMTr); 154,62 (C2); 144,53 (C6); 141,53; 135,16; 135,13; 134,43; 133,87; 133,77; 132,82; 131,08; 129,69; 129,28; 129,24; 128,72; 128,61; 128,53; 128,22; 127,86; 127,61; 127,13; 113,20 (Ar); 95,24 (C5); 89,58 (C1'); 86,05 (4°C, DMTr); 79,97 (C4'); 73,73 (C2'); 72,15; 71,22 (CH₂ gr. hydroksydietoksyetylowej); 68,86 (C3'); 68,51 (CH₂ gr. hydroksyetoksyetylowej); 63,05

(C5'); 60,15 (CH₂ gr. hydroksyetyloksyetylowej); 54,97 (OCH₃); 38,51 (CH₂ gr. hydroksyetyloksyetylowej).

4.11.4. 2-O-Amidofosforyn 4-N-(2-(2-Hydroksyetyloksy)etylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyna (51)

2-O-Amidofosforyn 4-N-(2-(2-Hydroksyetyloksy)etylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)cytydyny (51) otrzymałam z 4-N-(2-(2-hydroksyetyloksy)etylo-2',3'-O-dibenzoilo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-cytydyny (50) (2,5g) według standardowej procedury opisanej w punkcie 7.3. Otrzymałam 2,7g czystego produktu (51) (86%).

³¹P NMR (CH₂Cl₂): δ (ppm) 148,05.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 7,98 (t, J = 5,1Hz, 1H, H-N4); 7,89 (m, 4H, H-Ar); 7,72 (d, J = 7,5Hz, 1H, H6); 7,19-7,66 (m, 15H, H-Ar); 6,85 (m, 4H, H-Ar); 6,13 (d, 1H, H1'); 5,85 (m, 2H, H2', H3'); 5,76 (d, J = 7,5Hz, 1H, H5); 4,49 (m, 1H, H4'); 3,67 (s, 6H, OCH₃); 3,38-3,61 (m, 14H, H5', H5'', CH₂ gr. hydroksyetyloksyetylowej i cyanoetylowej); 2,77 (m, 2H, CH gr. *i*-Pr); 1,11 (s, 12H, CH₃ gr. *i*-Pr).

4.12. Synteza 3'-amidofosforynów N-blokowanych 5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksynukleozydów (53A-D)

4.12.1. N-Blokowane 2'-deoksynukleozydy (52A-C)

N-blokowane 2'-deoksynukleozydy otrzymałam z 2'-deoksynukleozydów (8mmol) analogicznie jak 4-N-benzoilocytydynę. Procedurę opisałam w punkcie 11.1.

A) 6-N-Benzoilo-2'-deoksyadenozyna (2,5g, 89%)

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 11,18 (s, 1H, HNCO); 8,74 (s, 1H, H8); 8,73 (s, 1H, H2); 8,14 (m, 2H, H-Ar); 7,28-7,67 (m, 3H, H-Ar); 6,49 (t, J = 4,8Hz, 1H, H1'); 5,43 (d, 1H, 3'OH); 5,06 (t, 1H, 5'OH); 4,46 (m, 1H, H4'); 3,91 (m, 1H, H3'); 3,52-3,65 (m, 2H, H5', H5''); 2,75-2,82 (m, 1H, H2'); 2,34-2,39 (m, 1H, H2'').

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 165,70 (CONH); 151,89 (C6); 151,48 (C2); 150,29 (C4); 143,06 (C8); 133,37; 132,42; 128,55; 128,45 (Ar); 124,08 (C5); 87,99 (C4'); 83,72 (C1'); 70,68 (C3'); 61,58 (C4'); 38,97 (C2').

B) 4-N-Benzoilo-2'-deoksytydyna (2,47g, 91%)

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 11,23 (s, 1H, H-N4); 8,41 (d, J = 7,2Hz, 1H, H6); 8,01 (m, 2H, H-Ar); 7,48-7,65 (m, 3H, H-Ar); 6,16 (t, J = 6Hz, 1H, H1'), 5,30 (d, J = 4,2Hz, 1H, 3'OH);

5,11 (t, $J = 5,1\text{Hz}$, 1H, 5'OH); 4,26 (m, 1H, H4'); 3,89 (m, 1H, H3'); 3,55-3,68 (m, 2H, H5', H5''); 2,28-2,36 (m, 1H, H2'); 2,02-2,1 (m, 1H, H2'').

^{13}C NMR (DMSO): δ (ppm) 167,41 (COOPh); 162,98 (C4); 154,36 (C2); 144,96 (C6); 133,18; 132,69; 130,02; 128,43 (Ar); 96,03 (C5); 87,94 (C4'); 86,19 (C1'); 69,91 (C3'); 60,92 (C5'); 40,89 (C2').

C) 2-N-*izo*-Butyrylo-2'-deoksyguanozyna (2,15g, 87%)

^1H NMR (DMSO): δ (ppm) 12,06 (s, 1H, HNCO); 11,71 (s, 1H, H-N1); 8,23 (s, 1H, H8); 6,22 (t, $J = 6,6\text{Hz}$, 1H, H1'); 5,37 (d, 1H, 3'OH); 4,95 (t, 1H, 5'OH); 4,37 (m, 1H, H4'); 3,84 (m, 1H, H3'); 3,47-3,59 (m, 2H, H5', H5''); 2,73-2,82 (m, 1H, CH gr. *i*-Bu); 2,49-2,59 (m, 1H, H2'); 2,24-2,31 (m, 1H, H2''); 1,12 i 1,09 (s, 6H, CH₃ gr. *i*-Bu).

^{13}C NMR (DMSO): δ (ppm) 179,99 (CONH); 154,86 (C6); 148,36 (C4); 148,05 (C2); 137,46 (C8); 120,15 (C5); 87,72 (C4'); 82,98 (C1'); 70,48 (C3'); 61,44 (C5'), 39,69 (C2'); 34,71 (CH gr. *i*-Bu); 18,84 (CH₃ gr. *i*-Bu).

4.12.2. N-Blokowane 5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksynukleozydy

N-Blokowany nukleozyd (lub tymidyne) (1ekw.) odparowałam trójrotnie z pirydyną. Następnie rozpuściłam w pirydynie i dodałam chlorku fluorenylometyloksykarbonylu (1,1ekw.). Mieszaninę reakcyjną pozostawiłam na mieszadle magnetycznym na 1,5 – 2h. Po upływie tego czasu analiza TLC wskazywała całkowity zanik substratu. Dodałam nasycony roztwór NaHCO₃. Warstwę wodną ekstrahowałam CH₂Cl₂. Ekstrakty połączyłam, suszyłam nad bezwodnym Na₂SO₄ i odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowe produkty oczyszczałam chromatograficznie (CH₂Cl₂:MeOH; 3%) otrzymując czyste N-blokowane 5'-O- fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksynukleozydy w postaci białego ciała stałego.

A) 6-N-Benzoilo-5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksyadenozyna (3,29g, 81%)

^1H NMR (DMSO): δ (ppm) 11,28 (s, 1H, HNCO); 8,65 (s, 1H, H8); 8,57 (s, 1H, H2); 7,29-8,12 (m, 13H, H-Ar); 6,38 (m, 1H, H1'); 5,51 (d, 1H, 3'OH); 4,47-4,68 (m, 2H, CH₂-COO); 4,43 (m, 1H, H4'); 4,26-4,32 (m, 2H, H5', H5''); 3,98 (m, 1H, H3'); 2,11-2,51 (m, 3H, CH gr. Fmoc, H2', H2'').

B) 4-N-Benzoilo-5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksytydina
(3,13g, 76%)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 11,32 (s, 1H, H-N4); 7,80-8,02 (m, 6H, H6, H-Ar); 7,27-7,69 (m, 8H, H-Ar); 6,19 (m, $J = 6\text{Hz}$, 1H, H1'); 5,30 (d, $J = 4,2\text{Hz}$, 1H, 3'OH); 4,50-4,59 (m, 2H, CH₂-COO); 4,38 (m, 1H, H4'); 4,28-4,33 (m, 2H, H5', H5''); 4,20 (m, 1H, H3'); 2,01-2,45 (m, 3H, CH gr. Fmoc, H2', H2'').

C) 2-N-*izo*-Butyrylo-5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksyguanozyna
(2,4g, 67%)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 12,11 (s, 1H, HNCO); 11,86 (s, 1H, H-N1); 7,31-8,15 (m, 9H, H8, H-Ar); 6,17 (t, $J = 5,8\text{Hz}$, 1H, H1'); 5,15 (d, 1H, 3'OH); 4,38-4,59 (m, 2H, CH₂-COO); 4,28 (m, 1H, H4'); 4,19-4,27 (m, 2H, H5', H5''); 4,06 (m, 1H, H3'); 2,69-2,78 (m, 1H, CH gr. *i*-Bu); 2,10-2,48 (m, 3H, CH gr. Fmoc, H2', H2''); 1,10 i 1,07 (s, 6H, CH₃ gr. *i*-Bu).

D) 5'-O-Fluorenylometyloksykarbonylotymidyna (3,25g, 85%)

$^1\text{H NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 11,27 (s, 1H, H-N3); 7,27-7,85 (m, 9H, H6, H-Ar); 6,31 (t, $J = 4,5\text{Hz}$, 1H, H1'); 5,01 (d, 1H, 3'OH); 4,41-4,58 (m, 2H, CH₂-COO); 4,39 (m, 1H, H4'); 4,09-4,35 (m, 2H, H5', H5''); 3,87 (m, 1H, H3'); 2,03-2,41 (m, 3H, H2', H2'', CH gr. Fmoc); 1,98 (s, 3H, CH₃).

4.12.3. 3'-Amidofosforyny N-blokowanych 5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksynukleozydów (53A-D)

3'-amidofosforyny N-blokowanych 5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksynukleozydów otrzymałam według procedury opisanej w punkcie 7.3.

A) 3'-Amidofosforyn 6-N-benzoilo-5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksyadenozyny (60) (3,7g, 85%)

$^{31}\text{P NMR}$ (CH₂Cl₂): δ (ppm) 148,97, 148,84.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 10,99 (s, 1H, H-N4); 8,76 (d, $J = 2\text{Hz}$, 1H, H8); 8,65 (d, $J = 5,6\text{Hz}$, 1H, H2); 7,59-8,13 (m, 13H, H-Ar); 6,54 (m, 1H, H1'); 4,84 (m, 1H, H4'); 4,27-4,52 (m, 5H, H5', H5'', CH, CH₂ Fmoc); 3,84 (m, 2H, CH₂ Fmoc); 3,64 (m, 1H, H3'); 3,09 (m, 2H, *i*-Pr); 2,77 (m, 2H, CH₂ Fmoc); 2,34-2,61 (m, 2H, H2', H2''); 1,18 (s, 12H, *i*-Pr).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 165,67 (CO-Ph); 154,22 (C4); 151,73 (C2); 151,50 (O-CO-O); 150,48 (C8); 143,31 (C4); 140,75; 139,39; 137,40; 133,43; 132,42; 129,15 (Ar); 128,88 (C5);

128,56; 128,47; 128,43; 127,69; 127,25; 127,12; 125,99; 124,87; 121,35; 120,15 (Ar); 118,98 (CN); 83,86 (CH₂ Fmoc); 83,04 (C1'); 82,75 (C4'); 68,88 (C5'); 58,54 (C3'); 58,36 (CH Fmoc); 42,71; 42,60 (*i*-Pr); 37,30 (C2'); 24,39; 24,33; 24,24; 24,16 (*i*-Pr); 19,80 (CH₂ cyjanoetylu).

B) 3'-Amidofosforyn 4-N-benzoilo-5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deokscytydyny (3,7g, 87%)

³¹P NMR (CH₂Cl₂): δ (ppm) 149,15, 148,98.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 11,26 (s, 1H, H-N4); 7,81-8,09 (m, 5H, H6, H-Ar); 7,28-7,64 (m, 9H, H-Ar); 6,21 (m, 1H, H1'); 4,26-4,56 (m, 7H, H5, H4', H5', H5'', CH, CH₂ Fmoc); 3,78 (m, 2H, cyjanoetylu); 3,42-3,57 (m, 3H, H3', *i*-Pr); 2,73-2,80 (m, 2H, CH₂ cyjanoetylu); 2,19-2,27 (m, 2H, H2', H2''); 1,15 (s, 12H, CH₃ *i*-Pr).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 167,49 (CO-Ph); 165,46 (C4); 163,08 (C2); 154,21 (O-CO-O); 144,83 (C6); 143,42; 143,39; 143,22; 142,55; 140,77; 140,70; 139,39; 137,40; 133,53; 133,13; 132,71; 129,19; 128,89; 128,41; 128,15; 127,42; 127,25; 127,10; 124,82 (Ar); 119,99 (CN); 96,38 (C5); 86,60 (CH₂ Fmoc); 72,86 (C4'); 68,89 (C5'); 66,91 (C3'); 58,43 (CH₂ cyjanoetylu); 46,22 (Fmoc); 44,54 (C1'); 42,72 (*i*-Pr); 24,35; 24,28; 24,22; 24,14 (*i*-Pr); 19,75 (CH₂ cyjanoetylu).

C) 3'-Amidofosforyn 2-N-izo-butyrylo-5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksyguanozyny (2,9g, 89%)

³¹P NMR (CH₂Cl₂): δ (ppm) 149,15, 148,98.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 11,65 (s, 1H, H-NCO); 8,20 (d, J = 4,8Hz, 1H, H8); 7,83-7,89 (m, 2H, H-Ar); 7,61-7,65 (m, 2H, H-Ar); 7,30-7,43 (m, 4H, H-Ar); 6,26 (t, J = 7,2Hz, 1H, H1'); 4,60 (m, 1H, H4'); 4,46-4,55 (m, 2H, CH₂ Fmoc); 4,21-4,34 (m, 3H, H5', H5'', CH Fmoc); 4,15 (m, 1H, H3'); 3,68-3,80 (m, 2H, CH₂ cyjanoetylu); 3,52-3,62 (m, 2H, CH *i*-Pr); 2,91 (m, 1H, CH *i*-Bu); 2,73-2,79 (m, 2H, CH₂ cyjanoetylu); 2,42-2,55 (m, 2H, H2', H2''); 1,23 (s, 6H, CH₃ *i*-Bu); 1,32 (s, 12H, CH₃ *i*-Pr).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 180,13 (CO *i*-Bu); 180,06 (C6); 154,79 (C2); 154,20 (O-CO-O), 148,50 (C8); 143,23; 143,20 (Ar); 140,78 (C4); 140,75 (C5); 139,39; 137,40; 137,29; 128,88; 127,70; 127,75; 127,11; 124,84; 124,18; 121,35; 120,17 (Ar); 119,99 (CN); 82,99 (CH₂ Fmoc); 82,82 (C4'); 68,88 (C5'); 66,95 (C1'); 61,16 (C3'); 58,45 (CH₂ cyjanoetylu); 46,17 (CH Fmoc); 42,66 (CH *i*-Bu i *i*-Pr); 34,73 (C2'); 24,29 (CH₃ *i*-Bu); 22,03 (CH₂ cyjanoetylu); 18,82 (CH₃ *i*-Bu).

D) 3'-Amidofosforyn 5'-O-fluorenylometyloksykarbonylotymidyny (4g, 86%)

³¹P NMR (CH₂Cl₂): δ (ppm) 149,06, 148,93.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 11,32 (m, 1H, H-N4); 7,39-7,89 (m, 9H, H6, H-Ar); 6,19 (m, 1H, H1'); 4,53-4,62 (m, 2H, CH₂ Fmoc); 4,46 (m, 1H, H4'); 4,24-4,35 (m, 3H, H5', H5'', CH Fmoc); 4,13 (m, 1H, H3'); 3,64-3,72 (m, 2H, CH₂ cyjanoetylu); 3,52-3,59 (m, 2H, CH *i*-Pr); 2,72-2,79 (m, 2H, CH₂ cyjanoetylu); 2,21-2,36 (m, 2H, H2', H2''); 1,14 (s, 12H, CH₃ *i*-Pr); 1,10 (CH₃ T).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 163,59 (C4); 154,28 (C2); 150,33 (O-CO-O); 143,22; 140,79 (Ar); 135,89 (C6); 127,73; 127,24; 124,79; 120,18 (Ar); 118,93 (CN); 109,87 (C5); 84,14 (CH₂ Fmoc); 82,41 (C1'); 82,01 (C2'); 72,89 (C5'); 68,82 (C4'); 58,41 (CH₂ cyjanoetylu); 46,25 (CH Fmoc); 42,70 (CH *i*-Pr); 37,41 (C2'); 24,33; 24,27; 24,18; 24,12 (CH₃ *i*-Pr); 22,55 (CH₂ cyjanoetylu); 12,06 (CH₃ T).

4.13. 3'-Amidofosforyn 4-N-[tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksycytydyny (57)**4.13.1. 4-N-*p*-Toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydyna (54)**

4-N-*p*-Toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydynę (**54**) (2g) otrzymałam zgodnie z procedurą opisaną w punkcie **9.1**. Wydajność reakcji 81%.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 12,23 (s, 1H, H-N4); 7,78 (d, J = 8,2Hz, 1H, H6); 7,36-7,39 (m, 4H, H-Ar); 7,30-7,34 (m, 5H, H-Ar); 7,24-7,28 (m, 4H, H-Ar); 6,89-6,92 (m, 4H, H-Ar); 6,23 (t, J = 8Hz, 1H, H1'); 5,68 (d, J = 2,4Hz, 1H, OH); 5,16 (d, J = 6,8Hz, 1H, H5); 4,14-4,17 (m, 1H, H4'); 3,96-3,98 (m, 1H, H3'); 3,76 (s, 6H, OCH₃); 3,23-3,32 (m, 2H, H5', H5''); 2,48 (m, 1H, H2'); 2,37 (s, 3H, CH₃); 2,22 (m, 1H, H2'').

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 159,51 (C4); 158,16 (C-OCH₃, DMTr); 149,51 (C2); 144,35 (Ar); 142,34 (C-CH₃, Tos); 142,08 (C6); 139,69; 136,10; 135,45; 135,08; 129,74; 129,63; 129,35; 128,30; 127,92; 127,73; 126,85; 126,04; 123,88; 113,25 (Ar); 95,67 (C5); 89,83 (C1'); 85,96 (4°C, DMTr); 82,06 (C4'); 68,78 (C3'); 62,04 (C5'); 55,01 (OCH₃); 38,61 (C2'); 20,93 (CH₃).

4.13.2. 4-N-(4,9,13-Triazatridekano-1-ylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydyna (55)

4-N-*p*-Toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydynę (**54**) (1,6g, 2,34mmol, 1ekw.) rozpuściłam w bezodnej pirydynie (15mL). Dodałam sperminę (5,8g, 23,4mmol, 10ekw.). Kolbę zamknęłam szczelnie i umieściłam w suszarce w temperaturze

80°C na noc. Substrat przereagował ilościowo. Pirydynę odparowałam, a następnie rozpuściłam w chlorku metylenu, który ekstrahowałam wodą w celu usunięcia nadmiaru sperminy. Każdorazowo tworzyła się emulsja. Roztwór wirowałam w wirówce (25 minut, 16 tys. obr./min.). Warstwę organiczną oddzieliłam i suszyłam nad bezwodnym Na₂SO₄. Rozpuszczalnik odparowałam, a surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie (najpierw CH₂Cl₂:MeOH, później MeOH:MeNH₂:H₂O, 78:2:20). Otrzymałam 1,44g (86%) czystej 4-N-(4,9,13-triazatridekano-1-ylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydyny (**55**) w postaci białej piany.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 9,51 (t, 1H, H-N4); 7,74 (d, J = 7,2Hz, H6); 6,84-7,38 (m, 13H, H-Ar); 6,35 (m, 1H, H1'); 5,39 (d, J = 7,5Hz, 1H, H5); 4,47-4,43 (m, 1H, H3'); 4,03 (m, 1H, H4'); 3,74 (s, 6H, OCH₃); 3,26-3,38 (m, 2H, H5', H5''); 3,16 (m, 1H, H2'); 2,51-2,75 (m, 12H, CH₂ sperminy); 2,13-2,21 (m, 1H, H2''); 1,44-1,75 (m, 8H, CH₂ sperminy).

4.13.3. 4-N-[Tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydyna

4-N-(4,9,13-Triazatridekano-1-ylo)-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydynam (**55**) (1,44g, 2mmol, 1ekw.) odparowałam trójrotnie z pirydyną. Następnie rozpuściłam w pirydynie (15mL) i dodałam bezwodnik kwasu trifluorooctowego (1,44mL, 10mmol, 5ekw.). Po około 10 minutach analiza TLC wskazywała całkowite przereagowanie substratu. Do mieszaniny reakcyjnej dodałam nasycony roztwór NaHCO₃ i ekstrahowałam go chlorkiem metylenu. Warstwy organiczne połączyłam i suszyłam na bezwodnym Na₂SO₄. Rozpuszczalniki odparowałam i surowy produkt poddałam dalszym etapom szlaku syntetycznego.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 9,51 (t, 1H, H-N4); 7,79 (d, J = 7,5Hz, 1H, H6); 6,77-7,41 (m, 13H, H-Ar); 6,26-6,34 (m, 1H, H1'); 5,82-5,88 (m, 1H, 3'OH); 5,35-5,42 (m, 1H, H5); 4,52 (m, 1H, H3'); 4,05 (m, 1H, H4'); 3,75 (s, 6H, OCH₃); 3,31-3,54 (m, 14H, H5', H5'', CH₂ sperminy); 2,47-2,55 (m, 1H, H2'); 2,15-2,21 (m, 1H, H2''); 1,63-1,91 (m, 8H, CH₂ sperminy).

4.13.4. 4-N-[Tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-2'-deoksycytydyna

4-N-[Tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydynam (1,44g) rozpuściłam w 10mL chlorku metylenu i dodałam 10mL kwasu dichlorooctowego. Całość mieszałam przez 30 minut. Po upływie tego czasu funkcja 5'-OH uległa pełnemu odblokowaniu. Do mieszaniny reakcyjnej dodałam porcjami nasycony

roztwór NaHCO_3 aż do odbarwienia roztworu. Następnie wodną warstwę ekstrahowałam trzema porcjami chlorku metylenu. Połączone ekstrakty suszyłam nad bezwodnym Na_2SO_4 i odparowałam pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$, 10%). Otrzymałam 980mg (97%) czystej 4-N-[tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-2'-deoksy-cytydyny w postaci piany.

4.13.5. 4-N-[Tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksycytydyna (56)

4-N-[Tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-2'-deoksy-cytydynam (980mg, 1,4mmol, 1ekw.) odparowałam z trzema porcjami pirydyny i rozpuściłam w pirydynie. Dodałam następnie chlorek fluorenylometyloksykarbonylu (400mg, 1,54mmol, 1,1ekw.). Całość umieściłam na mieszadle magnetycznym i mieszałam przez 2h. Po tym czasie na podstawie analizy TLC stwierdziłam całkowite przereagowanie substratu. Do mieszaniny reakcyjnej dodałam nasycony roztwór NaHCO_2 , który ekstrahowałam chlorkiem metylenu. Połączone ekstrakty suszyłam nad bezwodnym Na_2SO_4 . Następnie odparowałam rozpuszczalniki, a surowy produkt oczyszczałam chromatograficznie ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$, 5%). Otrzymałam 1,1g (84%) czystej 4-N-[tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksycytydyny (**56**) w postaci białej piany.

$^1\text{H NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 9,51 (t, 1H, H-N4); 9,44 (t, 1H, HNCO); 7,37-7,90 (m, 9H, H6, H-Ar); 6,21 (t, $J = 6,4\text{Hz}$, 1H, H1'); 5,75 (m, 1H, 3'OH); 5,43 (d, $J = 4,4\text{Hz}$, 1H, H5); 4,58 (d, $J = 6,4\text{Hz}$, 2H, CH_2 Fmoc); 4,12-4,35 (m, 4H, H4', H5', H5'', CH Fmoc); 3,93 (m, 1H, H3'); 3,19-3,29 (m, 12H, CH_2 sperminy); 2,13 (m, 1H, H2'); 1,97 (m, 1H, H2''); 1,73-1,82 i 1,54 (m, 8H, CH_2 sperminy).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO): δ (ppm) 163,31 (C4); 156,52; 156,16; 155,61 (CONH); 154,86 (O-CO-O Fmoc); 154,31 (C2); 143,27 (C6); 140,77; 127,74; 127,15; 124,87; 120,59; 120,20 (Ar); 117,76; 114,90 (CF_3); 94,91 (C5); 84,89 (C4'); 83,32 (C1'); 70,31 (CH_2 Fmoc); 68,82 (C3'); 67,60 (C4'); 54,89 (CH Fmoc); 46,82; 45,09; 44,61; 44,22 (CH_2 Spm); 37,24 (C2'); 36,96; 36,44; 27,75; 25,82; 25,45; 23,57 (CH_2 Spm).

4.13.6. 3'-Amidofosforyn 4-N-[tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksycytydyny (57)

3'-Amidofosforyn 4-N-[tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-deoksycytydyny (**57**) otrzymałam z 4-N-[tris(N,N',N''-trifluoroacetylo)-4,9,13-triazatridekano-1-ylo]-5'-O-fluorenylometyloksykarbonylo-2'-

deoksycytydyny (**56**) (1,1g, 1,2mmol, lekw.) według standardowej procedury opisanej w punkcie 7.3. Otrzymałam 1,13g czystego produktu (85%) w postaci białego ciała stałego.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 9,53 (t, 1H, H-N4); 9,44 (t, 1H, HNCO); 7,34-7,91 (m, 9H, H₆, H-Ar); 6,20 (t, J = 6,4Hz, 1H, H1'); 5,77 (d, 1H, H5); 5,08 (d, 2H, CH₂ Fmoc); 4,47 (m, 1H, H4'); 4,99 (m, 1H, CH Fmoc); 3,75 (m, 2H, CH₂ cyjanoetylu); 3,55-3,61 (m, 4H, H5', H5'', CH *i*-Pr); 3,93 (m, 1H, H3'); 3,14-3,33 (m, 12H, CH₂ sperminy); 2,76 (m, 2H, CH₂ cyjanoetylu); 2,06-2,27 (m, 1H, H2', H2''); 1,73-1,82 i 1,54 (m, 8H, CH₂ sperminy); 1,15 (CH₃ *i*-Pr).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 163,35 (C4); 156,88 (O-CO-O); 156,42 (C2); 155,81; 155,22; 154,77 (COC F₃); 143,24 (Ar); 142,55 (C6); 140,79; 139,82; 139,40; 137,41; 128,90; 127,26; 124,18; 121,36; 120,63; 120,00 (Ar); 117,73 (CN); 114,87; 114,46 (CF₃); 95,01 (C5); 85,27 (C1'); 85,23 (C4'); 73,45 (CH₂ Fmoc); 68,87 (C5'); 61,11 (C3'); 58,40 (CH Fmoc); 58,22 (CH *i*-Pr); 46,82; 46,23; 45,07; 42,68; 42,56 (CH₂ Spm); 36,94; 36,44 (CH₂ Spm); 28,03; 26,19; 25,82; 25,45; 24,29 (CH₂ Spm); 23,57; 23,34; 22,57; 22,04 (CH₃ *i*-Pr); 19,80 (CH₂ cyjanoetylu).

4.14. 3'-Amidofosforyn 4-N-p-toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydyny

4-N-p-Toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydynam (**54**) (1,5g, 2,15mmol) przekształciłam w amidofosforyn według procedury opisanej w punkcie 7.3. otrzymałam 1,64g (85%) czystego 3'-amidofosforynu 4-N-p-toluenosulfonylo-5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-2'-deoksycytydyny w postaci białego ciała stałego.

¹H NMR (DMSO): δ (ppm) 12,03 (s, 1H, H-N4); 7,92 (d, 1H, H6); 7,64 (m, 2H, H-Ar); 7,21-7,38 (m, 11H, H-Ar); 6,90 (m, 4H, H-Ar); 6,29 (t, J = 6,6Hz, 1H, H1'); 6,09 (d, 1H, H5); 4,56 (m, 1H, H4'); 3,98-4,11 (m, 2H, CH₂ gr. cyjanoetylowej); 3,75 (s, 6H, OCH₃); 3,39-3,63 (m, 3H, H3', H5', H5''); 3,30 (m, 2H, CH gr. *i*-Pr); 2,77 (m, 1H, H2'); 2,66 (m, 1H, H2''); 2,39 (m, 2H, CH₂ gr. cyjanoetylowej); 1,11 (s, 9H, CH₃ gr. *i*-Pr).

¹³C NMR (DMSO): δ (ppm) 160,30 (C4); 158,16 (Ar); 148,99 (C2); 144,37; 142,05; 140,00; 135,28, 135,05; 129,70; 129,24; 127,72; 127,38; 126,07 (Ar); 118,91 (CN); 113,17 (Ar); 96,27 (C5); 86,17 (DMTr); 84,50 (C4'); 84,21 (C1'); 71,45 (C3'); 62,18 (C5'); 58,15 (CH₂ cyjanoetylu); 55,02; 54,99 (CH₃ DMTr); 44,50; 42,64 (CH *i*-Pr); 38,59 (C3'); 24,34; 24,26; 22,58; 22,33 (CH₃ *i*-Pr); 18,50 (CH₂ cyjanoetylu).

4.15. Porównanie reaktywności 3'-amidofosforynu 5'-O-(4,4'-dimetokstrytylo)tymidyny i 3-amidofosforynu 1-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-1-(*o*-nitrofenylo)-1,3-propanodiolu (5)

Przygotowałam 0,1M roztwory obu amidofosforynów w acetonitrylu w fiolkach. Roztwory przez 12h suszyłam nad sitami molekularnymi 3Å. Etylotiotetrazol w dwóch porcjach (5mg) suszyłam przez 12h w eksykatorze próżniowym nad P₂O₅. Odważyłam dwie porcje (5mg każda) podłoża CPG sfunkcjonalizowanego grupami propyloaminowymi, które umieściłam w reaktorkach przepływowych. Następnie reaktorki włożyłam do fiolek, w których znajdowały się amidofosforyny 5'-O-(4,4'-dimetokstrytylo)tymidyny i 1-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-1-(*o*-nitrofenylo)-1,3-propanodiolu i dodałam etylotiotetrazol. Fiolki zamknęłam szczelnie i pozostawiłam na 30 minut w wytrząsarce. Po upływie tego czasu reaktorki wyjęłam z roztworów i umieściłam w automatycznym syntetyzerze. Podłoże poddałam procesowi utlenienia. Następnie wysypałam podłoże z reaktorka, dokładnie przemyłam acetonitrylem. Podłoże następnie umieściłam w kolbach miarowych, które wypełniłam 0,2% roztworem kwasu dichlorooctowego w chlorku metylenu. Po 15 minutach wykonałam pomiar absorbancji dla kationu trytylowego (λ 500nm). Na podstawie wartości absorbancji obliczyłam stopień załadowania podłoża,

korzystając ze wzoru: $Z = (A \times V) / (\epsilon_{DMT} \times m)$ gdzie:

Z – stopień załadowania podłoża

A – absorbancja

V – objętość roztworu

ϵ_{DMT} – molowy współczynnik ekstynkcji dla

DMT (70 000 [$\text{cm}^{-1} \times \text{M}^{-1}$])

m – masa podłoża

4.16. Synteza oligonukleotydów

Wszystkie oligonukleotydy otrzymane w pracy syntezowałam w skali 0,2 μ M według standardowego programu:

Krok cyklu	Nazwa procesu	Odczynnik	Czas
1.	Detrytlacja	3% TCA w CH ₂ Cl ₂	35''
2.	Kondensacja	FAdC/FAdT/FAdG/FAdA w CH ₃ CN	3'50''
3.	Acetylacja	Ac ₂ O, lutydyna, NMI w CH ₃ CN	30''
4.	Utlenienie	3% I ₂ , 10% H ₂ O w Py	5' 30''

Wyjątek stanowiły:

A) przyłączenie do podłoża 3-amidofosforynu 1-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)-1-(*o*-nitrofenylo)-1,3-propanodiolu (**5**).

W tym przypadku wydłużyłam czasy:

1. przyłączenia łącznika do podłoża – 6 minut,
2. acetylowania – 5'30''
3. utlenienia – 6'30''

B) próby obniżenia wydajności syntezy etapowej oligonukleotydu

Zmodyfikowałam cykl syntetyczny skracając o połowę wartości początkowej czasy:

1. podawania amidofosforynów nukleozydów na wypełnioną podłożem kolumnie – 3''
2. przebywania amidofosforynów nukleozydów na wypełnionej podłożem kolumnie – 1'55''.

Roztwory niestandardowych, otrzymanych przeze mnie amidofosforynów w acetonitrylu (0,067M) przygotowywałam dzień wcześniej przed zastosowaniem do syntezy oligonukleotydu i suszyłam nad sitami 3Å.

4.17. Odblokowanie oligonukleotydu

Grupy ochronne oligonukleotydów zakotwiczonych na podłożu łącznikiem fotolabilnym usuwałam za pomocą 32% wodnego roztworu amoniaku. Roztwór w zabezpieczonej przed dostępem światła, owiniętej szczelnie folią aluminiową fiolce umieszczałam w suszarce na 2h w temperaturze 55°C.

Grupy cyjanoetylowe z fosforanów oligonukleotydów usuwałam selektywnie za pomocą 10% roztworu trietyloaminy w pirydynie, przez noc w temperaturze pokojowej.

Grupy ochronne oligonukleotydów zakotwiczonych na „podłożu oksylabilnym” usuwałam w standardowych warunkach, tj. 32% roztworem amoniaku w 55°C, przez noc.

4.18. Odłączenie oligonukleotydu od „podłoża fotolabilnego”

W celu odłączenia od podłoża oligonukleotydów zakotwiczonych na podłożu za pomocą łącznika fotolabilnego sporządzałam zawiesinę ziaren podłoża w mieszaninie MeCN:H₂O (9:1) i umieszczałam pod lampą UV (λ 360nm) na 30 minut.

4.19. Rozszczępienie układu rybozy 5'-O-(4,4'-dimetoksytrytylo)tymidyn-3'-ylo cytydyn-5'-ylo fosforanu (47) w roztworze

Fosfodiester **47** (5mg, 5,9 μ mol) rozpuściłam w 400 μ L 0,2M roztworu NaIO₄ i zostawiłam na 30 minut. Po upływie tego czasu roztwór rozdzieliłam na 4 równe części. Do każdej z nich dodałam 200 μ L 0,3M roztworu aminy i zostawiłam na kolejne 2 godziny.

4.20. Nadjodan amonu

Przed każdym eksperymentem przygotowywałam świeży 0,1M roztwór nadjodanu amonu. Kwas nadjodowy rozpuszczałam w wodzie i zobojętniałam go 32% roztworem amoniaku.

4.21. Odłączenie oligonukleotydu od „podłoża oksylabilnego”

Pojedyncze ziarenko podłoża wydzielałam za pomocą szklanej kapilary. Obserwację tej operacji prowadziłam za pomocą odwróconego mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Diaphot. Ziarenko zawieszone w 0,1-0,2 μ L H₂O umieszczałam w probówce eppendorfa. Następnie zawiesinę wirowałam i dodawałam 0,1M roztwór NH₄IO₄ (0,25 μ L). Ponownie wirowałam i zostawiałam na 30 minut. Następnie dodawałam 0,3M roztwór L-metioniny (0,25 μ L), wirowałam i zostawiałam na 2h (roztwory przygotowywałam tuż przed wykonaniem eksperymentu).

4.23. Synteza sondy fluorescencyjnej

Na komercyjnym podłożu typu CPG zsyntezowałam oligonukleotyd o sekwencji 5'-d(C^{Ts}TC TGC AGA CGA AT)-3'. Na końcu 5' oligonukleotydu włączałam amidofosforyn *p*-toluenosulfonylo-2'-deoksycytydyny. Następnie wyjęłam podłoże w kolumnienki, umieściłam w eppendofie i dodałam 0,5mL 32% roztworu amoniaku. Po godzinie zebrałam roztwór znad podłoża wraz z uwolnionym z podłoża i częściowo odblokowanym oligonukleotydem. Podłoże przemyłam dwukrotnie 100 μ L wody i połączone roztwory odparowałam do sucha na SpeedVac-u. Następnie dodałam 100 μ L 40% wodnego roztworu 2,2'-(etylenodioksy)-bis(etyloaminy). Naczynie reakcyjne szczelnie zamknęłam i zostawiłam

w temperaturze 78°C na noc. Rano roztwór bezpośrednio nałożyłam na kolumnę NAP-25 i oddzieliłam od nadmiaru diaminy. Roztwór zbierałam w trzech frakcjach po 0,5mL począwszy od trzeciej frakcji. Mieszaninę reakcyjną oczyściłam na płycie TLC (*n*-propanol: 32% roztwór NH₃ : H₂O, 48:42:10). Czysty oligonukleotyd wyeluowałam z żelu krzemionkowego wodą. Po odparowaniu do sucha rozpuściłam oligonukleotyd w 150µL wody i ponownie przepuściłam przez NAP-25. Odparowałam wodę i rozpuściłam modyfikowany oligonukleotyd w 100µL świeżo przygotowanego buforu boranowego (pH 8,2). Następnie dodałam do niego roztwór izotiocynianu fluoresceiny (0,5mg w 20µL DMSO). Eppendorf szczelnie osłoniłam przed dostępem światła i zostawiłam na noc w temperaturze pokojowej. Oddzieliłam nadmiar barwnika na kolumnie NAP-25. Zebrane frakcje połączyłam i odparowałam. Znakowany oligonukleotyd oczyszczałam na płycie TLC (*n*-propanol: 32% roztwór NH₃ : H₂O, 48:42:10).

4.24. Synteza kombinatorycznej biblioteki oligonukleotydowej

Kombinatoryczną bibliotekę oligonukleotydową zsyntezowałam metodą dzieloną na podłożu **45**. Użyłam 15mg podłoża. Na umieszczonej w kolumnie porcji podłoża zsyntezowałam sekwencję 5'-d(AGA)-3'. Następnie podłoże wyjęłam z kolumny, zawiesiłam w 0,4mL acetonitrylu i podzieliłam na mniej więcej cztery równe części. Na każdej z nich zsyntezowałam sekwencję 5'-d(TGX)-3', gdzie X był jedną z czterech jednostek nukleotydowych inną dla każdej porcji podłoża. Ponownie zmieszałam podłoże i rozdzieliłam je na cztery porcje, na których zsyntezowałam sekwencję 5'-d(GTX)-3'. Po skończonej syntezie powtórzyłam mieszanie i rozdział. Następnie zsyntezowałam końcową sekwencję 5'-d(ATTY)-3', przy czym Y był jedną z możliwych jednostek: dA, dT, dC lub dC^{Spm}. Otrzymane oligonukleotydy poddałam procedurze odblokowania grup funkcyjnych (NH₃ aq, 55°C, noc).

4.25. Eksperyment hybrydazyjny

Po odblokowaniu podłoże przemyłam wielokrotnie wodą i zawiesiłam w 1mL H₂O. Pobrałam z tej objętości 100µL zawiesiny i odparowałam do sucha. Następnie dodałam 100µL buforu hybrydazyjnego (20mM MOPS, 0,1M NaCl, 20nM sonda fluorescencyjna). Hybrydazję prowadziłam przez godzinę w 37°C. Po tym czasie przemyłam podłoże wodą (5 x 200µL). Związaną niespecyficzną sondę odmyłam buforem elucyjnym 3 x 100µL (5% formamid, 1M NaCl). Następnie przepłukałam ziarna podłoża wielokrotnie wodą (5 x 200µL). Przed odłączeniem oligonukleotydu od podłoża i analizą MALDI usunęłam sondę

10% roztworem formamidu (5 μ L, 40°C, 15 min.). Po zebraniu roztworu znad ziarna podłoża przemyłam je 5 μ L wody.

4.26. Analiza mikroskopowa

Do analizy mikroskopowej używałam odwrócony mikroskop fluorescencyjny Nikon DIAPHOT-TMD. Do analizy modelowej biblioteki oligonukleotydu po hybrydyzacji z sondą fluorescencyjną zastosowałam filtr DM455 (400-440/470nm).

4.27. Analiza MALDI

Przygotowanie roztworu matrycy

Matrycę (2mg) rozpuszczałam w 200 μ L mieszaniny MeCN:H₂O (1:1) i dodawałam 0,1M roztwór cytrynianu diamonu (70 μ L). Mieszaninę wytrząsałam i wirowałam. Średnio co 7 dni przygotowywałam świeży roztwór matrycy.

Przygotowanie próbki do analizy

Analizy wykonywałam na prestrukturyzowanych płytkach MALDI AnchorChip, o średnicy spotu 600 i 400 μ m, metodą siedzącej kropli. Roztwór oligonukleotydu (0,5 μ L) umieszczałam na spocie, a następnie dodawałam roztwór matrycy i mieszałam za pomocą końcówki pipety. W celu zachowania jednolitych warunków krystalizacji (wilgotność powietrza) płytkę umieszczałam nad środkiem suszącym (CaO) w eksykatorze.

W przypadku bezpośredniej analizy oligonukleotydów związanych z podłożem łącznikiem fotolabilnym, pipetą pobierałam ziarenko podłoża zawieszony w roztworze wodnym, umieszczałam na spocie i pozwalałam wodzie wyschnąć. Następnie dodawałam roztwór matrycy.

Warunki akwizycji

Wszystkie widma wykonywałam w module polaryzacji ujemnej, z użyciem metody odbiciowej, za wyjątkiem eksperymentu z modelową biblioteką, gdzie wykorzystałam metodę liniową.

BIBLIOGRAFIA

1. A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, General method for rapid synthesis of multicomponent peptide mixtures. *Int. J. Peptide Protein Res.*, **1991**, 37:487.
2. S. Buchini, C. J. Leumann, Recent improvements in antigene technology, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, 7:717.
3. S. R. Nallagatla, B. Heuberger, A. Haque, C. Switzer, Combinatorial Synthesis of Thrombin-Binding Aptamers Containing iso-Guanine, *J. Comb. Chem.*, **2009**, Vol. 11 No. 3:364.
4. P. Edwards, The use of combinatorial chemistry libraries for the discovery of biologically active substances, *Drug Discovery Today*, **2009**, Vol. 14, No. 7/8:436.
5. J. S. Lazo, P. Wipf, Combinatorial Chemistry and Contemporary Pharmacology, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2000**, Vol. 293, No. 3:705.
6. M. A. Gallop, R. W. Barrett, W. J. Dower, S. P. A. Fodor, E. M. Gordon, Applications of Combinatorial Technologies to Drug Discovery. 1. Background and Peptide Combinatorial Libraries, *J. Med. Chem.*, **1994**, Vol. 37, No. 9:1233.
7. N. T. Terret, M. Gardner, D. W. Gordon, R. J. Kobylecki, J. Steele, *Tetrahedron*, **1995**, Vol. 51, No. 30:8135.
8. M. E. Diaz-Garcia, G. Pina-Luis, I. A. Rivero, Combinatorial solid-phase organic synthesis for developing materials with molecular recognition properties, *Trends in Analytical Chemistry*, **2006**, Vol. 25, No. 2:112.
9. B. J. Chisholm, D. C. Webster, The development of coatings using combinatorial/high throughput methods: a review of the current status, *J. Coat. Technol. Res.*, **2007**, Vol. 4, No. 1:1.
10. J. Klein, T. Zech, J. M. Newsam, S. A. Schunk, Application of a novel Split&Pool-principle for the fully combinatorial synthesis of functional inorganic materials, *Applied Catalysis A: General*, **2003**, 254:121.
11. C. Chen, L. A. Ahlberg Randall, R. B. Miller, A. D. Jones, M. J. Kurth, "Analogous" Organic Synthesis of Small-Compound Libraries: Validation of Combinatorial Chemistry in Small-Molecule Synthesis, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116:2661.
12. L. A. Thompson, J. A. Ellman, Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries, *Chem. Rev.*, **1996**, 96:555.
13. L. Gold, Oligonucleotides as Research, Diagnostic, and Therapeutic Agents, *J. Biol. Chem.*, **1995**, Vol. 270, No. 23:13581.
14. K. S. Lam, M. Lebl, V. Krchnak, The "One-Bead-One-Compound" Combinatorial Library Method, *Chem. Rev.* **1997**, 97:411.
15. B. H. Lloyd, R. V. Gilles, D. G. Spiller, J. Grzybowski, D. M. Tidd, D. R. Sibson, Determination of Optimal Sites of Antisense Oligonucleotide Cleavage within *TNF α* mRNA, *Nucleic Acids Res.*, **2001**, Vol. 29, No. 17:3664.
16. T. A. Riley, B. D. Brown, L. J. Arnold; COMBINATORIAL ANTISENSE LIBRARY (WO/1999/018238)
17. E. Bernal-Mendez, C. J. Leumann, Conformational Diversity Versus Nucleic Acid Triplex Stability, a Combinatorial Study, *J. Biol. Chem.*, **2001**, Vol. 276, No. 38:35320.

18. W. T. Markiewicz, A. Astriab, P. Godzina, M. Markiewicz, Synthetic oligonucleotide combinatorial libraries and their applications, *Il Farmaco*, **2000**, 55:174.
19. R. Drmanac, I. Labat, I. Brukner, R. Crkvenjakov, Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method, *Genomics*, **1989**, 4:114.
20. S. Drmanac, D. Kita, I. Labat, B. Hauser, C. Schmidt, J. D. Burczak, R. Drmanac, Accurate sequencing by hybridization for DNA diagnostics and individual genomics, *Nature Biotechnology*, **1998**, 16:54.
21. R. Drmanac, S. Drmanac, Z. Strezoska, T. Paunesku, I. Labat, M. Zeremski, J. Snoddy, W. K. Funkhouser, B. Koop, L. Hood, DNA sequence determination by hybridization: a strategy for efficient large-scale sequencing, *Science*, **1993**, Vol. 260, Issue 5114:1649
22. W. T. Markiewicz, Chemiczna Synteza Znakowanych Fragmentów Kwasów Nukleinowych i ich Zastosowania, *Wiadomości Chemiczne*, **1995**, 49, 729.
23. S. P. A. Fodor; D. Solas, Light- Directed, Spatially Adresable Parallel Chemical Synthesis, *Science*, **1991**, 767.
24. K. S. Lam, M. Renil, From Combinatorial Chemistry to Chemical Microarray, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6:353.
25. R. Frank, Spot-synthesis: an Easy Technique for the Positionally Addressable, Parallel Chemical Synthesis on a Membrane Support, *Tetrahedron*, **1992**, 48:9217.
26. a) A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, Cornucopia of Peptides by Synthesis, In Highlights of Modern Biochemistry, Proceedings of the 14th International Congress of Biochemistry, **1988**, Vol. 5:47, VSP.Utrecht.
b) A. Furka, F. Sebestyen, M. Asgedom, G. Dibo, More Peptides by Less Labour, Proceedings of the 10th International Symposium of Medicinal Chemistry, Budapest, Hungary, **1988**, 288.
Treść obu plakatów opublikowano na oficjalnej stronie <http://szerves.chem.elte.hu/furka/>
27. K. S. Lam, S. E. Salmon, E. M. Hersh, V. J. Hruby, W. M. Kazmierski, R. J. Knapp, A New Type of Synthetic Peptide Library for Identifying Ligand-Binding Activity, *Nature*, **1991**, Vol. 354, No. 7:82.
28. C. Tuerk, L. Gold, Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase, *Science*, **1990**, 24:505.
29. A. D. Ellington, J. W. Szostak, *In vitro* Selection of RNA Molecules that Bind Specific Ligands, *Nature*, **1990**, 346:818.
30. A. Bugaut, J.J. Toulme, B. Rayner, SELEX and Dynamic Combinatorial Chemistry Interplay for the Selection of Conjugated RNA Aptamers, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4(22):4082.
31. E. Erb; K. D. Janda; S. Brenner, Recursive Deconvolution of Combinatorial Libraries, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1994**, Vol. 91:11422.
32. K. D. Janda; Tagged *versus* Untagged Librraries: Methods for the Generation and Screening of Combinatorial Chemical Libraries, *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*; **1994**, Vol. 91:10779.
33. S. Brenner, R. A. Lerner, Encoded Combinatorial Chemistry, *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, **1992**, Vol. 89:5381.
34. M. C. Needels, D. G. Jones, E. H. Tate, G. L. Heinkel, L. M. Kochersperger, W. J. Dower, R. W. Barret, M. A Gallop, Generation and Screening of an Oligonucleotide-Encoded Synthetic Peptide Library, *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, , **1993**, Vol. 90:10700.
35. J. M. Kerr, C. S. Banville, N. R. Zuckerman, Encoded Combinatorial Peptide Libraries Containing Non-natural Amino Acids, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**,115:2529.
36. P. A. Sacca, A. Fontana, J. M. Montserrat, A. M. Iribarren, Synthesis of Encoded Modified Oligonucleotide Libraries, *Chemistry&Biodiversity*, **2004**, 1:595.
37. M. S. Shchepinov, R. Chalk, E. M. Southern, Trityl Tags for Encoding in Combinatorial Chemistry, *Tetrahedron*, **2000**, 56:2713

38. R. H. C. Scott, C. Barnes, U. Gerhard, A. Balasubramanian, Exploring a Chemical Encoding Strategy for Combinatorial Synthesis Using Friedel-Crafts Alkylation, *Chem. Commun.*, **1999**, 1331.
39. H. M. Geysen, C. D. Wagner, W. M. Bodnar, C. J. Markworth, G. J. Parke, F. J. Schoenen, D. S. Wagner, D. S. Kinder, Isotope or Mass Encoding of Combinatorial Libraries, *Chem. Biol.*, **1996**, Vol. 3, No. 8:679.
40. M. H. J. Ohlmeyer, R. N. Swanson, L. W. Dillard, J. C. Reader, G. Asouline, R. Kobayashi, M. Wigler, W. C. Still, Complex Synthetic Chemical Libraries Indexed with Molecular Tags, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**, 90:10922.
41. H. P. Nestler, P. A. Bartlett, W. C. Still, A General Method for Molecular Tagging of Encoded Combinatorial Chemistry Libraries, *J. Org. Chem.*, **1994**, 59:4723.
42. Z.-J. Ni, D. Maclean, C. P. Holmes, M. M. Murphy, B. Ruhland, J. W. Jacobs, E. M. Gordon, M. A. Gallop, Versatile Approach to Encoding Combinatorial Organic Syntheses Using Chemically Robust Secondary Amine Tags, *J. Med. Chem.* **1996**, 39:1601.
43. W. L. Fitch, T. A. Baer, W. Chen, F. Holden, C. P. Holmes, D. Maclean, N. Shah, E. Sullivan, M. Tang, P. Waybourn, Improved Method for Encoding and Decoding Dialkylamine-Encoded Combinatorial Libraries, *J. Comb. Chem.* **1999**, 1:188.
44. J. E. Hochlowski, D. N. Whittern, T. J. Sowin, Encoding of Combinatorial Chemistry Libraries by Fluorine-19 NMR, *J. Comb. Chem.*, **1999**, 1:291.
45. S. S. Rahman, D. J. Busby, D. C. Lee, Infrared and Raman Spectra of a Single Resin Bead for Analysis of Solid-Phase Reactions and Use in Encoding Combinatorial Libraries, *J. Org. Chem.*, **1998**, 63:6196.
46. R. H. Scott, S. Balasubramanian, Properties of Fluorophores on Solid Phase Resins: Implications for Screening, Encoding and Reactions Monitoring, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1997**, Vol. 7, No. 12:1567.
47. B. J. Egner, S. Rana, H. Smith, N. Bouloc, J. G. Frey, W. S. Bocklesby, M. Bradley, Tagging in Combinatorial Chemistry: the Use of Coloured and Fluorescent Beads, *Chem. Commun.*, **1997**, 735.
48. E. J. Moran, S. Sarshar, J. F. Cargill, M. M. Shahbaz, A. Lio, A. M. M. Mjalli, R. W. Armstrong, Radio Frequency Tag Encoded Combinatorial Library Method for the Discovery of Tripeptide-Substituted Cinnamic Acid Inhibitors of the Protein Tyrosine Phosphatase PTP1B, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117:10787.
49. X.-Y. Xiao, Z. Parandoosh, M. P. Nova, Design and Synthesis of a Taxoid Library Using Radiofrequency Encoded Combinatorial Chemistry, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62:6029.
50. C. Barnes, S. Balasubramanian, Recent Developments in the Encoding and Deconvolution of Combinatorial Libraries, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2000**, 4:346.
51. R. L. Affleck, Solutions for library encoding to create collections of discrete compounds, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2001**, 5:257.
52. J. R. Epstein, J. A. Ferguson, K.-H. Lee, D. R. Walt, Combinatorial Decoding: An Approach for Universal DNA Array Fabrication, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125:13753.
53. B. J. Battersby, G. A. Lawrie, M. Trau, Optical Encoding of Microbeads for Gene Screening: Alternatives to Microarrays, *Drug Discovery Today*, **2001**, Vol. 6, No. 12:S19.
54. R. Liu, K. S. Lam, Automatic Edman Microsequencing of Peptides Containig Multiple Unnatural Amino Acids, *Anal. Biochem.*, **2001**, 295:9.
55. B. Yan, G. Kumaravel, H. Anjaria, A. Wu, R. C. Petter, C. F. Jewell Jr., J. R. Wareing, Infrared Spectrum of a Single Resin Bead for Real-Time Monitoring of Solid-Phase Reactions, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60:5736.
56. B. Yan, G. Kumaravel, Probing Solid-Phase Reactions by Monitoring the IR Bands of Compounds on a Single "Flattened" Resin Bead, *Tetrahedron*, **1996**, Vol. 52, No. 3:843.

57. B. Yan, J. B. Fell, G. Kumaravel, Progression of Organic Reactions on Resin Support Monitored by Single Bead FTIR Microspectroscopy, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61:7467.
58. S. K. Sarkar, R. S. Garigipati, J. L. Adams, P. A. Keifer, An NMR Method to Identify Nondestructively Chemical Compounds Bound to a Single Solid-Phase-Synthesis Bead for Combinatorial Chemistry Applications, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118:2305.
59. R. H. Griffey, H. An, L. L. Cummins, H. J. Gaus, B. Haly, R. Herrmann, P. D. Cook, Rapid Deconvolution of Combinatorial Libraries Using HPLC Fractionation, *Tetrahedron*, 1998, 54:4067.
60. C. L. Brummel, J. C. Vickerman, S. A. Carr, M. E. Hemling, G. D. Roberts, W. Johnson, J. Wienstock, D. Gaitanopoulos, S. J. Benkovic, N. Winograd, Evaluation of Mass Spectrometric Methods Applicable to the Direct Analysis of Non-Peptide Bead-Bound Combinatorial Libraries, *Anal. Chem.*, **1996**, 68:237.
61. S. Kaur, L. McGuire, D. Tang, G. Dollinger, V. Heubner, Affinity Selection and Mass Spectrometry-Based Strategies to Identify Lead Compounds in Combinatorial Libraries, *J. Protein Chem.*, **1997**, Vol. 16, No. 5:505.
62. C. Hinderling, P. Chen, Mass Spectrometric Assay of Polymerization Catalysts for Combinatorial Screening, *Int. J. Mass Spectrom.*, **2000**, 195/196:377.
63. D. A. Annis, J. Athanasopoulos, P. J. Curran, J. S. Felsh, K. Kalghatgi, W. H. Lee, H. M. Nash, J.-P. A. Orminati, K. E. Rosner, G. W. Shipps Jr., G. R. A. Thaddupathy, A. N. Tyler, L. Vilenchik, C. R. Wagner, E. A. Wintner, An Affinity Selection-Mass Spectrometry Method for the Identification of Small Molecule Ligands from Self-Encoded Combinatorial Libraries. Discovery of a Novel Antagonist of *E. coli* Dihydrofolate Reductase, *Int. J. Mass Spectrom.*, **2004**, 238:77.
64. S.-A. Poulsen, Direct Screening of a Dynamic Combinatorial Library Using Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2006**, 17:1074.
65. S. Stevanovic, K.-H. Wiesmüller, J. Metzger, A. G. Beck-Sickinger, G. Jung, Natural and Synthetic Peptide Pools: Characterization by Sequencing and Electrospray Mass Spectrometry, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1993**, 3:431.
66. J. W. Metzger, K.-H. Wiesmüller, V. Gnau, J. Brünjes, G. Jung, Ion-Spray Mass Spectrometry and High-Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry of Synthetic Peptide Libraries, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1993**, 32:894.
67. J. W. Metzger, C. Kempter, K.-H. Wiesmüller, G. Jung, Electrospray Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry of Multi-Component Peptide Mixtures: Determination of Composition and Purity, *Anal. Biochem.*, **1994**, 219:261.
68. B. Spengler, De Novo Sequencing, Peptide Composition Analysis, and Composition-Based Sequencing: A New Strategy Employing Accurate Mass Determination by Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2004**, 15:703.
69. Y.-H. Chu, Y. M. Dunayevskiy, D. P. Kirby, P. Vouros, B. L. Karger, Affinity Capillary Electrophoresis- Mass Spectrometry for Screening Combinatorial Libraries, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118:7827.
70. J. E. Meckendrick, S. Frommann, C. Luo, P. Semchuk, J. C. Vederas, B. A. Malcolm, Rapid Mass Spectrometric Determination of Preferred Irreversible Proteinase Inhibitors in Combinatorial Libraries, *Int. J. Mass Spectrom.*, 1998, 176:113.
71. P. Wang, H. Fu, D. F. Snavley, M. A. Freitas, D. Pei, Screening Combinatorial Libraries by Mass Spectrometry. 2. Identification of Optimal Substrates of Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1, *Biochemistry*, **2002**, 41:6202.
72. M. Wigger, J. R. Eyler, S. A. Benner, W. Li, A. G. Marshall, Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometric Resolution, Identification, and Screening of Non-Covalent Complexes of Hck Src Homology 2 Domain Receptor and Ligands from a 324-Member Peptide Combinatorial Library, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2002**, 13:1162.

73. R. S. Youngquist, G. R. Fuentes, M. P. Lacey, T. Keough, Generation and Screening of Combinatorial Libraries Designed for Rapid Sequencing by Mass Spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117:3900.
74. C. Hoffman, D. Blechschmidt, R. Kruger, M. Karas, C. Griesinger, Mass Spectrometric Sequencing of Individual Peptides from Combinatorial Libraries via Specific Generation of Chain-Terminated Sequences, *J. Comb. Chem.*, **2002**, 4:79.
75. P. M. St. Hilaire, T. L. Lowary, M. Meldal, K. Bock, Oligosaccharide Mimetics Obtained by Novel, Rapid Screening of Carboxylic Acid Encoded Glycopeptide Libraries, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120:13312.
76. M. Davies, M. Bradley, Inverted Peptides-Single Bead Analysis by Methionine Scanning and Mass Spectrometry, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, Vol. 38, No. 49:8565.
77. P. E. Dawson, M. C. Fitzgerald, T. W. Muir, S. B. H. Kent, Methods for the Chemical Synthesis and Readout of Self-Encoded Arrays of Polypeptide Analogues, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119:1917.
78. K. Burgess, C. I. Martinez, D. H. Russell, H. Shin, A. J. Zhang, Photolytic Mass Laddering for Fast Characterization of Oligomers on Single Resin Beads, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62:5662.
79. L. Grotjahn, R. Frank, H. Blöcker, Ultrafast Sequencing of Oligodeoxyribonucleotides by FAB-Mass Spectrometry, *Nucleic Acids Res.*, **1982**, Vol. 10, No. 15:4671.
80. P. Roepstorff, J. Fohlmann, Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides, *Biomed. Mass Spectrom.*, **1984**, 11:601.
81. S. A. McLuckey, G. J. Van Berkel G. L. Glish, Tandem Mass Spectrometry of Small, Multiply Charged Oligonucleotides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1992**, 3:60.
82. S. A. McLuckey, S. Habibi-Goudarzi, Decomposition of Multiply Charged Oligonucleotide Anions, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1993**, 115:12085.
83. D. P. Little, R. A. Chorush, J. P. Speir, M. W. Senko, N. L. Kelleher, F. W. McLafferty, Rapid Sequencing of Oligonucleotides by High-Resolution Mass Spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116:4893.
84. K. A. Sannes-Lowery, S. A. Hofstadler, Sequence Confirmation of Modified Oligonucleotides Using IRMPD in the External Ion Reservoir of an Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2003**, 14:825.
85. K. M. Keller, J. S. Brodbelt, Collisionally Activated Dissociation and Infrared Multiphoton Dissociation in a Quadrupole Ion Trap, *Anal. Biochem.*, **2004**, 326:200.
86. J. Ni, S. C. Pomerantz, J. Rozenski, Y. Zhang, J. A. McCloskey, Interpretation of Oligonucleotide Mass Spectra for Determination of Sequence Using Electrospray Ionization and Tandem Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **1996**, 68:1989.
87. S. C. Pomerantz, J. A. McCloskey, T. M. Tarasow, B. E. Eaton, Deconvolution of Combinatorial Oligonucleotide Libraries by Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119:3861.
88. U. Pieses, W. Zurcher, M. Schar, H. E. Mosner, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Powerful Tool for the Mass and Sequence Analysis of Natural and Modified Oligonucleotides, *Nucleic Acids Res.*, **1993**, Vol. 21, No. 14:3191.
89. K. Faulstich, K. Worner, H. Brill, J. W. Engels, A Sequencing Method for RNA Oligonucleotides Based on Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **1997**, 69:4349.
90. H. Wu, H. Aboleneen, Sequencing of Oligonucleotides with Blocked Termini Using Exonuclease Digestion and Electrospray Spectrometry, *Anal. Biochem.*, **2000**, 287:126.
91. S. Hahner, H.-C. Ludemann, F. Kirpekar, E. Nordhoff, P. Roepstorff, H.-J. Galla, F. Hillenkamp, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI) of Endonuclease Digests of RNA, *Nucleic Acids Res.*, **1997**, Vol. 25, No. 10:1957.

92. M. T. Roskey, P. Juchasz, I. P. Smirnov, E. J. Takach, S. A. Martin, L. A. Haff, DNA Sequencing by Delayed Extraction- Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1996**, Vol. 93:4724.
93. F. Kirpekar, E. Nordhoff, L. K. Larsen, K. Kristiansen, P. Roepstorff, F. Hillenkamp, DNA Sequence Analysis by MALDI Mass Spectrometry, *Nucleic Acids Res.*, **1998**, Vol. 26, No. 11:2554.
94. E. Nordhoff, C. Leubbert, G. Thiele, V. Heiser, H. Lehrach, Rapid Determination of Short DNA Sequences by the Use of MALDI-MS, *Nucleic Acids Res.*, **2000**, Vol. 28, No. 20:e86.
95. J. R. Edwards, Y. Itagaki, J. Ju, DNA Sequencing Using Biotynylated Dideoxynucleotides and Mass Spectrometry, *Nucleic Acids Res.*, **2001**, Vol. 29, No. 21:e104.
96. B. H. Wang, C. E. Hopkins, A. E. Belenky, A. S. Cohen, Sequencing of Modified Oligonucleotides Using in-Source Fragmentation and Delayed Ion Extraction Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom Ion Processes*, **1997**, 169/170:331.
97. J. Krause M. Scalf, L. M. Smith, High Resolution Characterization of DNA Fragment Ions Produced by Ultraviolet Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Using Linear and Reflecting Time-of-Flight Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1999**, 10:423.
98. C.-W. Chou, P. A. Limbach, R. B. Cole, Fragmentation Pathway Studies of Oligonucleotides in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry by Charge Tagging and H/D Exchange, *J Am Soc Mass Spectrom.*, **2002**, 13:1407.
99. L. Zhu, G. R. Parr, M. C. Fitzgerald, C. M. Nelson, L. M. Smith, Oligodeoxynucleotide Fragmentation in MALDI-TOF Mass Spectrometry Using 355-nm Radiation, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117:6048.
100. J. Gross, F. Hillenkamp, K. X. Wan, M. L. Gross, Metastable Decay of Negatively Charged Oligodeoxynucleotides Analyzed with Ultraviolet Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Post-Source Decay and Deuterium Exchange, *J Am Soc Mass Spectrom.*, **2001**, 12:180.
101. T.-W. D. Chan, Y. M. E. Fung, Y. C. L. Li, A Study of Fast and Metastable Dissociations of Adenine-Thymine Binary-Base Oligonucleotides by Using Positive-Ion MALDI-TOF Mass Spectrometry, *J Am Soc Mass Spectrom.*, **2002**, 13:1052.
102. J. M. Koomen, B. T. Ruotolo, K. J. Gillig, J. A. McLean, D. H. Russell, M. Kang, K. R. Dunbar, K. Fuhrer, M. Gonin, J. A. Schultz, Oligonucleotide Analysis with MALDI-Ion-Mobility-TOFMS, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, 373:612.
103. P. Juhasz, M. T. Roskey, I. P. Smirnov, L. A. Haff, M. L. Vestal, S. A. Martin, Applications of Delayed Extraction Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry to Oligonucleotide Analysis, *Anal. Chem.*, **1996**, 68:941.
104. D. Alazard, M. Filipowsky, J. Raeside, M. Clarke, M. Majlessi, J. Russell, W. Weisburg, Sequencing of Production-Scale Synthetic Oligonucleotides by Enriching for Coupling Failures Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Anal. Biochem.*, **2002**, 301:57.
105. T. Keough, J. D. Schaffer, M. P. Lacey, T. A. Riley, W. B. Marvin, J. A. Hasselfield, E. P. Hesselberth, Detailed Characterization of Antisense DNA Oligonucleotides, *Anal. Chem.*, **1996**, 68:3405.
106. Z. Cui, J. A. Theruvathu, A. Farrel, A. Burdzy, L. C. Sowers, Characterization of Synthetic Oligonucleotides Containing Modified Bases by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **2008**, 379:196.
107. A. Meyer, N. Spinelli, J.-L. Imbach, J.-J. Vasseur, Analysis of Solid-Supported Oligonucleotides by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2000**, 14:234.

108. T. Guerlavais, A. Meyer, F. Debart, J.-L. Imbach, F. Morvan, J.-J. Vasseur, Use of MALDI-TOF Mass Spectrometry to Monitor Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotides, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, 374:57.
109. M. C. Fitzgerald, K. Harris, C. G. Shevlin, G. Siuzdak, Direct Characterization of Solid Phase Resin-Bound Molecules by Mass Spectrometry, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1996**, Vol. 6, No. 8:979.
110. P. G. Conrad II, R. S. Givens, B. Hellrung, C. S. Rajesh, M. Ramseier, J. Wirz, p-Hydroxyphenacyl Phototriggers: The Reactive Excited State of Phosphate Photorelease, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122:9346.
111. M. R. Carrasco, M. C. Fitzgerald, Y. Oda, S. B. H. Kent, Direct Monitoring of Organic Reactions on Polymeric Supports, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, Vol. 38, No. 36:6331.
112. A. Patchornik, B. Amit and R. B. Woodward, Photosensitive Protecting Groups, *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92:6333.
113. S. C. McKeown, S. P. Watson, R. A. E. Carr, P. Marshall, A Photoalibile Carbamate Based Dual Linker Analytical Construct for Facile Monitoring of Solid Phase Chemistry: 'TLC' for Solid Phase?, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40:2407.
114. C. Dell'Aquila, J.-L. Imbach, B. Rayner, Photolabile Linker for the Solid Phase Synthesis of Base-Sensitive Oligonucleotides, *Tetrahedron Lett.*, 1997, Vol. 38, No. 30:5289.
115. A. Meyer, N. Spinelli, J.-C. Bres, C. Dell'Aquila, F. Morvan, I. Lefebvre, B. Rayner, J.-L. Imbach, J.-J. Vasseur, Direct MALDI-TOF MS Analysis of Oligonucleotides on Solid Support through a Photolabile Linker, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, **2001**, 20(4-7):963.
116. M. M. Greenberg, Photochemical Release of Protected Oligonucleotides Containing 3'-Glycolate Termini, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, Vol. 51, No. 1:29.
117. D. J. Yoo, M. M. Greenberg, Synthesis of Oligonucleotides Containing 3'-Alkyl Carboxylic Acids Using Universal, Photolabile Solid Phase Synthesis Supports, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60:3358.
118. H. Venkatesan, M. M. Greenberg, Improved Utility of Photolabile Solid Phase Synthesis Supports for the Synthesis of Oligonucleotides Containing 3'-Hydroxyl Termini, *J. Org. Chem.*, **1996**, 61:525.
119. D. L. McMinn, M. M. Greenberg, Novel Solid Phase Synthesis for the Preparation of Oligonucleotides Containing 3'-Alkyl Amines, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, Vol. 52, No. 11:3827.
120. S. J. Teague, Facile Synthesis of a *o*-Nitrobenzyl Photolabile Linker for Combinatorial Chemistry, *Tetrahedron Lett.*, **1996**, Vol. 37, No. 32:5751.
121. A. M. Piggot, P. Karuso, Synthesis of a New Hydrophilic *o*-Nitrobenzyl Photocleavable Linker for Use in Chemical Proteomics, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46:8241.
122. M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, The Influence of The Wavelength in High Irradiance Ultraviolet Laser Desorption of Organic Molecules, *Anal. Chem.*, **1985**, 57:2935.
123. M. Karas, D. Bachmann, F. Hillenkamp, Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, **1987**, 78:53.
124. M. Karas, F. Hillenkamp, Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10,000 Daltons, *Anal. Chem.*, **1988**, 60:2299.
125. H. Ehring, M. Karas, F. Hillenkamp, Role of Photoionization and Photochemistry in Ionization Processes of Organic-Molecules and Relevance for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass-Spectrometry, *Org. Mass Spectrom.*, **1992**, 27:472.
126. R. Zenobi, R. Knochenmuss, Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.*, **1998**, 17:337.

127. J. Krause, M. Stoeckli, U. P. Schlunegger, Studies on the Selection of New Matrices for Ultraviolet Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10:1927.
128. A. Harrison, The Gas-Phase Basicities and Proton Affinities of Amino Acids and Peptides, *Mass Spectrom. Rev.*, **1997**, 16:201.
129. K. Dreisewerd, M. Schurenberg, M. Karas, F. Hillenkamp, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization with Nitrogen Lasers of Different Pulse Widths, *J. Int. Mass Spectrom. Ion Process.*, **1996**, 154:171.
130. Y. Kong, Y. Zhu, J. Y. Zhang, Ionization Mechanism of Oligonucleotides in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, 15:57.
131. Y. L. Liu, X. Y. Sun, B. C. Guo, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Analysis of Low-Concentration Oligonucleotides and Mini-Sequencing Products, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2003**, 17:2354.
132. R. Kruger, A. Pfenninger, I. Fournier, M. Gluckmann, M. Karas, Analyte Incorporation and Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Visualized by pH Indicator Molecular Probes, *Anal. Chem.*, **2001**, 73:5812.
133. M. Karas, M. Gluckmann, J. Schaffer, Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization: Singly Charged Molecular Ions are the Lucky Survivors, *J. Mass Spectrom.*, **2000**, 35:1.
134. M. Karas, M. Kruger, Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism, *Chem. Rev.*, **2003**, 103:427.
135. W. C. Chang, L. C. L. Huang, Y.-S. Wang, W.-P. Peng, H. C. Chang, N. Y. Hsu, W. B. Yang, C. H. Chen, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Mechanism Revisited, *Anal. Chem. Acta*, **2007**, 582:1.
136. F. Hillenkamp, M. Karas, R. Beavis, B. T. Chait, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers, *Anal. Chem.*, **1991**, 63:1193A.
137. M. Karas, U. Bahr, Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Large Biomolecules, *Trends Anal. Chem.*, **1990**, 9:321.
138. M. L. Easterling, T. H. Mize, I. J. Amster, MALDI FTMS analysis of polymers: improved performance using an open ended cylindrical analyzer cell, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, (Special Issue), **1997**, 169/170:387.
139. A. Castoro, C. Koster, C. L. Wilkens, Investigation of a "Screened" Electrostatic Ion Trap for Analysis of High Mass Molecules by Fourier Transform Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, **1993**, 65:784.
140. Y. Li, K. Tang, P. D. Little, H. Koster, R. L. Hunter, R. T. McIver, High-Resolution MALDI Fourier Transform Mass Spectrometry of Oligonucleotides, *Anal. Chem.*, **1996**, 68:2090.
141. B. A. Mamyryn, Time-of-Flight Mass Spectrometry (Concepts, Achievements, and Prospects), *Int. J. Mass Spectrom.*, **2001**, 206:251.
142. G. Siuzdak, An Introduction to Mass Spectrometry Ionization: An Excerpt from *The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology*, 2nd ed.: MCC Press: San Diego, **2005**.
143. R. S. Brown, J. J. Lennon, Mass Resolution Improvement by Incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Linear Time of Flight Mass Spectrometer, *Anal. Chem.*, **1995**, 67:1998.
144. R.M. Whittal, L. Li, High-Resolution Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization in a Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer, *Anal. Chem.* **1995**, 67:1950.
145. N.-Y. Hsu, W.-B. Yang, C.-H. Wong, Y.-C. Lee, R. T. Lee, Y.-S. Wang, C.-H. Chen, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Polysaccharides

- with 2,4,6-Trihydroxyacetophenone as Matrix, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2007**, 21:2137.
146. E. Nordhoff, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry as a New Method for the Characterization of Nucleic Acids, *Trends Anal. Chem.*, **1996**, Vol.15, No. 6:240.
 147. J. Gross, K. Strupat, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Mass Spectrometry Applied to Biological Macromolecules, *Trends Anal. Chem.*, **1998**, Vol 17, No. 8 + 9:470.
 148. P. A. Limbach, P. F. Crain, J. A. McCloskey, Characterization of Oligonucleotides and Nucleic Acids by Mass Spectrometry, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **1995**, 6:96.
 149. L.-K. Zhang, M.-L. Gross, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Methods for Oligodeoxynucleotides: Improvements in Matrix, Detection Limits, Quantification, and Sequencing, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2000**, 11:854.
 150. A. Marie, F. Fournier, J. C. Tabet, Characterization of Synthetic Polymers by MALDI-TOF/MS: Investigation into New Methods of Sample Target Preparation and Consequence on Mass Spectrum Finger Print, *Anal. Chem.*, **2000**, 72:5106.
 151. B. Hilker, K. J. Clifforda, A. D. Sauter Jr., A. D. Sauter, T. Gauthiera, J. P. Harmon, Electric Field Enhanced Sample Preparation for Synthetic Polymer MALDI-TOF Mass Spectrometry via Induction Based Fluidics (IBF), *Polymer*, **2009**, Vol. 50, No. 4:1015.
 152. B. Spottke, J. Gross, H.-J. Galla, F. Hillenkamp, Reverse Sanger Sequencing of RNA by MALDI-TOF Mass Spectrometry After Solid Phase Purification, *Nucleic Acids Res.*, **2004**, Vol. 32, No. 12:e97.
 153. J. R. Edwards, H. Ruparel, J. Ju, Mass-Spectrometry DNA Sequencing, *Mutation Res.*, **2005**, 573:3.
 154. F. Kirpekar, E. Nordhoff, L. K. Larsen, K. Kristiansen, P. Roepstorff, F. Hillenkamp, DNA Sequence analysis by MALDI Mass Spectrometry, *Nucleic Acids Res.*, **1998**, Vol. 26, No. 11:2554.
 155. R. Hartmer, N. Storm, S. Boecker, C. P. Rodi, F. Hillenkamp, C. Jurinke, D. van den Boom, RNase T1 Mediated Base-Specific Cleavage and MALDI-TOF MS for High-Throughput Comparative Sequence Analysis, *Nucleic Acids Res.*, **2003**, Vol. 31, No. 9:e47.
 156. J. H. Graber, C. L. Smith, C. R. Cantor, Differential sequencing with mass spectrometry, : *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, **1999**, 14:215.
 157. P. Stanssens, M. Zabeau, G. Meersseman, G. Remes, Y. Gansemans, N. Storm, R. Hartmer, C. Honisch, C. P. Rodi, S. Böcker, D. van den Boom, High-Throughput MALDI-TOF Discovery of Genomic Sequence Polymorphisms, *Genome Res.* **2004**, 14:126.
 158. C. A. Eads, K. D. Danenberg, K. Kawakami, L. B. Saltz, C. Blake, D. Shibata, P. V. Danenberg, P. W. Laird, MethyLight: A High-Throughput Assay to Measure DNA Methylation, *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28:e32.
 159. E. Nordhoff, F. Kirpekar, M. Karas, R. Cramer, S. Hahner, F. Hillenkamp, K. Kristiansen, P. Roepstorff, Comparison of IR- and UV-Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Oligodeoxynucleotides, *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22:2460.
 160. K. J. Wu, T. A. Shaler, C. H. Becker, Time-of-Flight Mass Spectrometry Of Underivatized Single-Stranded DNA Oligomers by Matrix-Assisted Laser Desorption, *Anal. Chem.*, **1994**, 66:1637.
 161. E. Nordhoff, A. Ingendoh, R. Cramer, A. Overberg, B. Stahl, M. Karas, F. Hillenkamp, P. F. Crain, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Nucleic Acids with Wavelengths in the Ultraviolet and Infrared, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1992**, 6:771.

162. B. H. Wang, K. Biemann, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of Chemically Modified Oligonucleotides, *Anal. Chem.*, **1994**, 66:1918.
163. K. J. Wu, A. Stebbing, C. H. Becker, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry of Oligonucleotides Using 3-Hydroxypicolinic Acid as an Ultraviolet-Sensitive Matrix, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1993**, 7:124.
164. Y. H. Liu, J. Bai, D. M. Lubman, P. J. Venta, Use of a Nitrocellulose Film Substrate in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry for DNA Mapping and Screening, *Anal. Chem.*, **1995**, 67:3482.
165. N. I. Taranenko, K. Tang, S. L. Allman, L. Y. Chang, C. H. Chen, 3-Aminopicolinic Acid as Matrix for Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1994**, 8:1001.
166. Y. F. Zhu, C. N. Chung, N. I. Taranenko, S. L. Allman, S. A. Martin, L. Haff, The Study of 2,3,4-Trihydroxyacetophenone and 2,4,6-Trihydroxyacetophenone as Matrices for DNA Detection in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10:383.
167. P. Lecchi, H. M. T. Le, M. K. Pannell, 6-aza-2-thiothymine: a Matrix for MALDI Spectra of Oligonucleotides, *Nucleic Acids Res.*, **1995**, 23:1276.
168. P. A. Limbach, P. F. Crain, J. A. McCloskey, Molecular Mass Measurement of Intact Ribonucleic Acids via Electrospray Ionization Quadrupole Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1995**, 6:27.
169. T. A. Simmons, P. A. Limbach, Influence of Co-matrix Proton Affinity on Oligonucleotide Ion Stability in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1998**, 9:668.
170. J. M. Asara, J. Allison, Enhanced Detection of Oligonucleotides in UV MALDI MS Using Tetramine Spermine as a Matrix Additive, *Anal. Chem.*, **1999**, 71:2866.
171. A. M. Distler, J. Allison, 5-Metoxysalicylic Acid and Spermine: A New Matrix for the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Analysis of Oligonucleotides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2001**, 12:456.
172. M. Shahgholi, B. A. Garcia, N. H. L. Chiu, P. J. Heaney, K. Tang, Sugar Additives for MALDI Matrices Improve Signal Allowing the Smallest Nucleotide Change (A:T) in a DNA Sequence to be Resolved, *Nucleic Acids Res.*, **2001**, Vol. 29, No. 19:e91.
173. Y. Kim, G. B. Hurst, Study of Matrix and Polymer Substrate in MALDI-TOF Mass Spectrometry of DNA, *Microchemical J.*, **2001**, 70:219.
174. E. T. P. Sze, T.-W. Chan, G. Wang, Formulation of Matrix Solutions for Use In Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization of Biomolecules, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1998**, 9:166.
175. E. Nordhoff, M. Karas, R. Cramer, S. Hahner, F. Hillenkamp, F. Kirpekar, A. Lezius, J. Muth, C. Meier, J. W. Engels, Direct Mass Spectrometric Sequencing of Low-Picomole Amounts of Oligodeoxynucleotides with Up to 21 Bases by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, **1995**, 30:99.
176. X. Tang, W. Ens, K. G. Standing, J. B. Westmore, Product Ion Mass Spectra from Cationized Molecules of Small Oligopeptides in a Reflecting Time-of-Flight Mass Spectrometer, *Anal. Chem.*, **1988**, 60:1791.
177. R. Kaufmann, B. Spengler, F. Lutzenkirchen, Mass Spectrometric Sequencing of Linear Peptides by Product-Ion Analysis in a Reflectron Time-of-Flight Mass Spectrometer Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1993**, 7:902.
178. B. Spengler, D. Kirsh, R. Kaufmann, E. Jaeger, Peptide Sequencing by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1992**, 6:105.

179. W. Tang, J. Krause, L. Zhu, L. M. Smith, Factors Influencing Oligonucleotide Stability in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) Mass Spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, **1997**, 169/170:301.
180. K. Schneider, C. T. Chait, Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry of Homopolymer Oligodeoxyribonucleotides. Influence of Base Composition on the Mass Spectrometric Response, *Org. Mass Spectrom.*, **1993**, 28:1353.
181. D. Kirsch, B. Spengler, R. Kaufmann, Ion Stability of Deoxyoligonucleotides and its Implication for PSD-MALDI MS, Proc. 42nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, Illinois, 1994, p. 821.
182. L. J. Deterding, K. B. Tomer, MALDI Post Source Decay of Oligonucleotides, Proc. 43rd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Atlanta, Georgia, 1995, p. 943.
183. E. Nordhoff, M. Schurenberg, G. Thiele, C. Lubbert, K.-D. Kloeppel, D. Theiss, H. Lehrach, J. Gobom, Sample Preparation Protocols for MALDI-MS of Peptides and Oligonucleotides Using Prestructured Sample Supports, *Int. J. Mass Spectrom.*, **2003**, 226:163.
184. S. Sauer, The Essence of DNA Sample Preparation for MALDI Mass Spectrometry, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2007**, 70:311.
185. F. C. Moates, M. Somani, J. Annamalai, J. T. Richardson, D. Luss, and R. C. Willson, Infrared Thermographic Screening of Combinatorial Libraries of Heterogeneous Catalysts, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1996**, 35:4801.
186. E. Kierzek, R. Kierzek, W. Moss, S. Christensen, T. Eickbush; D.H. Turner, Isoenergetic Penta- and Hexanucleotide Microarray Probing and Chemical Mapping Provide a Secondary Structure Model for an RNA Element Orchestrating R2 Retrotransposon Protein Function, *Nucleic Acids Res.*, **2008**, 36:1770.
187. R. Frank, W. Heikens, G. Heisterberg-Moutsis, H. Blocker, A New General Approach for the Simultaneous Chemical Synthesis of Large Numbers of Oligonucleotides: Segmental Solid Supports. *Nucleic Acids Res.*, **1983**, 11:4365.
188. R. Frank, Simultaneous and Combinatorial Chemical Synthesis Techniques for the Generation and Screening of Molecular Diversity, *J. Biotechnol.*, **1995**, 41:259.
189. M. T. Roskey, P. Juhasz, I. P. Smirnov, E. J. Takach, S. A. Martin, L. A. Haff, DNA Sequencing by Delayed Extraction – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1996**, 93:4724.
190. R. L. Wurdeman, K. M. Church, B. Gold, DNA Methylation by N-Methyl-N-nitrosourea, N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, N-Nitroso(1-acetoxyethyl)methylamine, and Diazomethane. The Mechanism for the Formation of N7-Methylguanine in Sequence-Characterized 5'-[32P]-End-Labeled DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111:6408.
191. E. Cerda-Olmedo, P. C. Hanawalt, Diazomethane as the Active Agent in Nitrosoguanidine Mutagenesis and Lethality, *Molec. Gen. Genetics*, **1968**, 101:191.
192. O. Friedman, G. Mahapatra, R. Stevenson, The Methylation of Deoxyribonucleosides by Diazomethane, *Biochim Biophys Acta*. **1963**, 68:144.
193. S. P. Mirza, N. P. Raju, N. Vairamani, Estimation of the Proton Affinity Values of Fifteen Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Matrices under Electrospray Ionization Conditions Using the Kinetic Method, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2004**, 15:431.
194. K. Breuker, R. Knochenmuss, R. Zenobi, Gas-Phase Basicities of Deprotonated Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Matrix Molecules, *Int. J. Mass Spectrom.*, **1999**, 184:25.
195. A. Routledge, C. Abell, S. Balasubramanian, The Use of a Dithiane Protected Benzoin Photolabile Safety Catch Linker for Solid-Phase Synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **1997**, Vol. 38, No. 7:1227.

196. D. Enders, C. Rijksen, E. Bremus-Kobberling, A. Gillner, J. Kobberling, A Triazene-Based New Photolabile Linker in Solid Phase Chemistry, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45:2839.
197. G. Bhalay, A. R. Dunstan, Facile Solid Phase Synthesis of an Activated Diazo Linker, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39:7803.
198. L.-H. Du, S.-J. Zhang, Y.-G. Wang, Phenacyl Esters as a New Photocleavable Linker in Liquid-Phase Chemistry, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46:3399.
199. A. N. Kurchan, O. D. Mitkin, A. G. Kutateladze, Dithiane and Trithiane-Based Photolabile Molecular Linkers Equipped with Amino-Functionality: Synthesis and Quantum Yields of Fragmentation, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry*, **2005**, 171:121.
200. P. J. Murray, C. Kay, J. J. Scicinski, S. C. McKeown, S. P. Watson, R. A. E. Carr, Rapid Reaction Scanning of Solid Phase Chemistry Using Resins Incorporating Analytical Constructs, *Tetrahedron Lett.*, **1999**, 40:5609.
201. P. Ordoukhanian, J.-S. Taylor, Design and Synthesis of a Versatile Photocleavable DNA Building Block. Application to Phototriggered Hybridization, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117:9570.
202. A. Hosomi, H. Sakurai, Syntheses of γ , δ -Unsaturated Alcohols from Allylsilanes and Carbonyl Compounds in the Presence of Titanium Tetrachloride, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 16:1295.
203. T. Watahiki, T. Oriyama, Iron (III) Chloride-Catalyzed Effective Allylation Reactions of Aldehydes with Allyltrimethylsilane, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43:8959.
204. J. S. Yadav, P. K. Chand, S. Anjaneyulu, Iodine-Catalysed Allylation of Aldehydes with Allyltrimethylsilane, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, 43:3783.
205. J. E. McMurry, A. Andrus, G. M. Ksander, J. H. Musser, M. A. Johnson, Stereospecific Total Synthesis of Aphidicolin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101:1330.
206. C. Girard, M.-L. Miramon, T. de Solminihac, J. Herscovici, 3-C-(6-O-acetyl-2,3,4-tri-O-benzyl- α -D-mannopyranosyl)-1-propene: a Caveat, *Carbohydrate Res.*, **2002**, 337:1769.
207. A. D. Barone, J.-Y. Tang, M. H. Caruthers, In situ activation of bis-dialkylaminophosphines - a new method for synthesizing deoxyoligonucleotides on polymer supports, *Nucleic Acids Res.*, **1984**, 12:4051.
208. T. Okimoto, D. Swern, Phase Transfer Agents. I. Transfer of Permanganate, Periodate, and Cyanate Ions from Aqueous to Organic Phases. Preparation of Quaternary Onium Periodates, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1977**, Vol. 54, No. 11:862A.
209. A. McKillop, L. S. Mills, Phase-Transfer Catalysed Permanganate Oxidations Using Tris[2-(2-methoxyethoxy)ethyl]amine (TDA-1), *Synth. Commun.*, **1987**, Vol. 17, No. 6:647.
210. M. L. Wolfrom, J. B. Miller, Detection of Carbohydrates on Paper Chromatograms, *Anal. Chem.*, **1956**, 28(6):1037.
211. W. T. Markiewicz, K. Adrych-Rozek, M. Markiewicz, A. Zebrowska, A. Astriab, Innovations in Solid Phase Synthesis, 1994: Biological and Biomedical Applications. Mayflower Worldwide, Brimingham, 339.
212. W. T. Markiewicz, G. Gröger, R. Rösch, R. Zebrowska, H. Seliger, A New Method of Synthesis of Fluorescently Labelled Oligonucleotides and Their Application in DNA Sequencing, *Nucleosides & Nucleotides*, **1992**, 11:1703.
213. E. Bayer, A. K. H. Willis, W. Rapp, B. Hemmasi, Carbon-13 NMR Relaxation Times of a Tripeptide Methyl Ester and its Polymer-Bound Analogs, *Macromolecules*, **1990**, 23:1937.
214. S. M. Sternson, S. L. Schreiber, An Acid- and Base-Stable o-Nitrobenzyl Photolabile Linker for Solid Phase Organic Synthesis, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39:7451.

215. H. Sakurai, T. Imai, A. Hosomi, Preparation of Cyclopropylmethyl Ketones from 3-Butenylsilane and Acid Chloride, *Tetrahedron Lett.*, **1977**, 46:4045.
216. H. Hsiung, S. Inouye, J. West, B. Sturm, M. Inouye, Further Improvements on the Phosphotriester Synthesis of Deoxyribonucleotides and the Oligonucleotide Directed Sitespecific Mutagenesis of E. coli Lipoprotein Gene, *Nucleic Acids Res.*, **1983**, Vol. 11, No. 10:3227.
217. P. Kumar, K. C. Gupta, Novel Conditions for Rapid and Clean Deprotection of Oligodeoxyribonucleotides from Universal Polymer Supports, *Reactive & Functional Polymers*, **1999**, 41:197.
218. R. T. Pon, S. Yu, Hydroquinone-O,O'-diacetic acid ('Q-linker') as a Replacement for Succinyl and Oxalyl Linker Arms in Solid Phase Oligonucleotide Synthesis, *Nucleic Acids Res.*, **1997**, Vol. 25, No. 18: 3629.
219. Niepublikowana procedura opracowana w Pracowni Chemii Biokoniugatów
220. J. Albrethsen, Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry, *Clin. Chem.*, **2007**, (5):852.
221. A. Kraszewski, J. Stawinski, Phosphoryl Tris-Triazole - a New Phosphorylating Reagent, *Tetrahedron Lett.*, **1980**, 21:2935.
222. E. Jackson, C. S. Hudson, Studies on the Cleavage of the Carbon Chain of Glycosides by Oxidation. A New Method for Determining Ring Structures and Alpha and Beta Configurations of Glycosides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1937**, 59:994.
223. U. L. RajBhandary, Studies on Polynucleotides LXXVII. The Labeling of End Groups in Polynucleotide Chains: The Selective Modification of Diol End Groups in Ribonucleic Acids, *J. Biol. Chem.*, **1968**, Vol. 243, No. 3:556.
224. K. A. Watanabe, J. Beranek, H. A. Friedman, J. J. Fox, Nucleosides. XXVII. 3'-Amino-3'-deoxyhexopyranosyl Nucleosides. 11. Synthesis of 1-(3'-Amino-3'-deoxy- β -D-glucopyranosyl)pyrimidines and Related Compounds, *J. Org. Chem.*, **1965**, 30:2735.
225. J. A. Hunt, Terminal-Sequence Studies of High-Molecular-Weight Ribonucleic Acid: The Reaction of Periodate-Oxidized Ribonucleosides 5'-Ribonucleotides and Ribonucleic Acid with Isoniazid, *J. Biochem.*, **1965**, 95:541.
226. A. Steinschneider, H. Fraenkel-Conrat, Studies of Nucleotide Sequences in Tobacco Mosaic Virus Ribonucleic Acid. 111. Periodate Oxidation and Semicarbazone Formation, *Biochemistry*, **1996**, Vol. 5, No. 8:2729.
227. N. K. Kochetkov, E. I. Budovskii, E. D. Sviardlov, N. A. Simukova, M. F. Turchinskii, V. N. Schibaev, *Organicheskaya Khimiya Nukleinovykh Kislot*, Moskwa, **1970**, 532.
228. J. X. Khym, W. E. Cohn, Characterizations and Some Chemical Reactions of Periodate-oxidized Nucleosides, *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, Vol. 82, No. 24:6380.
229. J. X. Khym, The Reaction of Methylamine with Periodate-Oxidized Adenosine 5'-Phosphate, *Biochemistry*, **1962**, 2:344.
230. P. R. Whitfeld, A Method for the Determination of Nucleotide Sequence in Polyribonucleotides, *Biochem. J.*, **1954**, 58:390.
231. D. M. Brown, M. Fried, A. R. Todd, Nucleotides. Part XXXP The Stepwise Degradation of Polyribonucleotides: Model Experiments, *J. Chem. Soc.*, **1954**, 2206.
232. Yu, Small
233. Ryszard Kierzek, Wojciech T. Markiewicz, The Synthesis of 5'-O-Triphosphate-4-N-(ω -aminoalkyl)deoxycytidine a Useful Precursor to the Generation of Differently Labeled Triphosphates, *Nucleosides & Nucleotides*, **1991**, Vol. 10, No. 6:1257.
234. W. T. Markiewicz, R. Kierzek, B. Hemes, A New Method of Synthesis of 4-N-Alkyl Substituted Cytosine Derivatives via 4-N-Arylsulfonyl or Alkylsulfonyl Intermediates, *Nucleosides & Nucleotides*, **1987**, Vol. 6, No. 1&2:269.
235. P. Godzina, K. Adrych-Rożek, W. T. Markiewicz, Synthetic Oligonucleotide Combinatorial Libraries. 3. Synthesis of Polyaminonucleosides, *Nucleosides & Nucleotides*, **1999**, Vol. 18, No. 11:2397.

-
236. H. C. Neu, L. A. Heppel, Nucleotide Sequence Analysis of Polyribonucleotides by Means of Periodate Oxidation Followed by Cleavage with an Amine, *J. Biol. Chem.*, **1964**, Vol. 239, No. 9:2927.
 237. E. Nordhoff, M. Schurenberg, G. Thiele, C. Lubert, K.-D. Kloeppe, D. Theiss, H. Lehrach, J. Gobom, Sample Preparation Protocols for MALDI-MS of Peptides and Oligonucleotides Using Prestructured Sample Supports, *Int. J. Mass Spectrom.*, **2003**, 226:163.
 238. N. B. Cech, C. G. Enksole, Practical Implications of Some Recent Studies in Electrospray Ionization Fundamentals, *Mass Spectrom. Rev.*, **2001**, 20:362.
 239. W. T. Markiewicz, P. Godzina, M. Markiewicz, Synthesis of Polyaminooligonucleotides and their Combinatorial Libraries, *Nucleosides & Nucleotides*, **1999**, Vol. 18, No. 6:1449.
 240. W. T. Markiewicz, P. Godzina, M. Markiewicz, A. Astriab, Synthesis of Polyaminooligonucleotide Combinatorial Library, *Nucleosides & Nucleotides*, **1998**, Vol. 17, No. 9:1871.
 241. OLIGO ver. 3.4, 1989, Copyright: Wojciech Rydlik.
 242. W. T. Markiewicz, A. Rulka, zgłoszenie patentowe.