

# ZASTOSOWANIA „CLICK CHEMISTRY” W MODYFIKACJACH NUKLEOZYDÓW I OLIGONUKLEOTYDÓW

## APPLICATIONS OF CLICK CHEMISTRY IN MODIFICATION OF NUCLEOSIDES AND OLIGONUCLEOTIDES

**Michał Gładysz\*, Jan Milecki**

*Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii,  
Pracownia Spektrochemii Organicznej  
ul. Umultowska 89b, 61-614 Poznań  
\*e-mail: migladysz@amu.edu.pl*

---

Abstract

Wprowadzenie

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

1. Zastosowanie „Click Chemistry” w modyfikowaniu kwasów nukleinowych
2. Modyfikacje części zasady azotowej kwasu nukleinowego
  - 2.1. Antysensowne oligonukleotydy (ASO) i siRNA
  - 2.2. Nanomateriały oparte na oligonukleotydach
  - 2.3. Określanie struktury
  - 2.4. Znakowanie fluorescencyjne
  - 2.5. Poszukiwanie substancji przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych
3. Modyfikacje części cukrowej kwasu nukleinowego
  - 3.1. Modyfikacje części cukrowej w pozycji C3'
  - 3.2. Modyfikacje części cukrowej w pozycji C5'
  - 3.3. Modyfikacje części cukrowej w pozycji C2'
4. Modyfikacje szkieletu kwasu nukleinowego
  - 4.1. Modyfikacje szkieletu DNA
  - 4.2. Modyfikacje szkieletu RNA
  - 4.3. Pozostałe modyfikacje szkieletu kwasu nukleinowego
5. Biosprzężenia

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

---

**mgr Michał Gładysz** ukończył studia magisterskie na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu w roku 2009. W tym samym roku został przyjęty na studium doktoranckie na tym samym wydziale, gdzie pod kierunkiem prof. Jana Mileckiego realizuje swoją pracę doktorską. Mgr Gładysz prowadzi badania nad syntezą acyklicznych pochodnych nukleozydów i oligonukleotydów z zastosowaniem „Click Chemistry”. Przedmiotem jego zainteresowań badawczych jest chemia nukleozydów, nukleotydów oraz kwasów nukleinowych z wykorzystaniem metody „Click Chemistry”.

**dr hab. Jan Milecki** studiował chemię na UAM i na tej samej uczelni obronił doktorat oraz się habilitował. Dwukrotnie był stypendystą NIH, odbywał staże badawcze w Freie Universitaet Berlin i Biomedical Center University of Uppsala. Jego zainteresowania badawcze to synteza modyfikowanych nukleozydów, nukleotydów i oligonukleotydów stosowanych w badaniach strukturalnych kwasów nukleinowych. Zajmuje się też chemią medyczną, stosowaniem trwałych izotopów do selektywnego znakowania związków organicznych, badaniami fluorescencji, spektroskopią NMR. Jest profesorem UAM.

## ABSTRACT

since the year 2001 new ideology of clean and simple synthesis in organic chemistry has been established. The outstanding scientists Meldal and Sharpless presented their concepts of Click Chemistry. Among the reactions chosen for this concept the reaction of Copper(I) Catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition (CuAAC) became the most popular one. It is the basis of syntheses employed for building blocks synthesis in medicinal chemistry and material science. Libraries of potentially pharmacologically active anticancer and antivirus compounds possessing neutral triazol linkage could be easily obtained.

Remarkable efficiency of CuAAC reaction influenced on DNA- and RNA-based synthesis of novel oligonucleotides derivatives. Many of nucleic acid molecular modifications found applications in enzymatic transformation, nucleic acid hybridization, molecular tagging and gene silencing. The CuAAC reaction allows for introducing modifications into practically every region of nucleoside/nucleotide/oligonucleotide. This includes versatile modifications of the base moiety both aiming at the base pairing ability or specific labeling of the nucleoside unit. Different conjugates (bio-, fluorescent-, affinity- or spin labels) are being attached to the base part of the nucleic acid taking advantage of the presence of azide or alkyne substituents, which can be installed without great difficulty.

Labeling at the sugar part of the nucleoside can be realized at the position 2', 3' or 5', the latter two giving rise to the end-labeled oligonucleotides and the 2' position serving as the attachment point for labeling inside the oligonucleotide chain. These kind of nucleic acid modifications are very promising. Versatility of CuAAC reactions is demonstrated by numerous examples of introducing modifications into practically every reactive site of the nucleotide/oligonucleotide molecule. The review systematically presents application of the “click” technique for modification of nitrogenous base, sugar or pseudosugar moiety or phosphorus center. Possibility of creating new kind of chain linkage, devoid of negative charge and nuclease resistant is also shown. This allows to design a new class of nucleic acid analogues, similar in its DNA-mimicking properties to PNA's.

Keywords: Click Chemistry, CuAAC, nucleosides modifications, oligonucleotides, DNA, RNA

Słowa kluczowe: „Click Chemistry”, CuAAC, modyfikacje nukleozydów, oligonukleotydy, DNA, RNA

---

---

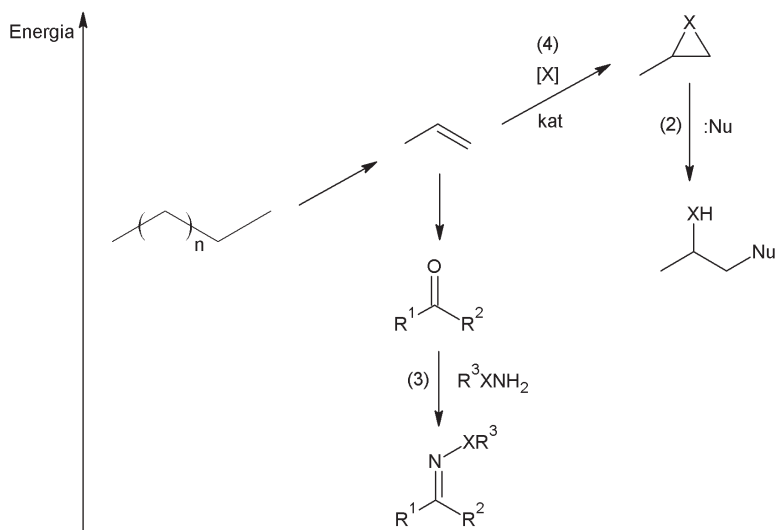
## WYKAZ STOSOWANYCH SYMBOLI I OZNACZEŃ

CuAAC	– katalizowana miedzią(I) cykloaddycja azydek-alkin (ang. <i>copper(I) catalyzed alkyne-azide cycloaddition</i> )
DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i> )
RNA	– kwas rybonukleinowy (ang. <i>ribonucleic acid</i> )
5-FU	– fluorouracyl
PNA	– kwas peptydonukleinowy (ang. <i>peptide nucleic acid</i> )
RuAAC	– katalizowana rutenem(II) cykloaddycja azydek-alkin (ang. <i>ruthenium(II) catalyzed alkyne-azide cycloaddition</i> )
ASO	– antysensowny oligonukleotyd (ang. <i>antisense oligonucleotide</i> )
siRNA	– małe interferujące RNA (ang. <i>short-interfering RNA</i> )
ANA	– analog nukleozydu o aktywności przeciwwirusowej (ang. <i>antiviral nucleoside analogue</i> )
TFO	– oligonukleotydy tworzące potrójną helisę (ang. <i>triplex forming oligonucleotides</i> )
RSV	– wirus syncytium nabłonka oddechowego (ang. <i>respiratory syncytial virus</i> )
HCV	– wirus zapalenia wątroby typu C (ang. <i>hepatitis C virus</i> )
ssDNA	– jednoniciowe DNA (ang. <i>single stranded DNA</i> )
mRNA	– matrycowe RNA (ang. <i>messenger RNA</i> )
TMS	– grupa trimetylosililowa (ang. <i>trimethylsilyl</i> )
Ph	– grupa fenyłowa (ang. <i>phenyl</i> )
Ac	– grupa acetylowa (ang. <i>acetyl</i> )
RNAi	– interferencja RNA (ang. <i>RNA interference</i> )
ADAR	– deaminaza adenozyiny dwuniciowego RNA
AZT	– 3'-azydo-3'-deoksytymidyna
PEG	– glikol polietylenowy (ang. <i>polyethylene glycol</i> )
N3BC	– 7-azydo-4-(bromometylo)-2H-chromen-2-on
EPR	– spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ang. <i>electron paramagnetic resonance</i> )
SDLS	– ukierunkowane znakowanie spinowe (ang. <i>site-directed spin labeling</i> )
TBTA	– tris[(1-benzylo-1H-1,2,3-triazol-4-ilo)metylo]amina
DIPEA	– <i>N,N</i> -diizopropylometyloamina
THF	– tetrahydrofuran
TEMPO	– wolny rodnik 2,2,6,6-tetrametylopiperydino-1-oksylowy
SNP	– polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. <i>single nucleotide polymorphism</i> )

ANP	– acykliczne fosfoniany nukleozydów (ang. <i>acyclic nucleoside phosphonate</i> )
CML	– przewlekła białaczka szpikowa (ang. <i>chronic myelogenous leukemia</i> )
AICAR	– 5-amino-4-karboksyamido-imidazoilo1- $\beta$ -D-rybofuranozyd (Acadesine)
TK	– kinaza tymidynowa
dNK	– kinaza deoksyrybonukleinowa
MSNT	– 1-(mezytyleno-2-sulfoniano)-3-nitro-1,2,4-triazol
DMT	– grupa 4,4'-dimetoksytrytylowa
<sup>TL</sup> DNA	– DNA połączone układem triazolowym (ang. <i>triazole-linked DNA</i> )
Fmoc	– grupa 9-fluorenylometoksykarbonylowa
ODN	– oligodeoksynukleotyd (ang. <i>oligodeoxynucleotide</i> )
SPAAC	– katalizowana naprężeniem pierścienia cykloaddycja azydek-alkin (ang. <i>strain-promoted alkyne-azide cycloaddition</i> )

## WPROWADZENIE

Prawie 15 lat temu, w 2001 roku, Meldal i Sharpless odkryli katalityczny wpływ jonów miedzi(I) na reakcje 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena. Reakcja CuAAC stała się klasycznym przykładem reakcji typu „Click Chemistry” [1]. Do tej rodziny reakcji zaliczamy również inne procesy, których wspólnym mianownikiem jest spełnianie kilku warunków - charakteryzują się wysoką wydajnością, prostotą prowadzenia, odpornością na tlen i wodę, łatwością oczyszczenia produktów i ich stabilnością w warunkach fizjologicznych. Istnieją cztery podstawowe typy reakcji spełniających te warunki: (1) cykloaddycja hetero-Dielsa-Aldera i 1,3-dipolarna cykloaddycja Huisgena [2], (2) substytucja nukleofilowa w naprężonych elektrofilowych układach heterocyklicznych [3, 4], (3) reakcje grupy karbonylowej typu niealdolowego, (4) reakcje z udziałem wiązań wielokrotnych węgiel-węgiel (Rys.1) [1].



Rysunek 1. Różne typy reakcji „Click Chemistry” – (2) nukleofilowe otwarcie naprężonego pierścienia, (3) reakcje typu niealdolowego z karbonyłem, (4) reakcje addycji do wiązania podwójnego [1]

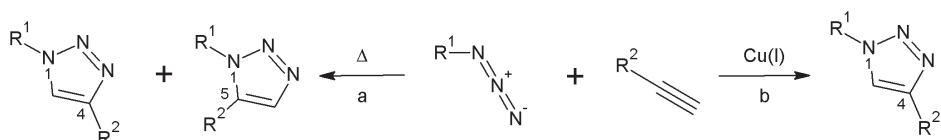
Figure 1. Different types of Click Chemistry – (2) nucleophilic ring opening, (3) non-aldol carbonyl chemistry, (4) addition to double bond [1]

Spośród tych różnych typów reakcji „Click Chemistry”, to właśnie reakcja pomiędzy azydkiem i terminalnym alkinem zyskała największą popularność. Dzięki dużej różnorodności, dużej szybkości reakcji, prostocie jej prowadzenia i szerokiemu wachlarzowi zastosowań [5–8], stała się kluczem do produkcji nowych materiałów [9, 10] oraz bibliotek związków o potencjalnej aktywności biologicznej [6]. Reakcja CuAAC może być stosowana w procesie biotransformacji żywych komórek ze względu na różnorodność warunków prowadzenia reakcji, wysoką wydajność zachodzącego sprzęgania azydku z alkinem oraz fizjologiczną bierność substratów reakcji [11]. Ważna jest również kontrola regio- jak i stereospecyficzności triazo-

lowego produktu [1]. Ponadto na korzyść stosowania metody CuAAC wpływają następujące cechy:

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

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



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

Scheme 1. Huisgen reaction of 1,3-dipolar cycloaddition initiated thermally (a) and catalyzed by copper(I) ions (b) [12]

Reakcja katalizowana związkami kompleksowymi rutenu(II) jest też regioselektywna, szybka i wydajna. Produktem reakcji RuAAC jest 1,5-dipodstawiony 1,2,3-triazol. Możliwa jest również reakcja cykloaddycji między azydkiem i alkinem wewnętrznym, która prowadzi do 1,4,5-tripodstawionych 1,2,3-triazoli (Schemat 2) [13–15].



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

Scheme 2. Synthesis of 1,4,5-trisubstituted 1,2,3-triazoles in the presence of ruthenium(II) complexes

## 1. ZASTOSOWANIE „CLICK CHEMISTRY” W MODYFIKOWANIU KWASÓW NUKLEINOWYCH

W procesie poszukiwań nowych farmaceutyków i narzędzi biotechnologicznych, przeprowadza się liczne i wielokierunkowe modyfikacje kwasów nukleinowych. W przypadku oligonukleotydów modyfikacje mogą służyć osłabieniu niektórych kłopotliwych cech wynikających z ich budowy – na przykład polianionowej struktury szkieletu oraz ich podatności do rozszczepiania przez nukleazy [16]. Wprowadzenie modyfikacji powoduje, że związki tej klasy znajdują zastosowania w diagnostyce molekularnej, między innymi do syntezy mikromacierzy DNA [17–19], sond molekularnych [20, 21], pełnią rolę antysensownych oligonukleotydów (ASO) [22, 23] i krótkich fragmentów dwuniciowego RNA służących wyciszeniu ekspresji genów (siRNA) [24–26]. Analogi fragmentów kwasów nukleinowych są badane jako substancje aktywne w terapiach przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych, jak i substancje regulujące ekspresję genów. Przeciwwirusowe analogi nukleozydów (ANA) i antysensowne oligonukleotydy są handlowo dostępne i stosowane do zwalczania chorób wirusowych oraz ekspresji wadliwych genów w chorych komórkach [27, 28]. Nadal trwają badania nad efektywnością i możliwością zastosowania siRNA w terapii farmakologicznej [29–32]. Innymi przykładami zastosowania biologicznie aktywnych pochodnych kwasów nukleinowych jest otrzymywanie syntetycznych rybozymów [33], unikalnych aptamerów [34] i oligonukleotydów formujących potrójną nić (TFO) [35].

Kwasy nukleinowe mogą być modyfikowane na trzy główne sposoby: (1) modyfikacje części cukrowej nukleotydu, (2) modyfikacje nukleotydowej zasady azotowej oraz (3) modyfikacje fragmentu fosfodiesterowego będącego międzynukleotydowym łącznikiem. Do wprowadzania modyfikacji w każdej z części nukleotydu, coraz szerzej stosowana jest metoda „Click Chemistry”.

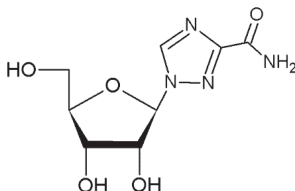
Najczęściej modyfikacje z użyciem „Click Chemistry” wprowadzane są we fragmencie zasady azotowej nukleozydu [36]. Tak przeprowadza się znakowanie fluoroforowe lub izotopowe dla obrazowania molekularnego [37–40], formuje połączenia między nićmi oligonukleotydów [41–43], wytwarza bio-połączenia z cząsteczkami transportującymi w terapiach z użyciem kwasów nukleinowych [44], a nawet syntetyzuje się nowe analogi całej części zasady azotowej nukleotydu [45–48]. Natomiast mniejsza jest liczba prac dotyczących zmian naturalnej struktury szkieletu oligonukleotydowego [49]. Głównym problemem w zastosowaniu analogów oligonukleotydów jako substancji terapeutycznych, jest ich polianionowa struktura wynikająca z obecności fosfodiesterowego łącznika [24, 26, 32]. „Click Chemistry” może zaproponować substytut dla układu fosfodiesterowego, podstawiając w jego miejsce elektrycznie obojętny i stabilny w warunkach fizjologicznych układ triazolowy.



## 2. MODYFIKACJE CZĘŚCI ZASADY AZOTOWEJ KWASU NUKLEINOWEGO

Zasady azotowe są najczęściej modyfikowanymi fragmentami kwasów nukleinowych, co wynika z obecności centrów aktywnych chemicznie, krótszych dróg wprowadzania modyfikacji oraz różnorodności w funkcjonalności otrzymywanych pochodnych [39, 50]. Analogi zawierające zmodyfikowaną część zasadową mogą zostać włączone w łańcuch oligonukleotydu w postaci amidofosforynowego bloku budulcowego [51]. W ten sam sposób można wprowadzić do oligonukleotydu analogi zawierające modyfikacje części cukrowej lub szkieletu. Przewagą w przypadku modyfikacji części zasady azotowej, jest możliwość włączenia analogu w środku łańcucha oligonukleotydowego, a nie tylko na jego końcach [52]. Modyfikowane zasady azotowe mogą zostać sterycznie wpasowane w dużą i małą bruzdę w dupleksach DNA i RNA, bez zakłócania bezpośrednich oddziaływań Watsona-Cricka [50, 53]. W niektórych przypadkach modyfikacja tego typu zwiększa dokładność hybrydyzacji krótkich modyfikowanych fragmentów DNA i RNA, zapobiegając niewłaściwemu sparowaniu [38, 47]. Zmienia to aktywność tak modyfikowanych analogów oligonukleotydów w procesie wyciszania wadliwych genów, poprzez zmianę termodynamiki parowania ich zasad [54].

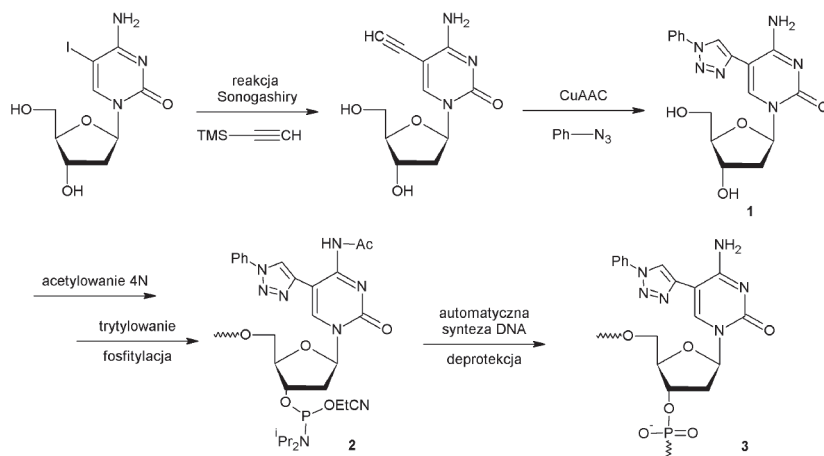
Z wykorzystaniem „Click Chemistry” najczęściej modyfikuje się pozycje 7-aza lub deaza i N<sup>9</sup> adeniny lub guaniny, oraz grupy aminowe 2-N guaniny i 6-N adeniny. W przypadku zasad pirymidynowych, najczęściej modyfikowane są pozycje C5, grupa aminowa 4-N cytozyny i pozycja N<sup>1</sup>. Modyfikacja pozycji C5 w pirymidynie i pozycji 7-deaza w purynach wykorzystuje przestrzeń dużej bruzdy dupleksów RNA i DNA oraz nie wpływa niekorzystnie na naturalne parowanie się zasad. Ta strategia pozwala na przyłączanie dużych cząsteczek w celu badań strukturalnych, fluorescencyjnej wizualizacji bądź ułatwienia transportu [40, 55, 56]. Poza modyfikacją naturalnie występujących zasad azotowych, triazole wykorzystano jako substytut tej części nukleotydu (Rys. 2) [57]. Wśród analogów nukleozydów tej grupy, można wskazać wykazujące działanie przeciwwirusowe i przeciwnowotworowe [58–60].



Rysunek 2. Rybawiryna – lek przeciwwirusowy stosowany w zakażeniach wirusami RSV i HCV  
Figure 2. Ribavirine – antiviral agent active against RSV and HCV viruses

## 2.1. ANTYSSENSOWNE OLIGONUKLEOTYDY (ASO) I siRNA

**Antysensowne oligonukleotydy** to jednoniciowe fragmenty DNA (ssDNA), które odnajdują i hybrydują komplementarnie ze specyficznymi transkryptami mRNA w komórkach. Ograniczają w ten sposób ekspresję niepożądanych struktur białkowych [61–63]. Ponadto dupleks ASO:RNA może aktywować enzym Rybonukleazę H (RNase H), która rozkłada transkrypt RNA lub fizycznie inhibuje jego właściwą translację. Modyfikacja zwiększa odporność ASO na degradację enzymatyczną z jednoczesnym zwiększeniem stabilności interakcji DNA:RNA [64]. W badaniach Nielsena przyłączano ugrupowanie hydrofobowe i aromatyczne w pozycji C5 zasad pirymidynowych, wykorzystując układ triazolowy [65]. Wykazano, że wpasowanie grup hydrofobowych w przestrzeń dużej bruzdy DNA może zwiększyć stabilność dupleksów, poprzez oddziaływania steryczne [66, 67]. Z powodów sterycznych jak i z uwagi na możliwość tworzenia wiązania wodorowego z protonem przy atomie węgla C5 ugrupowanie triazolowe podnosi stabilność dupleksów [65, 68, 69]. W badaniach potwierdzających te właściwości otrzymano, wychodząc z C5-jodo-cytydyny, analog cytydyny **1**, który po przekształceniu do bloku budulcowego **2** wprowadzono do sekwencji DNA otrzymując nić zawierającą analog cytydyny **3**. Podobny analog otrzymano także dla 5-(fenylotriazolo)urydyny (Schemat 3) [68]. Stwierdzono że pochodna urydyny lepiej oddziaływała z RNA lub dupleksem DNA, jako oligonukleotyd tworzący trójniciowe DNA (TFO).

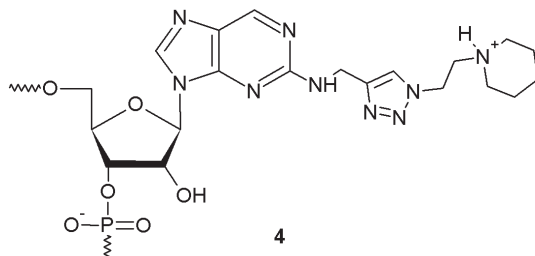


Schemat 3. Synteza układu z modyfikacją w pozycji C5 cytydyny, zwiększającą stabilność dupleksu DNA

Scheme 3. Synthesis of C5 modified cytosine structures, for increased DNA duplex stability

**siRNA** to dwuniciowe RNA zwykle o długości 21 par zasad, w którym jedna nić jest aktywna (przewodnia) i odpowiada za selektywne rozszczepianie transkryptów mRNA [25]. Struktury siRNA są modyfikowane w celu zredukowania ich skłonności do wiązania białek nie uczestniczących w interferencji RNA (RNAi) [70, 36]. Białka wiążące się z tym dwuniciowym RNA oddziałują głównie poprzez małą bruzdę

struktury dwuniciowej [71, 72]. Beal wraz z zespołem zaproponował modyfikacje rejonu małej brzozy dupletu RNA za pomocą analogu nukleotydu purynowego **4**, który włączono zarówno do nici przewodniej jak i nici nieaktywnej (Rys. 3). Okazało się, że aktywność wyciszania niechcianych genów nie została zmniejszona, ale również przy modyfikacji nici nieaktywnej zredukowano wiązanie siRNA z deaminazą adenozykową (ADAR1) uczestniczącą w metabolizmie puryn [73].

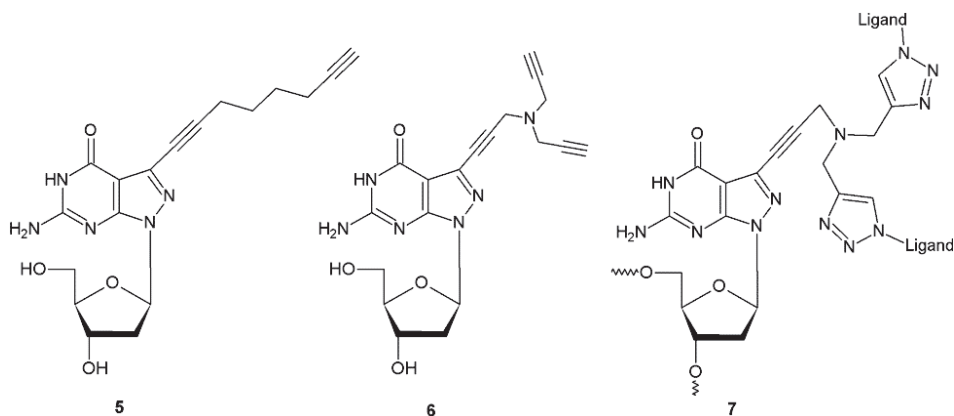


Rysunek 3. Struktura związku **4** wykorzystywanego w badaniach siRNA

Figure 3. Compound **4** used for siRNA-based applications

## 2.2. NANOMATERIAŁY OPARTE NA OLIGONUKLEOTYDACH

Seela i jego grupa badawcza otrzymali i przebadali nanomateriały oparte na DNA zawierającym ugrupowanie triazolowe. Możliwe jest ich zastosowanie jako substancji przenoszących leki [44] i do nanoznakowania powierzchni stałych. Zespół Seeli przeprowadził reakcje funkcjonalizowania 7-deaza-2'-deoksyguanozyny alkilowymi łącznikami o różnej długości zawierającymi terminalne mono- lub diacetylenki, otrzymując odpowiednio pochodne **5** i **6** (Rys. 4).



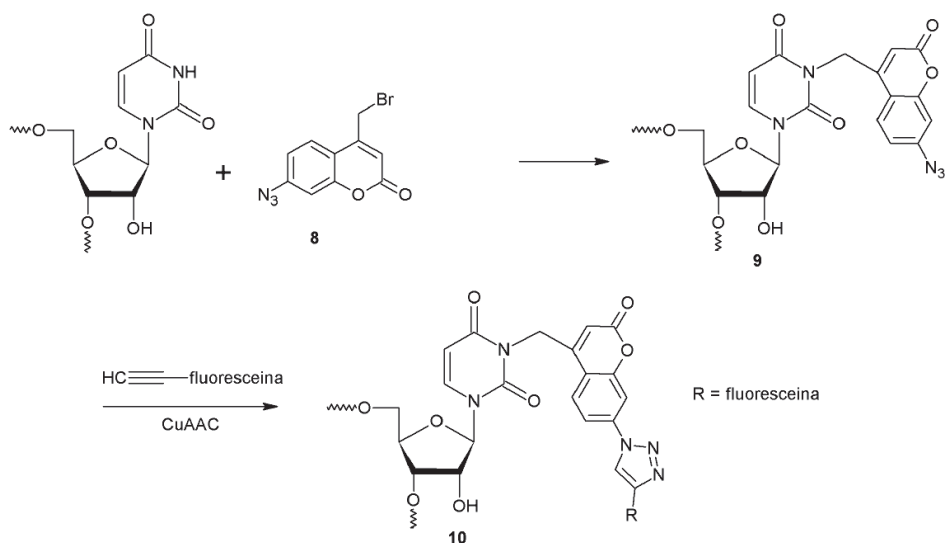
Rysunek 4. Struktury analogów 8-aza-7-deazaguanozyny z podstawnikiem alkinowym

Figure 4. Structures of 8-aza-7-deazaguanosine analogues with alkyne substituent

Po przyłączeniu związku **5** w postaci amidofosforynu do końca 5' lub w centralnym regionie syntetyzowanego oligonukleotydu, doszło do połączenia przez układ triazolowy z podłożem krzemowym sfunkcjonalizowanym azydkiem [74]. Imobilizowane oligonukleotydy formowały samoistnie wzory w zależności od położenia analogów deoksyguanozyny [68, 75]. Seela i in. kontynuowali funkcjonalizowanie związku **6** przez reakcje podwójnej cykloaddycji, wykorzystując w tym celu różne pochodne zawierające grupę azydkową (AZT, PEG-N<sub>3</sub>, azydek benzylu) – co miało wpływ na zdolność transportu leków przez zmodyfikowany produkt **7**.

### 2.3. OKREŚLANIE STRUKTURY

Wiele różnych grup funkcyjnych znajduje zastosowanie w określaniu struktury i funkcji związków opartych na DNA lub RNA. Helm ze swoją grupą badawczą przeprowadził post-syntetyczne znakowanie łańcucha oligonukleotydu chromoforem (N3BC, **8**) opartym na strukturze kumaryny (Schemat 4) [79].

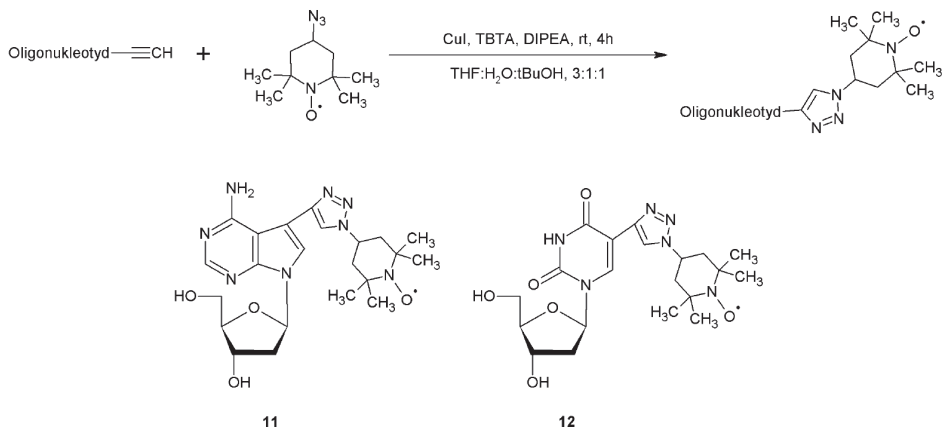


Schemat 4. Alkilowanie urydyny specyficznie w pozycji N<sup>3</sup> za pomocą N3BC  
 Scheme 4. Site-specific N<sup>3</sup>-alkylation of uridine with N3BC

Chromofor N3BC reagował specyficznie z pochodną urydyny (**9**) zawartą w badanej sekwencji RNA. Wykazywał też, analogicznie do kumaryny, maksimum długości fali wzbudzenia przy 320 nm. Następnie tak zmodyfikowane RNA poddano reakcji CuAAC z fluoroforem sfunkcjonalizowanym grupą alkinową, dzięki wolnej grupie azydkowej w cząsteczce N3BC (**10**) [36].

W celu wykorzystania EPR połączonego z SDLS [76], grupa badawcza Seeli zastosowała metodę „Click Chemistry” do modyfikacji cząsteczek DNA i RNA

zawierających sfunkcjonalizowane alkinem analogi purynowe **11** i pirymidynowe **12**. Modyfikacja polegała na sprzęganiu z rodnikiem nitroksylowym 4-azydo-TEMPO będącym znacznikiem spinu (Schemat 5) [55, 77]. Był to pierwszy przykład tego typu modyfikacji służącej analizie struktury za pomocą EPR.



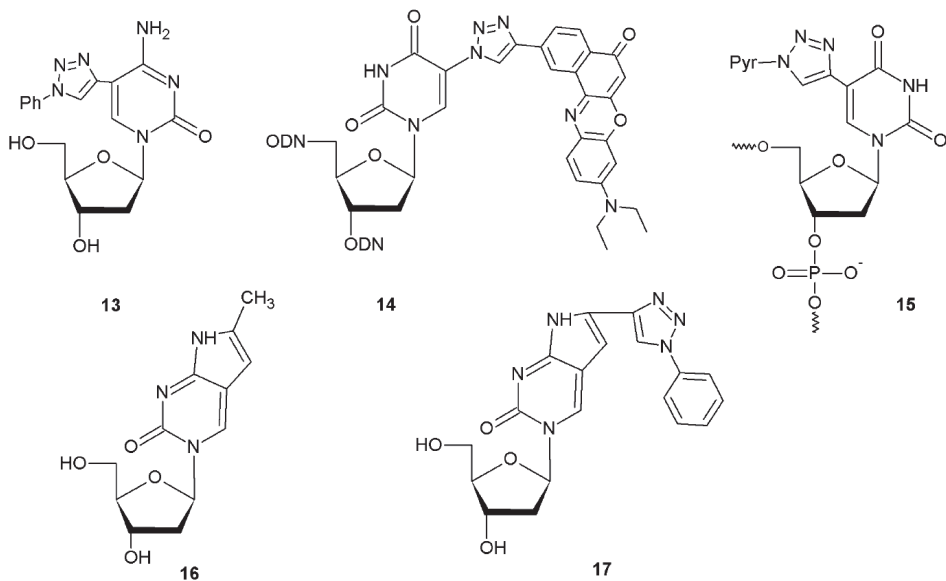
Schemat 5. Postsyntetyczne znakowanie oligonukleotydu za pomocą 4-azydo-TEMPO oraz przykładowe struktury purynowego i pirymidynowego mimika

Scheme 5. The post-synthetic click-ligation of the 4-azido-TEMPO spin label and examples of purine and pyrimidine mimics

#### 2.4. ZNAKOWANIE FLUORESCENCYJNE

Przyłączanie sond fluorescencyjnych do zasad azotowych [38, 40, 56] lub włączanie zasady nukleinowej w strukturę fluorofora jako jego integralnej części [39, 52, 78] jest powszechną techniką znakowania oligonukleotydów. Pozwala to zbierać dane wizualizujące proces hybrydyzacji, w zależności od struktury badanego związku [38,79]. Zastosowanie reakcji CuAAC znacznie upraszcza proces przyłączania fragmentu fluorescencyjnego do badanych związków.

Ciekawym przykładem fluorofora jest analog cytydyny **13** (Rys. 5), który powstał w wyniku reakcji CuAAC bloku budulcowego C5-etynylocytydyny z azydem, przy czym żaden z reagentów nie jest faktycznym fluoroforem [39]. Innym przykładem jest przyłączenie fluorofora – Czerwieni Nilu, za pomocą układu triazolowego, w pozycji C5-urydyny (**14**) [56]. Żeby wykryć obecność polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) za pomocą fluorescencji, Hrdlicka wraz z zespołem wykorzystali reakcje CuAAC i przyłączyli piren poprzez układ triazolowy w pozycji C5 urydyny. Tak otrzymany związek **15** wskazywał na obecność polimorfizmu przez obniżenie wydajności kwantowej fluorescencji w obecności zmienionej sekwencji [38].



Rysunek 5. Struktury analogów nukleozydów zawierających układ triazolowy, o właściwościach fluorescencyjnych  
 Figure 5. Structures of nucleosides analogues with fluorescent properties

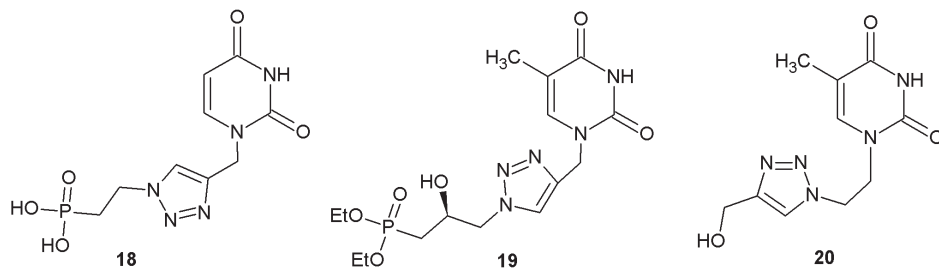
Seela i jego grupa otrzymali alternatywną pochodną pirolo-deoksycytydyny **16**, którą zmodyfikowano przez układ triazolowy otrzymując związek **17**, o dziesięciokrotnie większej wydajności kwantowej fluorescencji [47]. Stwierdzono, że fluorescencja związku **17** ulega silnemu wygaszeniu przy hybrydyzacji z komplementarną sekwencją. Wygaszenie fluorescencji jest największe przy parowaniu z deoksygwanozyną.

## 2.5. POSZUKIWANIE SUBSTANCJI PRZECIWWIRUSOWYCH I PRZECIWNOWOTWOROWYCH

Modyfikowane nukleozydy znane są ze swoich właściwości przeciwwirusowych i przeciwnowotworowych. Związki takie jak AZT, 5-fluorouracyl czy Ribawiryna są powszechnie stosowanymi komercyjnymi lekami. Zastosowanie reakcji CuAAC umożliwia tworzenie bibliotek nowych modyfikacji o potencjalnym działaniu przeciwwirusowym i przeciwnowotworowym [80]. O możliwości tworzenia wielu pochodnych nukleozydów wykazujących aktywność leczniczą, decydują wspomniane na wstępie bardzo korzystne właściwości łącznika triazolowego i „Click Chemistry” [1, 6, 7, 11].

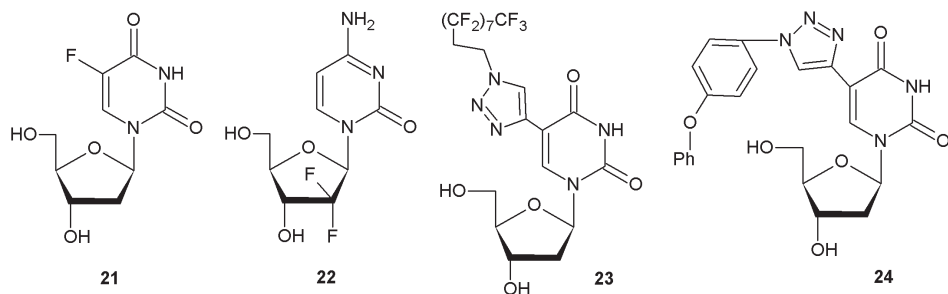
Substancje będące aktywnymi antypatogenami należą do grupy acyklicznych fosfonianów nukleozydów (ANP). Występujący naturalnie cukrowy pierścień furanozy jest w nich zastąpiony przez łańcuch alkilowy, łączący fosfonian poprzez triazol z pozycją N<sup>1</sup> zasady pirymidynowej lub pozycją N<sup>9</sup> zasady purynowej. Przed-

stawicielami tej klasy są związki: **18**, wykazujący aktywność przeciwko wirusowi HCV [31] oraz **19**, o potencjalnym działaniu przeciwwirusowym [81]. Przykładem aktywnego przeciwwirusowo acyklicznego analogu N<sup>1</sup>-pirymidyny pozbawionego reszty fosfonianowej jest związek **20** (Rys. 6).



Rysunek 6. Struktury związków o właściwościach przeciwwirusowych  
Figure 6. Compounds displaying antiviral properties

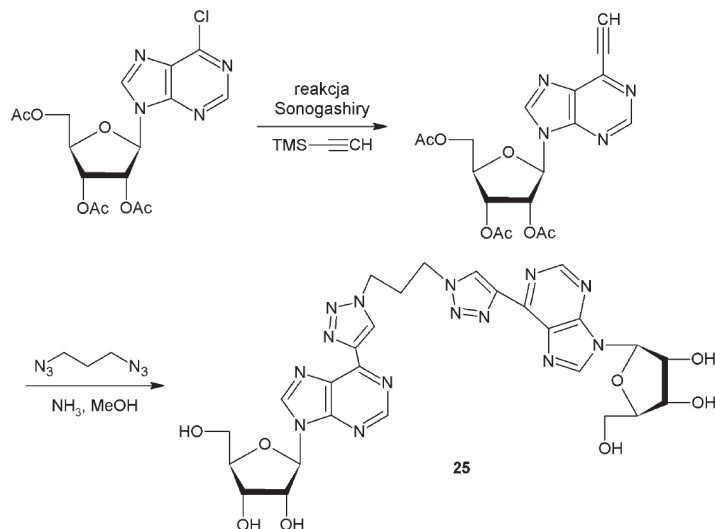
Inną grupą modyfikowanych nukleozydów o aktywności przeciwnowotworowej są fluorowane analogi, takie jak skuteczne leki 5-fluorouracyl, 5-fluorodeoksyurydyna (**21**) czy Gemcytabina (**22**). Tworzone są biblioteki związków fluorowanych zawierających układ triazolowy i testowana jest ich aktywność przeciwwirusowa [82, 58]. Modyfikując pozycję C5 układów 2'-deoksyprymidynowych [39, 65] uzyskano pochodne takie jak związek **23**. Wykazują one właściwość inhibicji wzrostu komórek rakowych [58]. Agrofoglio wraz z zespołem również opracowali bibliotekę pochodnych modyfikowanych w pozycji C5. Jeden z uzyskanych związków (**24**) wykazuje aktywność przeciw wirusom DNA, ale również jest aktywny przeciwnowotworowo w stopniu porównywalnym z 5-fluorouracylem (Rys. 7) [59].



Rysunek 7. Struktury leków przeciwnowotworowych – 5-fluorodeoksyurydyny (**21**) i Gemcytabiny (**22**) oraz związków **23** i **24**, również aktywnych przeciwnowotworowo  
Figure 7. Anticancer active compounds – Floxuridine (**21**), Gemcitabine (**22**) and compounds **23** and **24**

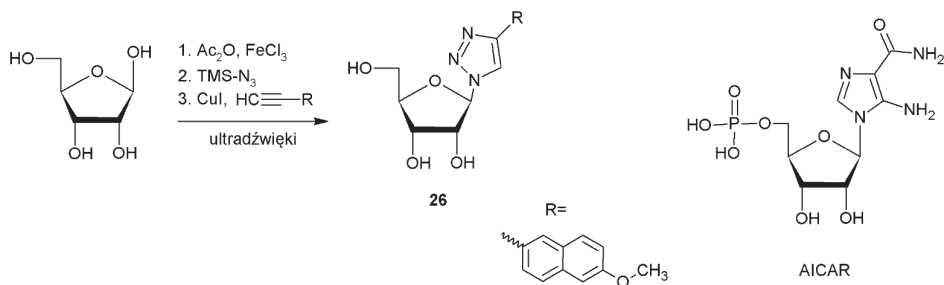
Mathew wspólnie z innymi autorami opracował syntezę analogów nukleozydów wykorzystując podstawnik alkinowy w pozycji C6 puryny. Dzięki sprzężeniu z azydkiem w reakcji typu CuAAC otrzymano kilka pochodnych takich jak dimer

homopurynowy **25** (Schemat 6). Związki tego typu są agonistami lub antagonistami receptorów adenyzynowych [83].



Schemat 6. Synteza dinukleozydu z łącznikiem triazolowym w części zasadowej  
Scheme 6. Synthesis of triazole-linked dinucleosides

Kolejnym rodzajem modyfikacji jest substytucja części zasadowej nukleozydu, czyli wprowadzenie triazolu w pozycji 1'-furanozy. Istnieje kilka przykładów aktywnych biologicznie cząsteczek imitujących naturalne nukleozydy, z pierścieniem triazolowym w pozycji 1'-furanozy [84]. Praktyczną metodą wprowadzania układu triazolowego okazała się synteza z wykorzystaniem ultradźwięków. Reakcję typu „one-pot” prowadzi się w obecności jonów żelaza(III), użycie ultradźwięków skraca czas reakcji do minut, jednocześnie zwiększa się wydajność procesu (Schemat 7). Wykazano, że produkt reakcji (**26**) skraca czas życia komórek K562 przewlekłej białaczki szpikowej (CML) o 93% w porównaniu ze znanym inhibitorem AICAR skracającym ten czas o 35%.



Schemat 7. Synteza mimików nukleozydów wspomagana ultradźwiękami oraz struktura AICAR  
Scheme 7. Ultrasonic irradiation assisted one-pot synthesis of nucleosides mimics and AICAR structure

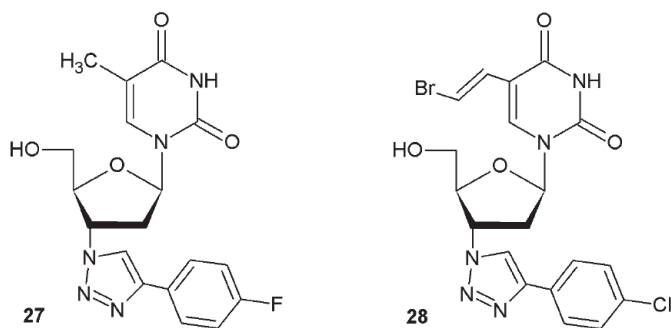


### 3. MODYFIKACJE CZĘŚCI CUKROWEJ KWASU NUKLEINOWEGO

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

#### 3.1. MODYFIKACJE CZĘŚCI CUKROWEJ W POZYCJI C3'

Bardzo popularną strategią przy wprowadzaniu modyfikacji w pozycji C3' furanozy jest wykorzystywanie komercyjnie dostępnej cząsteczki AZT jako substratu reakcji CuAAC [87]. Errikson wraz z zespołem otrzymał w ten sposób między innymi związek **27** (Rys. 8), będący inhibitorem kinazy tymidynowej 1 (TK1). Enzym ten odpowiedzialny jest za etap inicjujący replikację DNA, ograniczający szybkość całego procesu, w przypadku linii komórek rakowych ulega on nadmiernej ekspresji [96, 97].

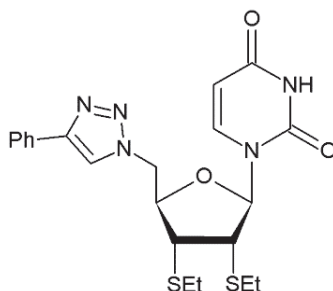


Rysunek 8. Struktury związków **27** i **28**  
Figure 8. Structures of compounds **27** and **28**

Van Celenbergh wraz z zespołem w podobny sposób otrzymał analogi nukleozydów z dodatkowym podstawnikiem 2-bromowinylovym w pozycji C5 zasady azotowej [88]. Przykładem jest związek **28** (Rys. 8), będący selektywnym inhibitorem kinazy tymidynowej 2 (TK2), należącej do grupy enzymów - kinaz deoksyrybonukleinowych (dNK) [98].

### 3.2. MODYFIKACJE CZĘŚCI CUKROWEJ W POZYCJI C5'

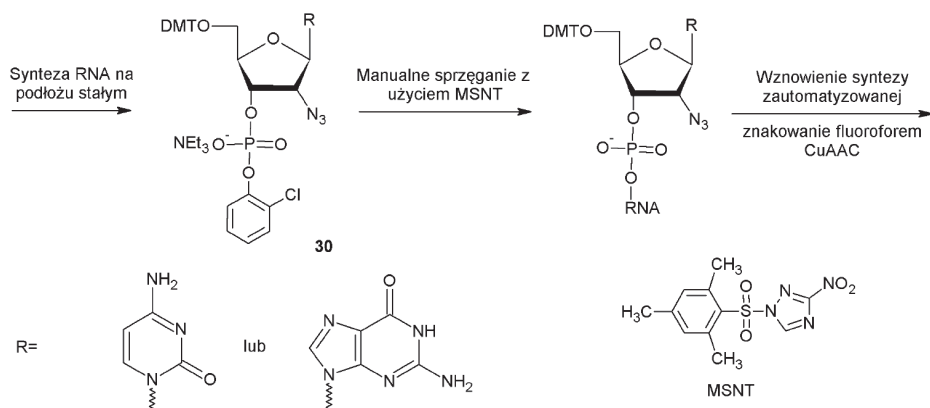
Analogi nukleozydów modyfikowane azydkiem lub alkinem w pozycji C5' rybozy mogą zostać przyłączone na końcu 5' syntetycznego oligonukleotydu. Daje to możliwość dalszej modyfikacji z użyciem reakcji CuAAC w celu polepszenia zdolności komplementarnej hybrydyzacji łańcucha, możliwości jego transportu czy potencjału cytotoksycznego [91]. Wu wraz z zespołem przebadali serię urydyn, tymidyn i cytydyn modyfikowanych triazolem w pozycji C5', pod kątem właściwości przeciwnowotworowych [89]. Związek **29** wykazał znaczną aktywność cytotoksyczną przeciwko trzem z czterech przebadanych linii komórek rakowych, przewyższając sześciokrotnie aktywność 5-fluorouracylu, będącego substancją porównawczą w badaniu (Rys. 9).



Rysunek 9. Analog urydyny **29**, modyfikowany w pozycji C5'  
Figure 9. Uridine analogue **29**, modified at C5' position

### 3.3. MODYFIKACJE CZĘŚCI CUKROWEJ W POZYCJI C2'

W przeciwieństwie do analogów nukleozydów modyfikowanych w pozycjach C3' i C5', związki modyfikowane w pozycji C2' mogą być włączone w dowolnej pozycji syntetycznego oligonukleotydu. Fauster wspólnie z innymi autorami opracowała analogi cytydyny i guanozyny modyfikowane w pozycji C2' grupą azydkową [93]. Problemem utrudniającym ich zastosowanie jest niekompatybilność azydków w technice amidofosforynowej syntezy oligonukleotydów (redukcja Staudingera) [99]. Dlatego w większości przypadków modyfikacji oligonukleotydu za pomocą reakcji CuAAC, wprowadza się do łańcucha nukleotydy zawierające podstawnik alkinowy. Można jednak włączyć diester **30** w określonej pozycji tworzonej nici oligonukleotydu techniką triestrową P(V), przy pomocy aktywatora MSNT (Schemat 8) [93, 100]. Kontynuowanie zautomatyzowanej syntezy z użyciem amidofosforynów nie wpłynęło negatywnie na wolną grupę azydkową w zmodyfikowanym nukleotydzie. Otrzymany w zautomatyzowanym procesie azydowany siRNA może zostać oznaczony fluoroforem. Taka strategia syntezy umożliwia uniwersalne znakowanie struktury DNA i RNA.



Schemat 8. Synteza RNA metodą amidofosforynową w obecności wolnej grupy azydkowej w pozycji C2' oraz struktura MSNT

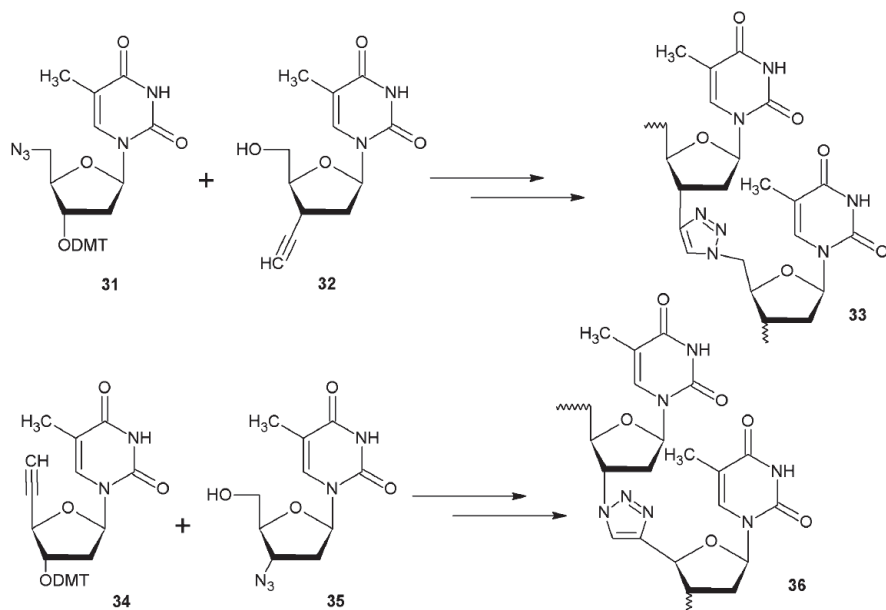
Scheme 8. RNA synthesis using phosphoramidite chemistry in the presence of free azide moiety at C2' position and structure of MSNT

#### 4. MODYFIKACJE SZKIELETU KWASU NUKLEINOWEGO

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

##### 4.1. MODYFIKACJE SZKIELETU DNA

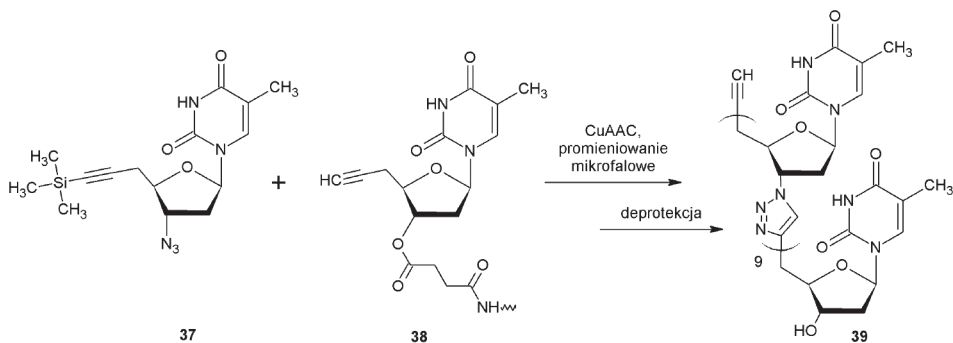
W ramach modyfikacji szkieletu DNA zamieniono naturalnie występujące połączenie fosfodiestrowe na układ triazolowy. Dondoni wspólnie z innymi autorami użył analogów nukleozydów **32** i **34** posiadających podstawnik alkinowy oraz analogów nukleozydów **31** i **35** z ugrupowaniem azydkowym; otrzymano dwa typy struktur DNA **33** i **36** o triazolowym szkielecie (Schemat 9). Otrzymane produkty różnią się liczbą atomów w zmodyfikowanym szkielecie. Otrzymano również modelową cząsteczkę trimeru składającego się z trzech nukleozydów tymidynowych połączonych ugrupowaniem triazolowym [103].



Schemat 9. Synteza analogu DNA z nienaturalnym triazolowym szkieletem

Scheme 9. Synthesis of DNA analogue with unnatural triazole backbone linkage

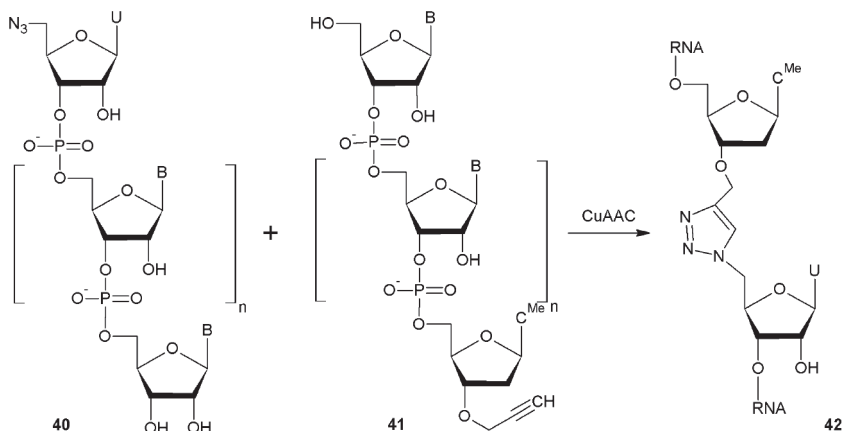
Koncepcja takiej modyfikacji szkieletu DNA została rozwinięta przez Isobe i jego zespół. Zaprojektowano i zsyntezowano nowy analog DNA połączonego układem triazolowym (<sup>TL</sup>DNA) wykorzystując reakcję CuAAC. Ten analog oligonukleotydu otrzymano selektywnie i z wysoką wydajnością, co powinno umożliwić przeprowadzenie reakcji w większej skali. Pochodna azydkowa **37** i alkinowa **38** przereagowały dając chronione oligomery, które w wyniku deprotekcji dały produkt **39** (Schemat 10). Otrzymany produkt może okazać się przydatny, z perspektywy badania struktury i aktywności biologicznej oligonukleotydów, z powodu sztywnego szkieletu bogatego w elektrony  $\pi$  co daje możliwość koordynacji metalu [104].

Schemat 10. Katalizowana promieniowaniem mikrofalowym synteza 10-meru analogu <sup>TL</sup>DNAScheme 10. Microwave assisted synthesis of 10-mer <sup>TL</sup>DNA analogue

Otrzymany w ten sposób analog oligonukleotydu jest rozpuszczalny w wodzie do stężenia 7  $\mu$ moli na litr, przy czym rozpuszczalność zwiększa się w obecności acetonitrylu. Temperatura topnienia dupleksu utworzonego przez produkt z nicią naturalnego komplementarnego DNA wynosi 61°C. Jest to wartość znacznie wyższa od temperatury topnienia (20°C) dupleksu utworzonego przez dwie naturalne nici DNA ( $dA_{10}$ ,  $dT_{10}$ ). Autorzy sugerują, że korzystny wpływ na trwałość otrzymanego dupleksu ma występująca w szkielecie analogu i powtarzająca się odległość sześciu wiązań pomiędzy łącznikami triazolowymi. Większa długość triazolowego fragmentu szkieletu, zdaje się destabilizować dwuniciową strukturę. Udało się również przeprowadzić zbieżną syntezę analogu oligonukleotydu o siedmiu i ośmiu jednostkach [105]. Odblokowanie pochodnej alkinowej chronionej układem silylowym i sprzęganie typu CuAAC dwóch oligomerów przeprowadzono w systemie „one pot”. Analogi nukleotydów tego typu będą mogły konkurować z kwasem peptydono-nukleinowym (PNA) jeśli zostanie opracowana metoda syntezy  $T^1$ DNA o mieszanej sekwencji, to znaczy oligomery będą zawierać wszystkie cztery zasady nukleinowe Watsona i Cricka w zadanej sekwencji.

#### 4.2. MODYFIKACJE SZKIELETU RNA

Podobnie jak w przypadku modyfikacji szkieletu DNA, badania nad RNA skupiają się na zamianie naturalnie występującego łącznika fosfodiesterowego na układ triazolowy. El-Sagheer i Brown przeprowadzili łączenie metodą „Click Chemistry” mniejszych polimerów rybo- i deoksyrybonukleotydowych sfunkcjonalizowanych podstawnikami alkinowymi lub azydkowymi. Tym samym, za pomocą reakcji CuAAC uzyskano analogiczny efekt jaki otrzymano by w reakcji z udziałem ligazy przy łączeniu DNA. W tych eksperymentach udało się otrzymać serie katalitycznie aktywnych RNA lub DNA:RNA złożonych struktur rybozymów typu Hairpin i Hammerhead o długości około 100 nukleotydów [33]. Hybryda **42** została utworzona w wyniku reakcji CuAAC pomiędzy terminalnymi alkinem i azydkiem, umieszczonymi na końcach 3' lub 5' wolnych nici DNA lub RNA (Schemat 11). W wyniku reakcji substratu **40** – 5'-azydourydyny z substratem **41** – 3'-propargilo-2'-deoksycytydyny, otrzymano modyfikowane rybozimy typu Hairpin i Hammerhead wykazujące aktywność względem cząsteczek docelowych. Właściwości te świadczą o potencjalnej kompatybilności oligonukleotydów o zmodyfikowanym przez triazol szkielecie z naturalnymi kwasami nukleinowymi i związkami o aktywności biologicznej.

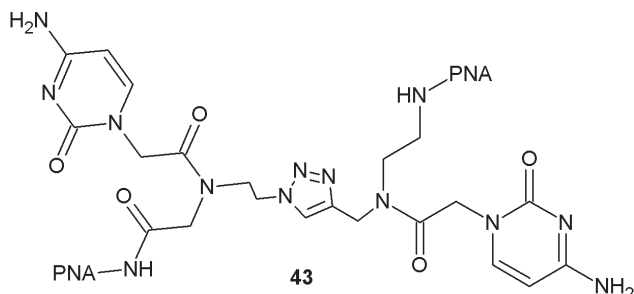


Schemat 11. Otrzymywanie hybryd DNA-RNA przy pomocy reakcji CuAAC

Scheme 11. DNA-RNA hybrids obtained with CuAAC reaction

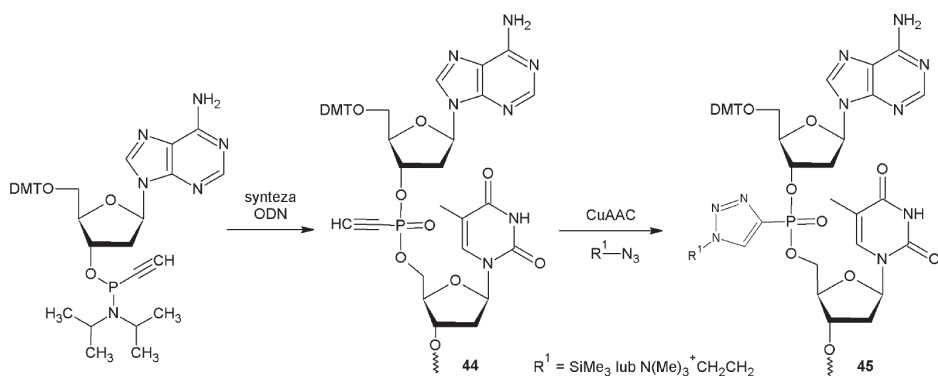
### 4.3. POZOSTAŁE MODYFIKACJE SZKIELETU KWASU NUKLEINOWEGO

Grupa badawcza Winssingera dokonała substytucji łącznika amidowego w kwasie peptydonukleinowym (PNA), przez łącznik triazolowy [106]. Oligomery PNA posiadające terminalną grupę azydkową zostały otrzymane w standardowej procedurze Fmoc [107], następnie przeprowadzono ich sprzężanie w reakcji CuAAC z różnymi monomerami alkinowymi. W głównym produkcie, dimerze **43**, modyfikacja w postaci łącznika triazolowego miała niewielki wpływ na zdolność hybrydyzacji modyfikowanej nici PNA i dokładność sekwencji syntetyzowanej nici (Rys. 10). Te wyniki wskazują, że grupa triazolowa jest odpowiednim zamiennikiem łącznika amidowego w PNA, co można wykorzystać do sprzężania struktur PNA w reakcji CuAAC.

Rysunek 10. Struktura PNA łączonego układem triazolowym **43**Figure 10. Structure of PNA linked with triazole moiety **43**

Krishna i Caruthers opracowali połączenie internukleotydu 1,2,3-triazolo-fosfonianowe (TP), w którym ugrupowanie 1,2,3-triazolowe związane jest przez

heterocykliczny atom węgla C4 z układem fosfonianowym [49]. Otrzymane połączenia 1,2,3-triazolofosfoniano-internukleotydy **45** są tworzone w procesie dwuetapowym. W pierwszym kroku wprowadzono połączenie internukleotydy zawierające ugrupowanie alkinowe **44**, wykorzystując klasyczną metodę amidofosforynową. W drugim etapie wykorzystano reakcję CuAAC z wybranymi azydami tworząc układ triazolowy, jeszcze przed odłączeniem syntetyzowanego oligonukleotydu od podłoża stałego (Schemat 12). W ten właśnie sposób udało się otrzymać chimery oligonukleotydy zbudowane z 16-23 merów, zawierające do sześciu modyfikacji 1,2,3-triazolofosfonianowych jak i innych modyfikacji [108]. Dalsze badania pozwoliły stwierdzić, że tak modyfikowane układy są wysoce odporne na działanie egzonukleaz, a stabilność dupleksów z RNA nie zmienia się znacznie. Fluorescencyjnie znakowany oligonukleotyd zbudowany z 16 zasad i dwóch połączeń typu 1,2,3-triazolofosfonianowego, został z sukcesem wychwycony przez komórki ssaka podczas transfekcji.



Schemat 12. Synteza łącznika internukleotydy 1,2,3-triazolofosfonianowego

Scheme 12. Synthesis of 1,2,3-triazolylphosphonate internucleotide linkage

## 5. BIOSPRZEŻENIA

Modyfikacje typu biosprzeżeń polegają na generowaniu połączeń pomiędzy cząsteczką oligonukleotydu i wybranymi strukturami biologicznymi. Takie połączenia zmieniają właściwości wyjściowego oligonukleotydu, przykładowo możliwe jest zwiększenie zdolności transportu syntetycznych oligonukleotydów do określonych komórek czy tkanek, poprzez przyłączenie do nich cząsteczek białek, lipidów czy cukrów. Z kolei fluorescencyjne znakowanie syntetycznych oligonukleotydów umożliwia nam śledzenie jaką funkcję sprawują i jak się zachowują w układach biologicznych [109, 110].

Dużym utrudnieniem jest niemożliwość stosowania katalizy jonami miedzi(I) w organizmach żywych z powodu ich toksyczności. Jony miedzi mogą powodować uszkodzenia DNA i RNA co ostatecznie prowadzi do przerwania ich nici [111].

Z tego powodu prowadzone są badania nad niekatalizowaną wersją reakcji. Dotychczasowe poszukiwania skupiają się wokół zastosowania nietoksycznych pochodnych cyklooktynu, które mogą ulegać reakcji SPAAC - katalityczny wpływ ma naprężenie struktury cyklooktynu i niepotrzebna jest obecność jonów miedzi(I) [112,113].

## UWAGI KOŃCOWE

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

## PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2001, **40**, 2004.
- [2] A. Padwa, W.H. Pearson, *Synthetic Applications Of 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry Toward Heterocycles And Natural Products*, Wiley, New York 2002.
- [3] F.S. Liang, A. Brik, Y.C. Lin, J.H. Elder, C.H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 1058.
- [4] I.M. Pastor, M. Yus, *Curr. Org. Chem.*, 2005, **9**, 1.
- [5] F. Amblard, J.H. Cho, R.F. Schinazi, *Chem. Rev.*, 2009, **109**, 4207.
- [6] H.C. Kolb, K.B. Sharpless, *Drug Discov. Today*, 2003, **8**, 1128.
- [7] M. Meldal, C.W. Tornøe, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 2952.
- [8] V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2002, **41**, 2596.
- [9] G. de Miguel, M. Wielopolski, D.I. Schuster, M.A. Fazio, O.P. Lee, C.K. Haley, A.L. Ortiz, L. Echegoyen, T. Clark, D.M. Guldi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 13036.
- [10] M. van Dijk, M.L. Nollet, P. Weijers, A.C. Dechesne, C.F. van Nostrum, W.E. Hennink, D.T.S. Rijkers, R.M.J. Liskamp, *Biomacromolecules*, 2008, **9**, 2834.
- [11] A.H. El-Sagheer, T. Brown, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 1388.
- [12] M. Dobkowski, M. Pieszko, M. Alenowicz, M. Wojciechowska, J. Ruczyński, P. Rekowski, P. Mucha, *Na Pograniczu Chemii i Biologii*, 2012, **XXIX**, 21.
- [13] M.V. Gil, M.J. Arevalo, O. Lopez, *Synthesis*, 2007, **11**, 1589.
- [14] L. Zhang, X. Chen, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, G. Jia, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 15998.
- [15] B.C. Boren, S. Narayan, L. Rasmussen, G. Jia, V.V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 8923.
- [16] I.S. Cho, J. Kim, D.H. Lim, H.C. Ahn, H. Kim, K.B. Lee, Y.S. Lee, *Biotechnol. Lett.*, 2008, **30**, 1901.
- [17] M.B. Miller, Y.W. Tang, *Clin. Microbiol. Rev.*, 2009, **22**, 611.
- [18] T.S. Seo, X.P. Bai, H. Ruparel, Z.M. Li, N.J. Turro, J.Y. Ju, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, **101**, 5488.



- [19] Y. Chevolut, C. Bouillon, S. Vidal, F. Morvan, A. Meyer, J.-P. Cloarec, A. Jochum, J.-P. Praly, J.-J. Vasseur, E. Souteyrand, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2007, **46**, 2398.
- [20] X. Liu, W. Farmerie, S. Schuster, W. Tan, *Anal. Biochem.*, 2000, **283**, 56.
- [21] K. Seio, Y. Takaku, K. Miyazaki, S. Kurohagi, Y. Masaki, A. Ohkubo, M. Sekine, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 2440.
- [22] J.G. Izant, H. Weintraub, *Cell*, 1984, **36**, 1007.
- [23] E. Uhlmann, A. Peyman, *Chem. Rev.*, 1990, **90**, 543.
- [24] D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Kotliansky, D.W.Y. Sah, *Nat. Chem. Biol.*, 2006, **2**, 711.
- [25] A. Fire, S.Q. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, C.C. Mello, *Nature*, 1998, **391**, 806.
- [26] J.K. Watts, G.F. Deleavey, M.J. Damha, *Drug Discov. Today*, 2008, **13**, 842.
- [27] R.S. Geary, S.P. Henry, L.R. Grillone, *Clin. Pharmacokinet.*, 2002, **41**, 255.
- [28] J.H. Huffman, R.W. Sidwell, G.P. Khare, J.T. Witkowski, L.B. Allen, R.K. Robins, *Antimicrob. Agents Ch.*, 1973, **3**, 235.
- [29] S.I. Kim, D. Shin, H. Lee, B.Y. Ahn, Y. Yoon, M. Kim, *J. Hepatol.*, 2009, **50**, 479.
- [30] S. Khaliq, S.A. Khaliq, M. Zahur, B. Ijaz, S. Jahan, M. Ansar, *Biotechnol. Adv.*, 2010, **28**, 27.
- [31] H. Elayadi, M. Smietana, C. Pannecouque, P. Leyssen, J. Neyts, J.-J. Vasseur, H.B. Lazrek, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 7365.
- [32] D.R. Corey, *J. Clin. Invest.*, 2007, **117**, 3615.
- [33] A.H. El-Sagheer, T. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, **107**, 15329.
- [34] M. Mascini, I. Palchetti, S. Tombelli, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2012, **51**, 1316.
- [35] K. Kaihatsu, B.A. Janowski, D.R. Corey, *Chem. Biol.*, 2004, **11**, 749.
- [36] T. Efthymiou, W. Gong, J.-P. Desaulniers, *Molecules*, 2012, **17**, 12665.
- [37] P.M.E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2008, **47**, 3442.
- [38] M.E. Ostergaard, D.C. Guenther, P. Kumar, B. Baral, L. Deobald, A.J. Paszczynski, P.K. Sharma, P.J. Hrdlicka, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 4929.
- [39] D.W. Dodd, K.N. Swanick, J.T. Price, A.L. Brazeau, M.J. Ferguson, N.D. Jones, R.H.E. Hudson, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 663.
- [40] F. Seela, S.A. Ingale, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 284.
- [41] H. Xiong, F. Seela, *Bioconjug. Chem.*, 2012, **23**, 1230.
- [42] A.H. El-Sagheer, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 2009, **28**, 315.
- [43] M.F. Jacobsen, J.B. Ravnsbaek, K.V. Gothelf, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 50.
- [44] F. Seela, H. Xiong, S. Budow, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 3930.
- [45] Y. Saito, V. Escuret, D. Durantel, F. Zoulim, R.F. Schinazi, L.A. Agrofoglio, *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, **11**, 3633.
- [46] K. El Akri, K. Bougrin, J. Balzarini, A. Faraj, R. Benhida, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, **17**, 6656.
- [47] X. Ming, F. Seela, *Chem. Eur. J.*, 2012, **18**, 9590.
- [48] Z. Xiong, X.-L. Qiu, Y. Huang, F.-L. Qing, *J. Fluorine Chem.*, 2011, **132**, 166.
- [49] H. Krishna, M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 11618.
- [50] H. Peacock, O. Maydanovych, P.A. Beal, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 1044.
- [51] E. Ohtsuka, M. Ikehara, D. Soll, *Nucleic Acids Res.*, 1982, **10**, 6553.
- [52] J.N. Wilson, E.T. Kool, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 4265.
- [53] A. Okamoto, Y. Saito, I. Saito, *J. Photoch. Photobio. C*, 2005, **6**, 108.
- [54] H. Addepalli, Meena; C.G. Peng, G. Wang, Y. Fan, K. Charisse, K.N. Jayaprakash, K.G. Rajeev, R.K. Pandey, G. Lavine, L. Zhang, K. Jahn-Hofmann, P. Hadwiger, M. Manoharan, M.A. Maier, *Nucleic Acids Res.*, 2010, **38**, 7320.
- [55] P. Ding, D. Wunnicke, H.-J. Steinhoff, F. Seela, *Chem. Eur. J.*, 2010, **16**, 14385.
- [56] C. Beyer, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 2230.
- [57] P. Chittepuri, V.R. Sirivolu, F. Seela, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 8427.

- [58] S.M. Park, H. Yang, S.-K. Park, H.M. Kim, B.H. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 5831.
- [59] A. Montagu, V. Roy, J. Balzarini, R. Snoeck, G. Andrei, L.A. Agrofoglio, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 778.
- [60] D.G. Streeter, J.T. Witkowski, G.P. Khare, R.W. Sidwell, R.J. Bauer, R.K. Robins, L.N. Simon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, **70**, 1174.
- [61] B.Yu, X. Zhao, L.J. Lee, R.J. Lee, *AAPS J.*, 2009, **11**, 195.
- [62] S.T. Crooke, *Basic Principles of Antisense Therapeutics*, Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 1998.
- [63] M.L. Stephenson, P.C. Zamecnik, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, **75**, 285.
- [64] G.F. Deleavey, M.J. Damha, *Chem. Biol.*, 2012, **19**, 937.
- [65] N.K. Andersen, H. Dossing, F. Jensen, B. Vester, P. Nielsen, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 6177.
- [66] A.J. Gutierrez, M.D. Matteucci, D. Grant, S. Matsumura, R.W. Wagner, B.C. Froehler, *Biochemistry*, 1997, **36**, 743.
- [67] P. Kumar, N. Chandak, P. Nielsen, P.K. Sharma, *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, **20**, 3843.
- [68] P. Kocalka, N.K. Andersen, F. Jensen, P. Nielsen, *ChemBioChem*, 2007, **8**, 2106.
- [69] M. Whiting, J. Muldoon, Y.C. Lin, S.M. Silverman, W. Lindstrom, A.J. Olson, H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, J.H. Elder, V.V. Fokin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2006, **45**, 1435.
- [70] M. Robbins, A. Judge, I. MacLachlan, *Oligonucleotides*, 2009, **19**, 89.
- [71] K.Y. Chang, A. Ramos, *FEBS J.*, 2005, **272**, 2109.
- [72] B. Tian, P.C. Bevilacqua, A. Diegelman-Parente, M.B. Mathews, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004, **5**, 1013.
- [73] H. Peacock, E. Fostvedt, P.A. Beal, *ACS Chem. Biol.*, 2010, **5**, 1115.
- [74] G. Qing, H. Xiong, F. Seela, T. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 15228.
- [75] M.N. Manalo, L.M. Perez, A. LiWang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 11298.
- [76] O. Schiemann, T.F. Prisner, *Q Rev. Biophys.*, 2007, **40**, 1.
- [77] N.G. Bushmakina, A.Y. Misharin, *Synthesis-Stuttgart*, 1986, **11**, 966.
- [78] H. Inoue, A. Imura, E. Ohtsuka, *Nippon Kagaku Kaishi*, 1987, 1214.
- [79] S. Kellner, S. Seidu-Larry, J. Burhenne, Y. Motorin, M. Helm, *Nucleic Acids Res.*, 2011, **39**, 7348.
- [80] M. Koszytkowska-Stawinska, E. Mironiuk-Puchalska, T. Rowicki, *Tetrahedron*, 2012, **68**, 214.
- [81] M. Ganesan, K.M. Muraleedharan, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 2010, **29**, 91.
- [82] R. Duschinsky, E. Plevin, C. Heidelberger, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 4559.
- [83] S.C. Mathew, Y. By, A. Berthault, M.-A. Virolleaud, L. Carrega, G. Chouraqui, L. Commeiras, J. Condo, M. Attolini, A. Gaudel-Siri, J. Ruf, J. Rodriguez, J.-L. Parrain, R. Guieu, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 3874.
- [84] M. Driowya, A. Puissant, G. Robert, P. Auberger, R. Benhida, K. Bougrin, *Ultrason. Sonochem.*, 2012, **19**, 1132.
- [85] A.S. Jorgensen, K.I. Shaikh, G. Enderlin, E. Ivarsen, S. Kumar, P. Nielsen, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 1381.
- [86] S.K. Singh, P. Nielsen, A.A. Koshkin, J. Wengel, *Chem. Commun.*, 1998, 455.
- [87] J. Lin, V. Roy, L. Wang, L. You, L.A. Agrofoglio, D. Deville-Bonne, T.R. McBrayer, S.J. Coats, R.F. Schinazi, S. Eriksson, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 3261.
- [88] S. Van Poecke, A. Negri, F. Gago, I. Van Daele, N. Solaroli, A. Karlsson, J. Balzarini, S. Van Calenbergh, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 2902.
- [89] J.-L. Yu, Q.-P. Wu, Q.-S. Zhang, X.-D. Xi, N.-N. Liu, Y.-Z. Li, Y.-H. Liu, H.-Q. Yin, *Eur. J. Med. Chem.*, 2010, **45**, 3219.
- [90] D. Baraniak, K. Kacprzak, L. Celewicz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**, 723.
- [91] T. Yamada, C.G. Peng, S. Matsuda, H. Addepalli, K.N. Jayaprakash, M.R. Alam, K. Mills, M.A. Maier, K. Charisse, M. Sekine, M. Manoharan, K.G. Rajeev, *J. Org. Chem.*, 2011, **76**, 1198.

- [92] V. Roy, A. Obikhod, H.-W. Zhang, S.J. Coats, B.D. Herman, N. Sluis-Cremer, L.A. Agrofoglio, R.F. Schinazi, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 2011, **30**, 264.
- [93] K. Fauster, M. Hartl, T. Santner, M. Aigner, C. Kreutz, K. Bister, E. Ennifar, R. Micura, *ACS Chem. Biol.*, 2012, **7**, 581.
- [94] O. Kaczmarek, H.A. Scheidt, A. Bunge, D. Foese, S. Karsten, A. Arbusova, D. Huster, J. Liebscher, *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, 1579.
- [95] S.P. Sau, P.J. Hrdlicka, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 5.
- [96] K. Johansson, S. Ramaswamy, C. Ljungcrantz, W. Knecht, J. Piskur, B. Munch-Petersen, S. Eriksson, H. Eklund, *Nat. Struct. Biol.*, 2001, **8**, 616.
- [97] M. Hallek, L. Wanders, S. Strohmeyer, B. Emmerich, *Ann. Hematol.*, 1992, **65**, 1.
- [98] S. Eriksson, B. Munch-Petersen, K. Johansson, H. Eklund, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002, **59**, 1327.
- [99] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta*, 1919, **2**, 635.
- [100] R. Micura, *Chem. Eur. J.* 1999, **5**, 2077.
- [101] M.H. Caruthers, *Accounts Chem. Res.* 1991, **24**, 278.
- [102] E. Paredes, S.R. Das, *ChemBioChem* 2011, **12**, 125.
- [103] A. Nuzzi, A. Massi, A. Dondoni, *QSAR Comb. Sci.* 2007, **26**, 1191.
- [104] H. Isobe, T. Fujino, N. Yamazaki, M. Guillot-Nieckowski, E. Nakamura, *Org. Lett.* 2008, **10**, 3729.
- [105] T. Fujino, N. Yamazaki, H. Isobe, *Tetrahedron Lett.* 2009, **50**, 4101.
- [106] D. Chouikhi, S. Barluenga, N. Winssinger, *Chem. Commun.* 2010, **46**, 5476.
- [107] S.A. Thomson, J.A. Josey, R. Cadilla, M.D. Gaul, C.F. Hassman, M.J. Luzzio, A.J. Pipe, K.L. Reed, D.J. Ricca, R.W. Wiethe, S.A. Noble, *Tetrahedron* 1995, **51**, 6179.
- [108] F. Eckstein, *J. Am. Chem. Soc.* 1966, **88**, 4292.
- [109] M. Sameiro, T. Goncalves, *Chem. Rev.* 2009, **109**, 190.
- [110] M.D. Best, *Biochemistry* 2009, **48**, 6571.
- [111] J.C. Jewett, C.R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* 2010, **39**, 1272.
- [112] P. van Delft, N.J. Meeuwenoord, S. Hoogendoorn, J. Dinkelaar, H.S. Overkleef, G.A. van der Marel, D.V. Filippov, *Org. Lett.* 2010, **12**, 5486.
- [113] K.N. Jayaprakash, C.G. Peng, D. Butler, J.P. Varghese, M.A. Maier, K.G. Rajeev, M. Manoharan, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 5410.

Praca wpłynęła do Redakcji 6 czerwca 2014

