

# WYKORZYSTANIE REAKCJI 1,3-DIPOLARNEJ CYKLOADDYCJI HUISGENA DO MODYFIKACJI NUKLEOZYDÓW I OLIGONUKLEOTYDÓW

## AN APPLICATION OF THE HUISGEN 1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION TO MODIFY NUKLEOSIDES AND OLIGONUCLEOTIDES

**E. Radzikowska**

*Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk,  
Zakład Chemii Bioorganicznej  
ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź  
e-mail: eradziko@bio.cbmm.lodz.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wstęp

1. Nukleozydy

1.1. Nukleozydy modyfikowane w obrębie nukleozasady

1.2. Nukleozydy modyfikowane w jednostce cukrowej

2. Biokoniugaty nukleozydów i oligonukleotydów

3. Oligonukleotydy

3.1. Pre- i postsymtetyczne modyfikacje DNA

3.2. 1,2,3-Triazol jako zamiennik wiązania internukleotydogo

3.3. 1,2,3-Triazol jako linker w syntezie na fazie stałej

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**mgr Ewa Radzikowska** – w roku 2007 ukończyła Wydział Chemii Uniwersytetu Łódzkiego i rozpoczęła pracę w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi. Jej obszar zainteresowań stanowi synteza oligonukleotydów i koniugatów oligonukleotydów z peptydami.

## ABSTRACT

The 1,3-dipolar cycloaddition reaction between azides and terminal alkynes, known as the Huisgen reaction, constitutes a powerful tool for the synthesis of versatile molecules containing carbon – heteroatom bond. The use of a copper(I) salt in this reaction allowed Sharpless to develop the concept of „click chemistry” [1]. This strategy is based on reactions between small units characterized by mild reaction conditions, versatility, high yields and stereospecificity.

The chemistry of nucleic acids and nucleoside analogues is undergoing rapid developments and numerous compounds from these classes of compounds are used in medicinal treatment. Analogues of nucleoside constitute a class of drugs that possesses either anticancer or/and antiviral activity (against HIV, HSV, VZV or HCV viruses) [3]. Many modified oligonucleotides show biological activity. As potential drugs oligonucleotides are employed in antisense, antigen and aptamer strategies. An antisense therapeutic agent acts on the pathogenic mRNA causing inactivation of the target whereas an antigen agent acts on DNA and aptamer on unwanted protein.

It is not surprising that number of research groups are trying to join the concept of click chemistry with nucleic acids chemistry. In this way, it is possible to obtain new molecules like base- or sugar-modified nucleosides, nucleosides, bioconjugates and oligonucleotides. The copper-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition CuAAC allows to functionalize DNA, for example by labelling it through attaching small molecules to DNA. Two general strategies have been developed for this purpose: presynthetic and postsynthetic labelling. In the presynthetic method nucleotide monomers are labelled before DNA synthesis and purification. In the postsynthetic strategy DNA containing small reactive groups is synthesized first and then it is conjugated with the desired molecules. CuAAC is also a convenient method for the synthesis of modified oligonucleotides in which phosphodiester linkage is replaced by 1,2,3-triazole or for a solid phase synthesis. Such molecules appear to be useful in medicine, molecular diagnostic (e.g. fluorescent dyes) or mechanistic molecular model in the future.

**Keywords:** 1,3-dipolar cycloaddition, analogues of nucleosides, „click chemistry”, synthesis of modified oligonucleotide, 1,2,3-triazole, bioconjugates

**Słowa kluczowe:** 1,3-dipolarna cykloaddycja, analogii nukleozydów, chemia „click”, synteza modyfikowanych oligonukleotydów, 1,2,3-triazol, biokoniugaty

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

|       |   |   |
|-------|---|---|
| CC    | – | <i>click chemistry</i>  |
| CuAAC | – | katalizowana miedzią reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji        |
| DMSO  | – | dimetylosulfotlenek   |
| DMF   | – | dimetyloformamid  |
| DIEA  | – | diizopropylodetyloamina   |
| DCM   | – | chlorek metylenu  |
| DMT   | – | grupa 4,4'-dimetoksytrytylowa [bis(4-metoksyfenylo)fenylometyl] |
| Cy5   | – | cyjanina  |
| TMS   | – | grupa trimetylosililowa   |
| MW    | – | promieniowanie mikrofalowe                                      |
| NBS   | – | <i>N</i> -bromoimid kwasu bursztynowego                         |
| TBDMS | – | eter <i>tert</i> -butylo-dimetylosililowy                       |
| HCV   | – | wirus zapalenia wątroby typu C                                  |
| cADPR | – | cykliczny adenozyndifosforan rybozy                             |
| HSV   | – | wirus opryszczki pospolitej                                     |
| VZV   | – | wirus ospy wietrznej i półpaśca                                 |
| HIV   | – | ludzki wirus zespołu nabytego braku odporności                  |
| HBV   | – | wirus zapalenia wątroby typu B                                  |
| FAM   | – | alkinylo-6-karboksyfluoresceina                                 |
| PCR   | – | reakcja łańcuchowa polimerazy                                   |
| BNCT  | – | terapia nowotworów metodą wychwytywania neutronów przez bor     |
| TB    | – | gruźlica  |
| GDP   | – | guanozyndifosforan  |
| TMV   | – | wirus mozaiki tytoniowej  |
| THF   | – | tetrahydrofuran   |
| TBTA  | – | tris[(1-benzylo-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)metylo]amina     |

## WSTĘP

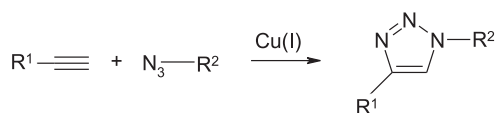
Prowadzone w latach 60. pionierskie prace Huisgena dotyczące reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydków do alkinów stanowią podstawę opracowanej w latach 90. przez Sharplessa koncepcji tzw. „click chemistry” [1]. Koncepcja ta oparta jest na tworzeniu nowej cząsteczki poprzez łączenie mniejszych jednostek za pomocą łącznika posiadającego w swoim szkielecie heteroatom (C–X–C). Tego typu podejście może mieć zastosowanie zarówno do syntezy na małą jak i dużą skalę. Sam pomysł, jakkolwiek ciekawy nie jest niczym nowym. Został on zaczerpnięty z „matki natury”, która do syntezy wielu znaczących biomolekuł wykorzystuje ograniczoną ilość stosunkowo prostych monomerów (np. amino kwasy tworzą białka, nukleotydy – kwasy nukleinowe itd.). Do reakcji typu CC należy zaliczyć reakcje, które charakteryzuje:

- modularność tj. produkty powinny się tworzyć na drodze łączenia się prostych podjednostek,
- wysoka wydajność procesu przebiegającego w łagodnych warunkach,
- tworzenie się nieszkodliwych produktów ubocznych, które powinny być wyeliminowane na drodze innej niż chromatograficzna (np. przez krystalizację czy destylację),
- stereospecyficzność (ale niekoniecznie enancjoselektywność),
- otrzymywanie dużych bibliotek związków,
- brak rozpuszczalnika lub zastosowanie innych łatwo usuwalnych mediów,
- łatwa dostępność substratów i reagentów,
- łatwa izolacja produktów,
- dogodny profil termodynamiczny.

Mając na uwadze powyższe kryteria do reakcji typu CC zaliczyć należy następujące transformacje chemiczne:

- cykloaddycję związków nienasyconych, w szczególności reakcje 1,3-dipolarnej cykloaddycji, ale także reakcje typu addycji Dielsa-Aldera,
- reakcje substytucji nukleofilowej, a zwłaszcza reakcje otwarcia pierścienia naprężonych elektrofilowych układów heterocyklicznych, takich jak: azyrydyny, epoksydy, cykliczne siarczany, jony episulfoniowe etc.,
- „nie-aldolowe” reakcje związków karbonylowych obejmujące tworzenie się karbamidów, tiomocznika, eterów oksymowych, aromatycznych heterocykli, hydrazonów, amidów, etc.,
- addycje do wielokrotnego wiązania węgiel-węgiel, szczególnie procesy oksydacyjne takie jak epoksydacja, niektóre warianty addycji Michaela, diuwodornienie (asymetryczne uwodornienie).

Jednakże w chwili obecnej termin „click chemistry” odnosi się praktycznie wyłącznie do katalizowanej miedzią reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena (CuAAC, ang. *copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*, Schemat 1) [2]. Pomimo tego swoistego ograniczenia reakcje typu CuAAC znalazły swoje trwałe miejsce w chemii kwasów nukleinowych stanowiąc użyteczne narzędzie do otrzymywania różnorodnych pochodnych tych biomolekuł.



*anti* 1,4-dipodstawiony 1,2,3-triazol

Schemat 1. Reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji pomiędzy azydkami, a alkinami

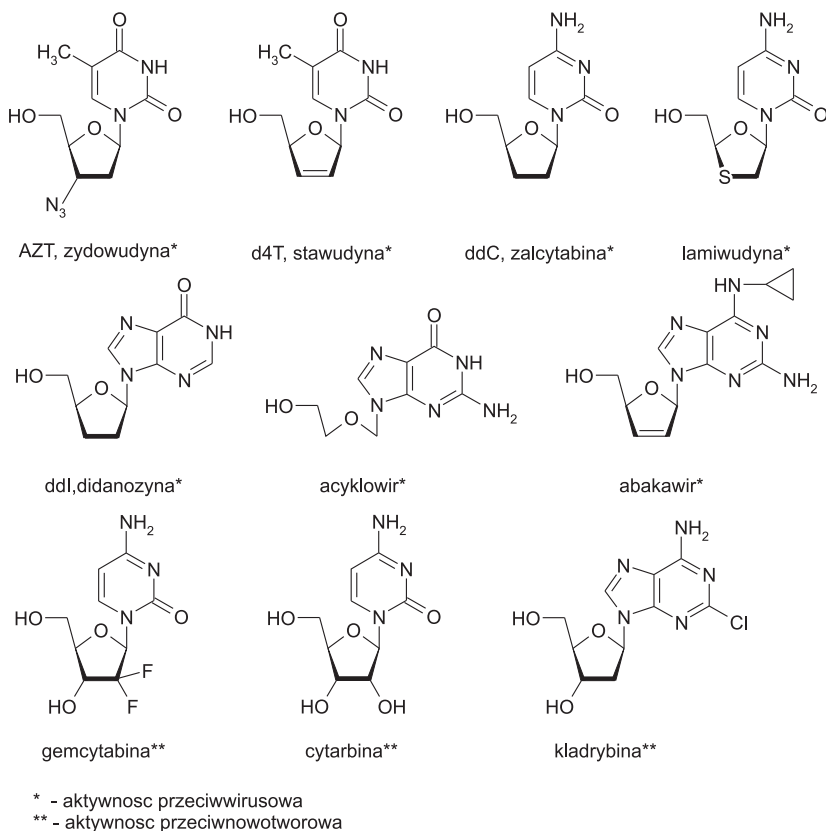
Scheme 1. 1,3-Dipolar cycloaddition between azides and alkynes

Celem niniejszego artykułu jest zaprezentowanie wybranych przykładów zastosowania reakcji CuAAC w chemii nukleozydów, nukleotydów i kwasów nukleinowych.

Jakkolwiek w *Wiadomościach Chemicznych* w 2005 roku ukazał się interesujący artykuł opisujący zastosowanie koncepcji „click chemistry” w różnych obszarach chemii z uwzględnieniem chemii medycznej i biologii molekularnej, to nie obejmował on zagadnień będących przedmiotem mojego opracowania.

## 1. NUKLEOZYDY

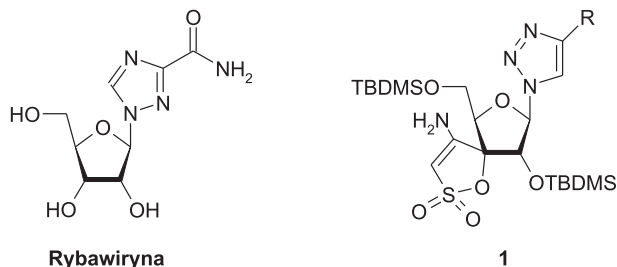
W chemii nukleozydów reakcja CuAAC pozwala na otrzymywanie pochodnych zawierających modyfikację zarówno w obrębie nukleozasady jak i reszty cukrowej, a także na uzyskiwanie biokoniugatów. Strukturalna różnorodność pochodnych nukleozydowych (Rys. 1) [3] wykazujących aktywność przeciwwirusową i przeciwnowotworową pozwala sądzić, że zastosowanie podejścia „click chemistry” umożliwi znalezienie nowych terapeutyków.



Rysunek 1. Analogii nukleozydów o właściwościach terapeutycznych  
 Figure 1. Therapeutic nucleoside analogues

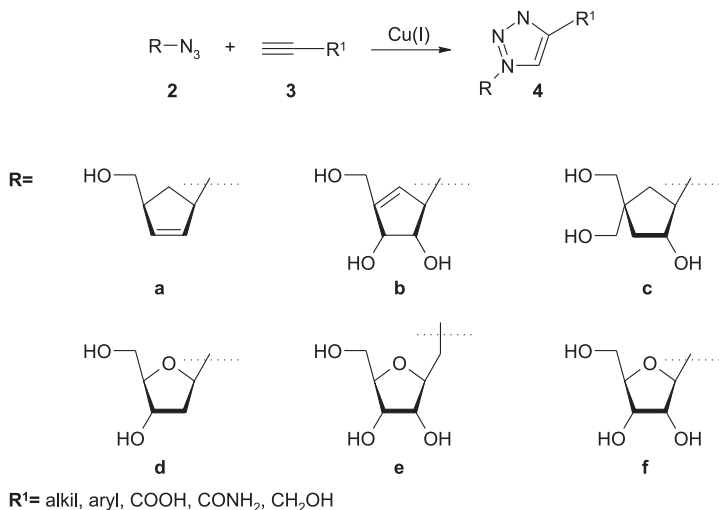
### 1.1. NUKLEOZYDY MODYFIKOWANE W OBRĘBIE NUKLEOZASADY

Zastosowanie reakcji CuAAC do syntezy analogów nukleozydów stało się szczególnie interesujące z chwilą odkrycia klinicznie użytecznych związków takich jak Rybawiryna [4] czy **1** (Rys. 2) [5].



Rysunek 2. Analogii nukleozydów posiadające pięciocłonową zasadę heterocykliczną  
 Figure 2. Nucleoside analogues with five membered heterocyclic base

Istotną cechą tych związków jest to, że posiadają one w miejscu zasady azotowej pierścień triazolowy, którego dogodną metodę syntezy stanowi właśnie 1,3-dipolarna cykloaddycja. W tym wypadku utworzenie pierścienia triazolowego najłatwiej przeprowadzić na drodze reakcji odpowiedniego  $\beta$ -1'-azydocukru **2** z różnego typu pochodnymi alkinowymi **3** (Schemat 2) [6].



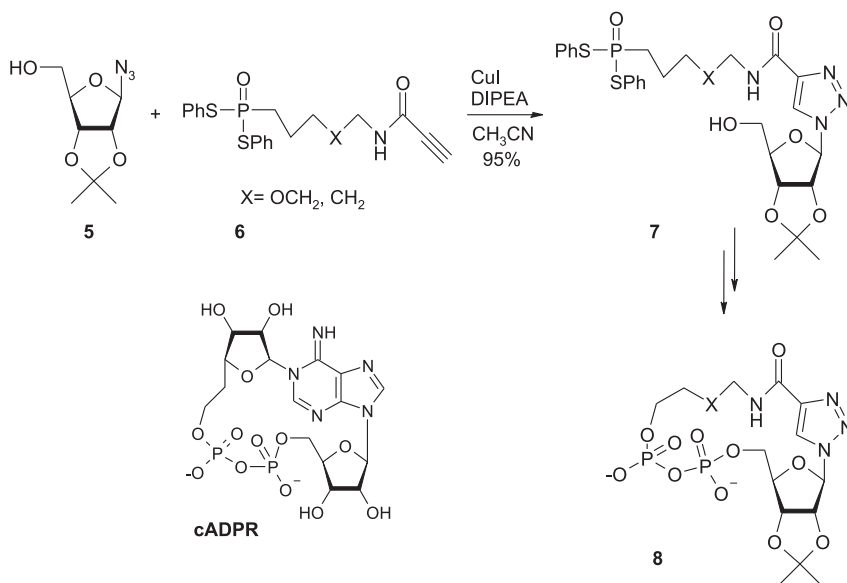
Schemat 2. Synteza modyfikowanych nukleozydów posiadających pierścień 1,2,3-triazolowy w miejscu zasady azotowej

Scheme 2. Synthesis of modified nucleosides bearing 1,2,3-triazole base

Tego typu podejście zastosował Li i współpracownicy [7] do syntezy związku **8** naśladującego cykliczny adenozynodifosforan rybozy (cADPR, Schemat 3). Związek **8** podobnie jak cADPR indukuje uwalnianie jonów Ca<sup>2+</sup> w ludzkich komórkach Jurkat T (nieśmiertelna linia komórkowa limfocytów T).

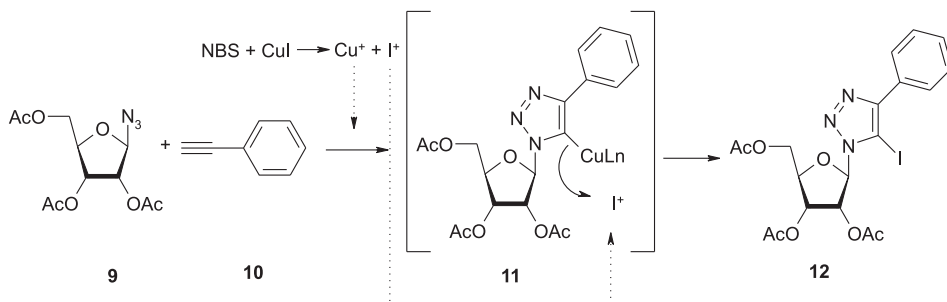
Ci sami autorzy opracowali tzw. „one pot” metodę otrzymywania 5-jodopodstawionych 1,2,3-triazoli [8]. Odpowiednie azydki **9** poddali reakcji z fenyloacetylenem (**10**) w obecności CuI i NBS. Tworzący się w trakcie procesu cykloaddycji związek przejściowy **11** o strukturze karboanionu był wychwytywany przez generowane *in situ* jony I<sup>+</sup> i Cu<sup>+</sup> (Schemat 4).





Schemat 3. Synteza związku 8 („naśladowcy” cyklicznego adenozyno-difosforanu rybozy)

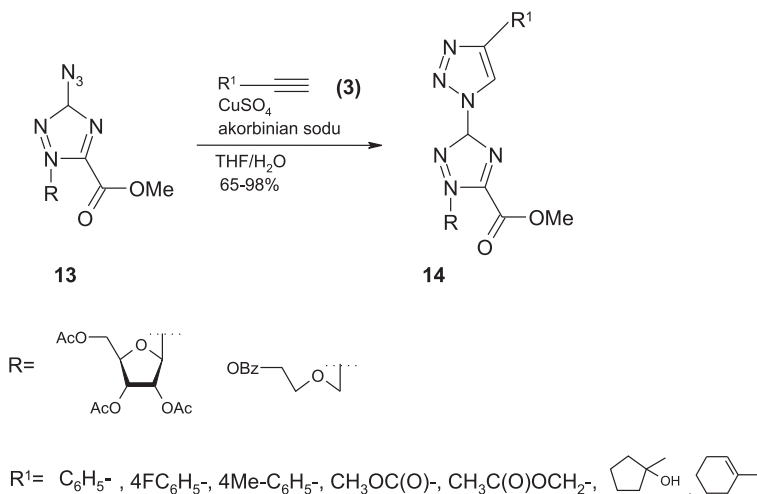
Scheme 3. Synthesis of 8 (the mimic of cyclic adenosine diphosphate-ribose)



Schemat 4. Prawdopodobny mechanizm tworzenia się związku 12

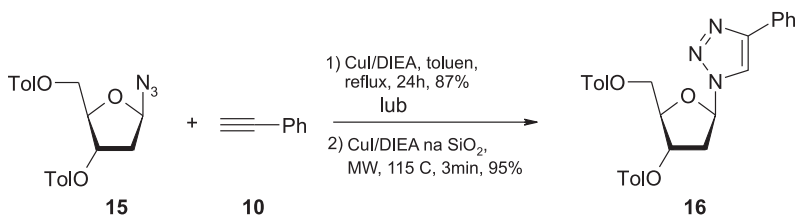
Scheme 4. Plausible mechanism of formation of compound 12

Podobnie Xia i współpracownicy, stosując cykloaddycję Huisgena, otrzymywali bis-triazoilo-nukleozydy **14** w reakcji związków **13** z pochodnymi alkinowymi wobec CuSO<sub>4</sub> i askorbinianu sodu (Schemat 5) [9]. Reakcje prowadzone były w mieszaninie wody i THF, a produkty uzyskiwano z dobrymi wydajnościami. Warto zaznaczyć, że bis-triazoilo-nukleozydy zsyntezowano pod kątem badania ich aktywności przeciw wirusowi mozaiki tytoniowej (TMV).



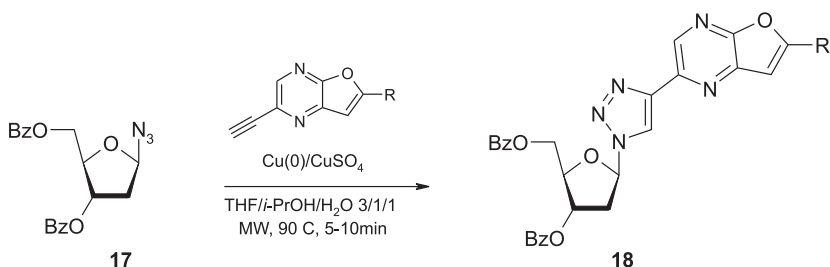
Schemat 5. Synteza bis-triazoilo nukleozydów  
Scheme 5. Synthesis of bis-triazolyl nucleosides

Zastosowanie w reakcji CuAAC promieniowania mikrofalowego (MW) pozwoliło w niektórych przypadkach znacząco skrócić czas trwania procesu. Guezguez zsyntezował związek **16** stosując zarówno klasyczną metodologię jak i wykorzystując promieniowanie mikrofalowe [10]. Tak zmodyfikowana procedura prowadziła do zmniejszenia czasu reakcji z 24 godzin do 3 minut (Schemat 6).

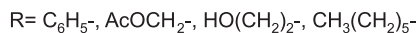
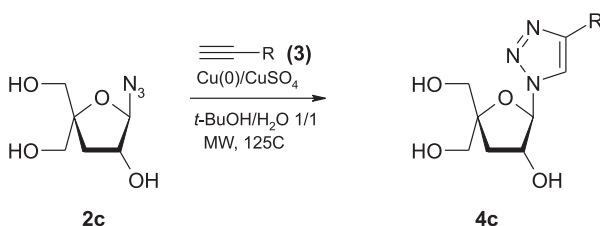


Schemat 6. Synteza analogów nukleozydów posiadających w szkieletcie układ 4-podstawiony 1,2,3-triazolowy  
Scheme 6. Synthesis of 4-substituted 1,2,3-triazolo nucleoside analogues

Podobnych obserwacji dokonali Ermolat'ev i Broggi w syntezach odpowiednio związków **18** (Schemat 7) [11] i **4c** (Schemat 8) [12].

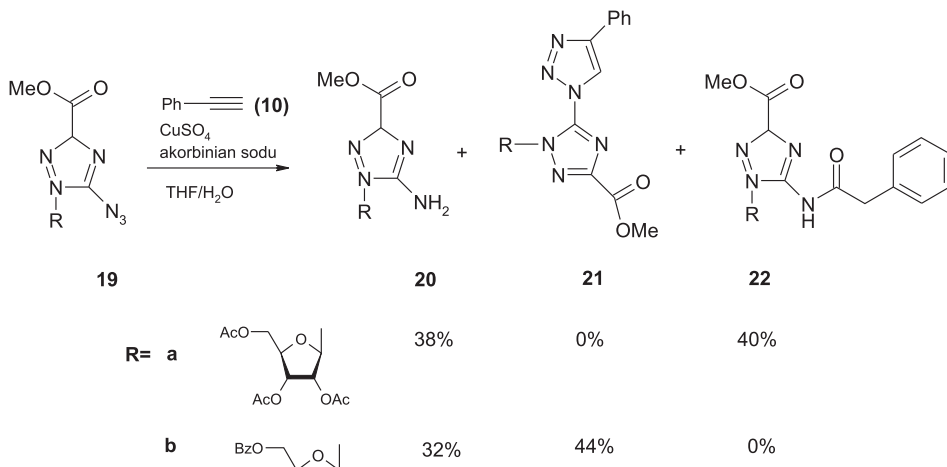


Schemat 7. Synteza 1,2,3-triazolowych analogów nukleozydów wspomagana promieniowaniem mikrofalowym  
 Scheme 7. Synthesis of 1,2,3-triazolo nucleoside analogues via microwave irradiation



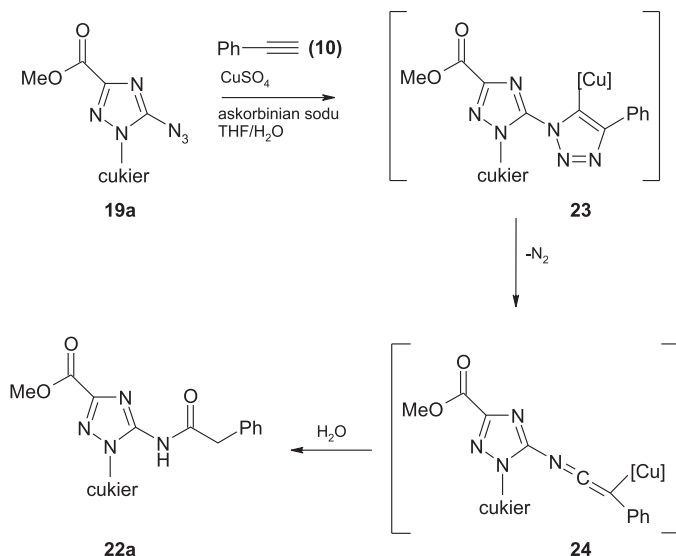
Schemat 8. Synteza 1,2,3-triazolowych analogów nukleozydów wspomagana promieniowaniem mikrofalowym  
 Scheme 8. Synthesis of 1,2,3-triazolo nucleoside analogues via microwave irradiation

Należy zaznaczyć, że w niektórych przypadkach reakcji CuAAC towarzyszyło tworzenie się nieoczekiwanych produktów ubocznych. Przykładem może być reakcja związku **19** z fenylacetylenem (**10**) (Schemat 9) [13].



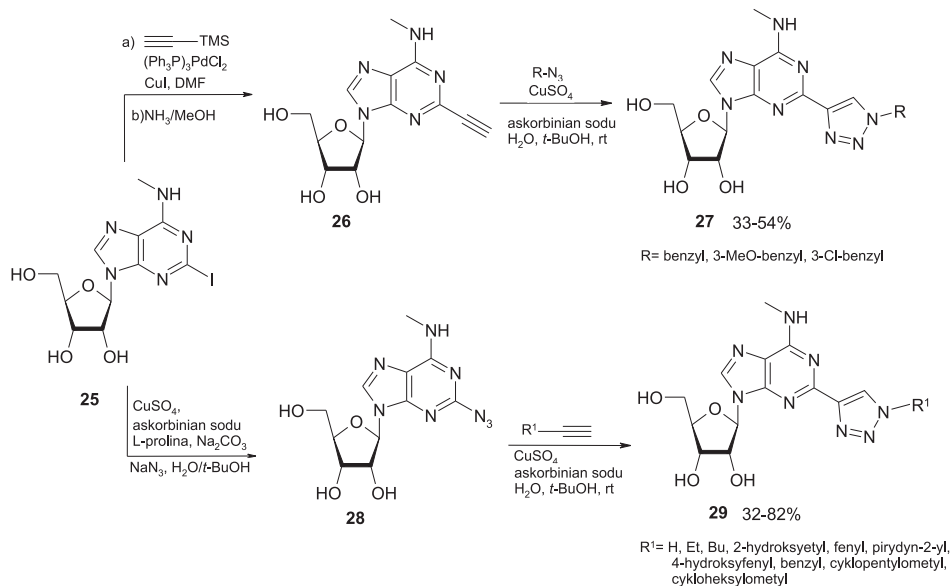
Schemat 9. Reaktywność azydo związków w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji CuAAC  
 Scheme 9. Reactivity of azido compounds in CuAAC reaction

W przypadku użycia arylowanej pochodnej cukrowej **19a** obserwowano wyłącznie tworzenie się produktów ubocznych tj. aminy **20a** i amidu **22a**. Natomiast nie powstawał pożądaný związek **21a**. Reakcja inaczej przebiegała dla pochodnej **19b** gdzie w przewodzie otrzymano związek **21b**, chociaż w mieszaninie reakcyjnej obecny był również będący produktem redukcji związek **20b**. Autorzy tłumaczyli tę zaskakującą reaktywność tym, że reszta cukrowa stanowi dostateczną zawadę przestrzenną, która czyni elektrono-ubogie heterocykle, posiadające grupę azydkową, niezdolnymi do reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji. Natomiast tworzenie związku **22a** zachodziło poprzez przejściową iminę **24** (Schemat 10).



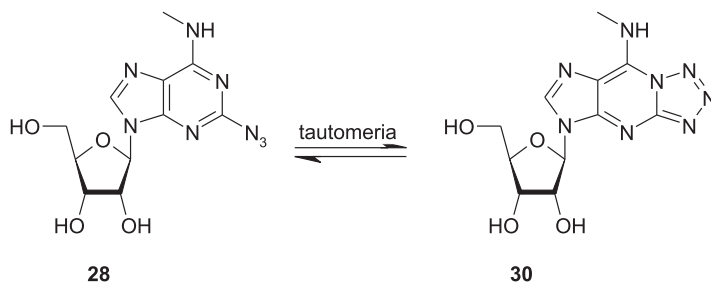
Schemat 10. Prawdopodobny mechanizm tworzenia się związku **22a**  
 Scheme 10. Plausible mechanism of preparation of compound **22a**

Jednakże inna grupa badaczy zademonstrowała, że reakcja CuAAC może również zachodzić z udziałem elektrono-ubogich pierścieni takich jak np. puryny. Cosyn i współpracownicy [14] zaprezentowali syntezę związków **27** i **29** wychodząc z pochodnej adenozyiny **25**, która na potrzeby reakcji CuAAC została zmodyfikowana w taki sposób, aby zawierała grupę azydkową lub alkinową w pozycji 2 nukleozasady. Grupa alkinowa w pochodnej **26** była wprowadzona w reakcji sprzęgania Sonogashiry natomiast grupa azydkowa w pochodnej **28** w reakcji substytucji nukleofilowej z  $\text{NaN}_3$  w obecności  $\text{Cu(I)}$  (Schemat 11).



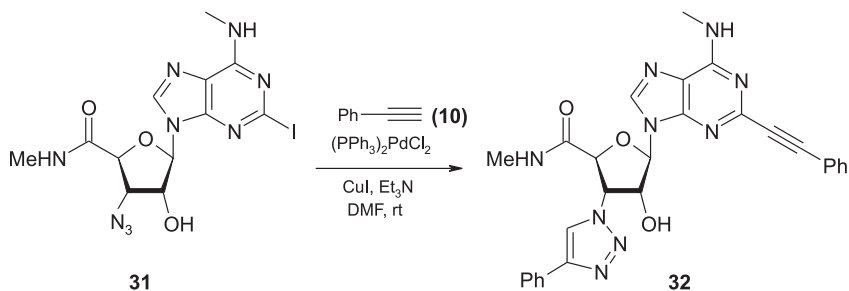
Schemat 11. Synteza 2-(1,2,3-triazoilo)-pochodnych adenozyiny  
Scheme 11. Synthesis of 2-(1,2,3-triazoly)adenosine derivatives

Uzyskane w niektórych przypadkach niskie wydajności docelowych związków **29** autorzy tłumaczyli tym, że tworzący się związek **28** występuje w równowadze tautomerycznej ze związkiem **30** (Schemat 12). Obserwacja ta pozostaje w zgodzie z faktem, że podstawione grupą azydkową  $\pi$ -elektronubogie heterocykle azotowe ulegają spontanicznej cyklizacji do odpowiednich skondensowanych triazoli [15].



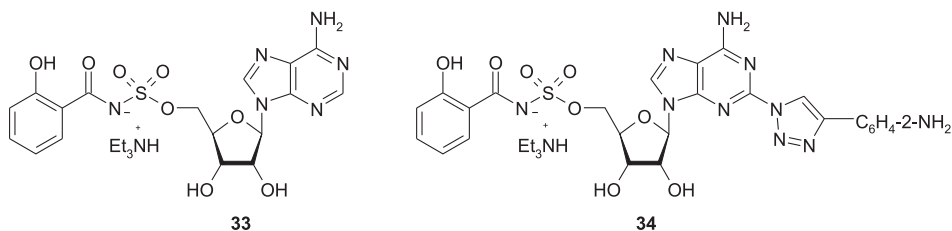
Schemat 12. Tautomeria azydo/tetrazolowa związku **28**  
Scheme 12. Azido/tetrazole tautomerism of compound **28**

Ten sam zespół wykazał, że zastosowanie warunków reakcji sprzęgania Sonogashira, w przypadku obecności w cząsteczce ugrupowania azydkowego w pozycji 3' reszty cukrowej (związek **31**), pozwala również na przebieg 1,3-dipolarnej cykloaddykcji Huisgena (Schemat 13) [16]. Źródłem miedzi w tym przypadku był CuI.



Schemat 13. Cykloadycja Huisgen'a indukowana w warunkach reakcji sprzęgania Sonogashira  
 Scheme 13. Huisgen cycloaddition induced by Sonogashira condition

Reakcja CuAAC była również wykorzystywana do poszukiwania nowych leków [17]. Związek **33** stanowiący tzw. strukturę wiodącą (*ang. lead compound*) został zmodyfikowany poprzez przyłączenie do węgla C-2 puryny 1,2,3-triazoli podstawionych w pozycji 4. Otrzymane w ten sposób związki **34** w granicach stężeń od submikromolarnych do mikromolarnych wykazywały własności przeciwgruźlicze (inhibitory enzymu katalizującego syntezę bakteryjnego chelatora żelaza).

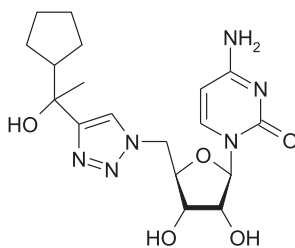


Rysunek 3. [N-(salicylo)sulfamoi]adenozyna i jej analog modyfikowany pierścieniem 1,2,3-triazolowym w pozycji C-2

Figure 3. [N-(salicyl)sulfamoyl]adensine and its analogue modified in the C-2 position with 4-substituted 1,2,3-triazole ring

## 1.2. NUKLEOZYDY MODYFIKOWANE W JEDNOSTCE CUKROWEJ

Reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji Huisgena katalizowana miedzią stanowi również dogodną metodę syntezy pochodnych nukleozydowych zawierających modyfikacje w obrębie pierścienia cukrowego. Na tej drodze otrzymano różnorodne pirymidynowe [18] i adenzynowe analogi [19] z wysoką regioselektywnością. Związek **35** będący pochodną cytydyny okazał się być inhibitorem  $\alpha$ -2,3-sialylotransferazy (Rys. 4) [20].

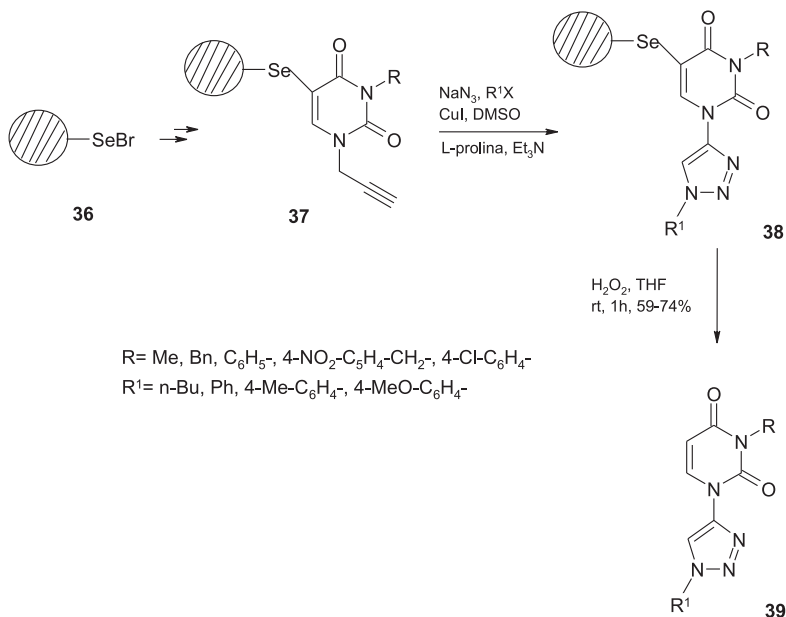


35

Rysunek 4. Inhibitor a-2-3-sialilotransferazy

Figure 4. Inhibitor of a-2-3-sialyltransferase

W ostatnim czasie wzrosło zainteresowanie analogami nukleozydów, w których pierścień furanozowy zastąpiony został przez resztę heterocykliczną. Jak pokazały liczne badania, związki tego typu mogą wykazywać zarówno przeciwwirusową jak i przeciwnowotworową aktywność. Spostrzeżenia te skłoniły Cao i współpracowników do otrzymania biblioteki analogów uracylu [21]. Reakcje CuAAC prowadzone były na fazie stałej z wykorzystaniem polimerowej żywicy (Schemat 14). Finalne produkty **39** były odcinane od złoża za pomocą  $H_2O_2$ .

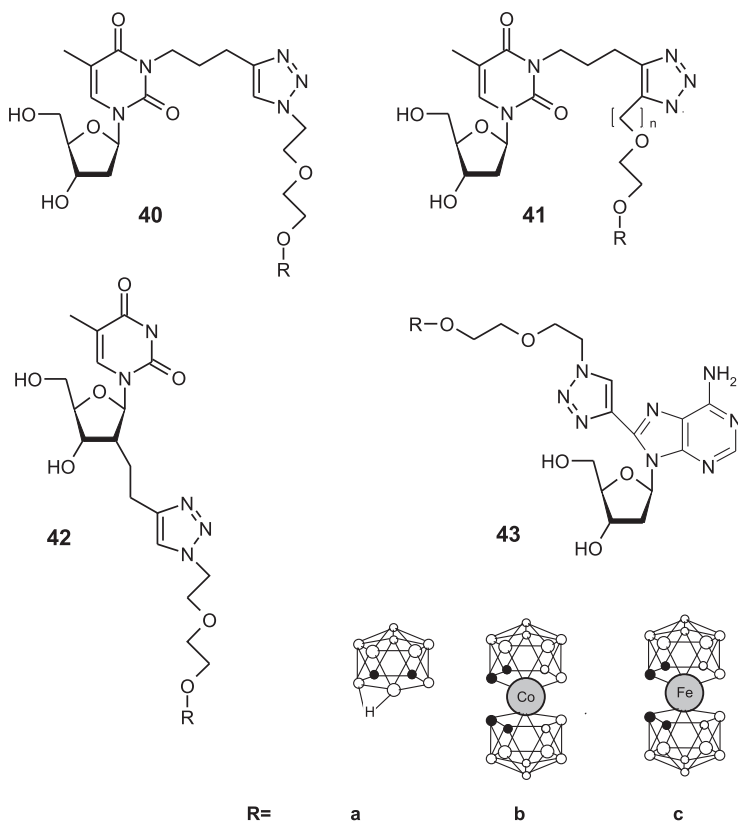


Schemat 14. Synteza na fazie stałej analogów nukleozydów modyfikowanych pierścieniem 1,2,3-triazolowym  
 Scheme 14. Solid-phase synthesis of nucleoside analogues modified with 1,2,3-triazole ring

## 2. BIONIUGATY NUKLEOZYDÓW I OLIGONUKLEOTYDÓW

Reakcje 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydków do alkinów znalazły również zastosowanie w syntezie bioniugatów. Prostota i skuteczność tej reakcji sprawia, że stała się ona atrakcyjną metodą tworzenia kowalencyjnego wiązania pomiędzy dwoma cząsteczkami w wyniku czego zostaje utworzona biocząsteczka o zwiększonym biopowinowactwie, zmienionej aktywności i hydrofobowości. Szeroko pojęta definicja bioniugacji obejmuje modyfikacje białek czy kwasów nukleinowych i polega na inkorporacji fluoroforów, ligandów, chelatów, radioizotopów, cząstek zwiększających powinowactwo względem celu, a także dotyczy fuzji dwóch białek czy połączenia kompleksu węglowodanu z peptydem. Siła bioniugacji tkwi w możliwości znakowania *in vivo*.

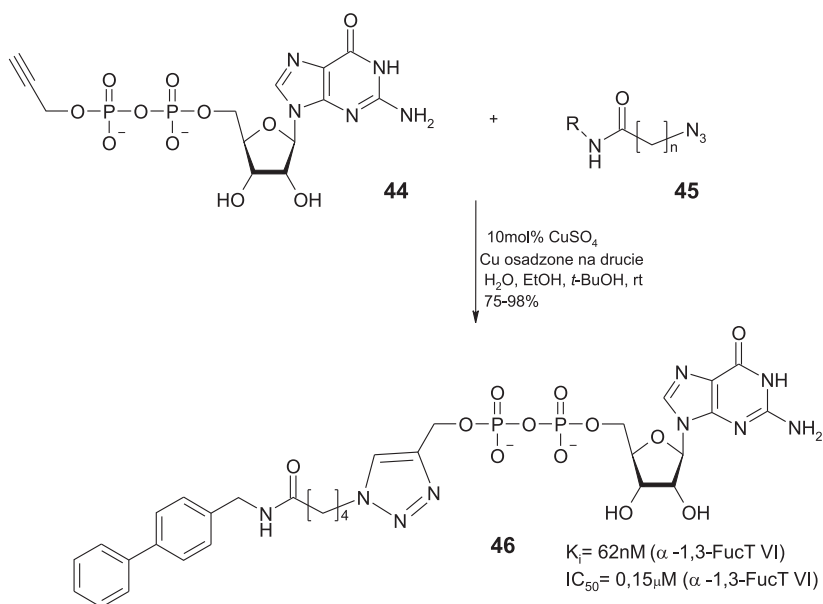
Dzięki zastosowaniu reakcji CuAAC w zespole Leśnikowskiego przeprowadzono syntezę koniugatów pirymidynowych i purynowych zawierających kompleksy karboranowe **40–43a** i metalokarboranowe **40–43b,c** [22] (Rys. 5). Związki tego typu mogą znaleźć zastosowanie jako źródło boru w terapii BNCT (*ang. Boron Neutron Capture Therapy*) nowotworów.



Rysunek 5. Koniugaty nukleozydów zawierające kompleksy karboranowe i metalokarboranowe  
 Figure 5. Nucleoside conjugates containing carborane and metalocarborane complexes



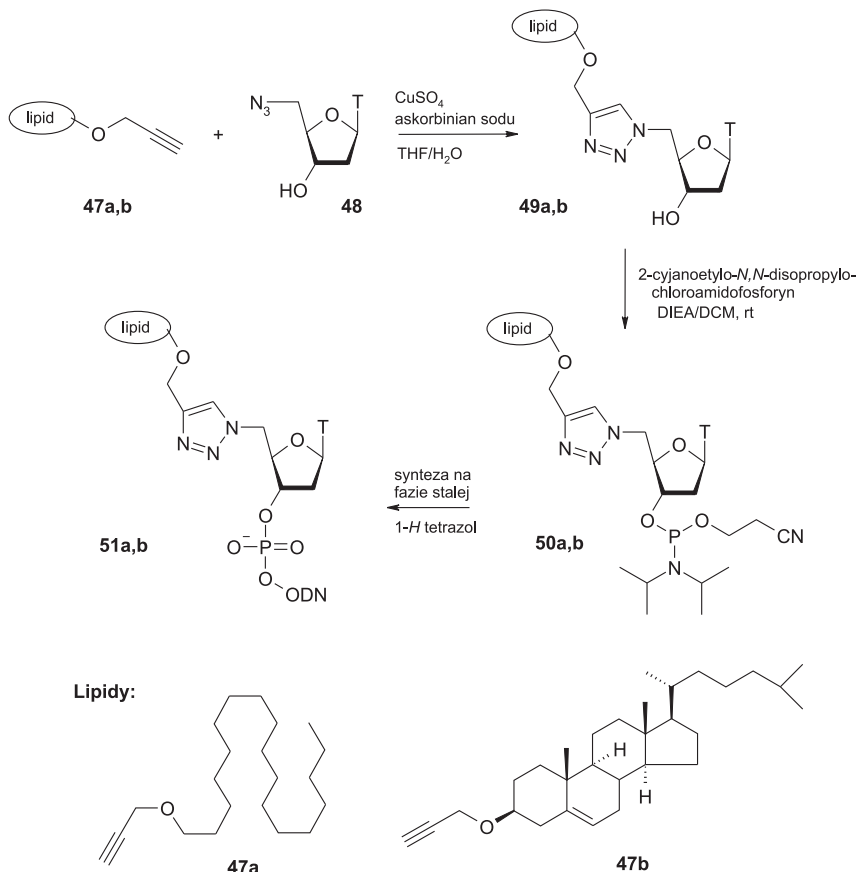
Innym przykładem syntezy potencjalnego leku w oparciu o reakcję tworzenia triazoli z azydków i alkinów jest wyselekcjonowanie inhibitora fukozylotransferazy – enzymu odpowiedzialnego za katalizę finalnego etapu glikozylacji w procesie biosyntezy i ekspresji wielu ważnych sacharydów. Glikoproteiny i glikolipidy występujące na powierzchni komórki (składnik błon komórkowych i wielu receptorów powierzchniowych), pośredniczą w szeregu procesów związanych z rozpoznawaniem komórkowym, embriogenezą, odpowiedzią immunologiczną i metastazą. Lee i współpracownicy z biblioteki związków wytworzonych przy pomocy CuAAC zidentyfikowali nanomolarny inhibitor fukozylotransferazy [23]. Autorzy łącząc ze sobą acetylowe pochodne GDP **44** z azydkami **45** (Schemat 15) otrzymali w ten sposób 85 związków, które poddali screeningowi bezpośrednio z mieszaniny reakcyjnej. Najlepszym inhibitorem okazał się związek **46**.



Schemat 15. Synteza potencjalnych inhibitorów fukozylotransferazy w reakcji CuAAC  
 Scheme 15. Synthesis of potential inhibitors of fucosyl-transferases by CuAAC reaction

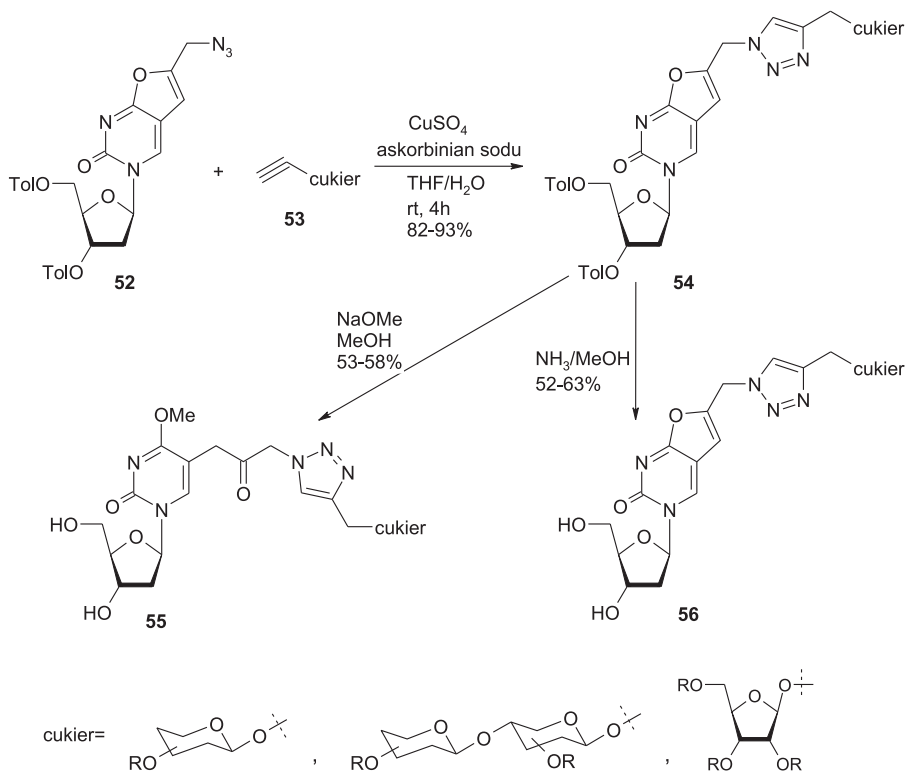
Otrzymanie lipidowych koniugatów oligonukleotydów jako potencjalnych inhibitorów procesu translacji wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) stanowi inny ciekawy przykład wykorzystania „click chemistry”. Alkino-modyfikowane lipidy będące pochodnymi cholesterolu **47a** i oktadekanolu **47b** poddawano reakcji z 5'-azydo-5'-deoksytymidyną **48** w obecności askorbinianu sodu i katalitycznych ilości siarczynu miedzi(I) (Schemat 16). Uzyskane w ten sposób związki **49a** i **49b** zostały w kolejnym kroku przekształcone w amidofosforiny **50a,b**. Następnie związki te były sprzęgane z przyczepionym do fazy stałej łańcuchem oligonukleotydowym będącym 17-merowym, 2'-*O*-metylorybonukleotydem antysensowym wiążącym się

specyficznie na 5'-końcu wirusowego RNA [24]. Modyfikacja lipidowa, co potwierdziły badania, znacząco zwiększyła lipofilowość użytych oligonukleotydów.



Schemat 16. Synteza koniugatów lipid-oligonukleotyd  
Scheme 16. Synthesis of lipid-oligonucleotide conjugates

Innym również interesującym przykładem wykorzystania reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji do poszukiwania związków o potencjalnej aktywności biologicznej, są badania Jina i współpracowników dotyczące projektowania leków przeciw wirusowi ospy wietrznej i półpaśca (VZV) [25]. W celu polepszenia rozpuszczalności i rozpoznania molekularnego aktywnych bicyklicznych furo[2,3-d]pirymidyno nukleozydów autorzy otrzymali serię koniugatów węglowodanów z analogami tymidyny. W wyniku reakcji związku **52** z propargilowymi pochodnymi cukrowymi **53**, w obecności  $\text{CuSO}_4$  i askorbinianu sodu, otrzymano odpowiednie 1,4-dipodstawione 1,2,3-triazole **54** (Schemat 17). Związki te w następnym kroku były przekształcane za pomocą metanolanu sodu w formy otwarte ketonów **55** lub w struktury zamknięte **56** w przypadku zastosowania metanolowego roztworu amoniaku. Związki **55** i **56** są obecnie poddane badaniom biologicznym.



Schemat 17. Synteza koniugatów węglowodanów z pochodnymi tymidyny  
 Scheme 17. Synthesis of carbohydrate-thymidine analogue conjugates

### 3. OLIGONUKLEOTYDY

#### 3.1. PRE- I POSTSYNTETYCZNE MODYFIKACJE DNA

Znane są także liczne prace dotyczące wykorzystania reakcji CuAAC do otrzymywania znakowanego DNA, które między innymi mogłyby znaleźć zastosowanie jako sondy molekularne czy znaczniki fluorescencyjne. Do znakowania oligonukleotydów wykorzystywana jest strategia presyntetyczna lub postsyntetyczna [26].

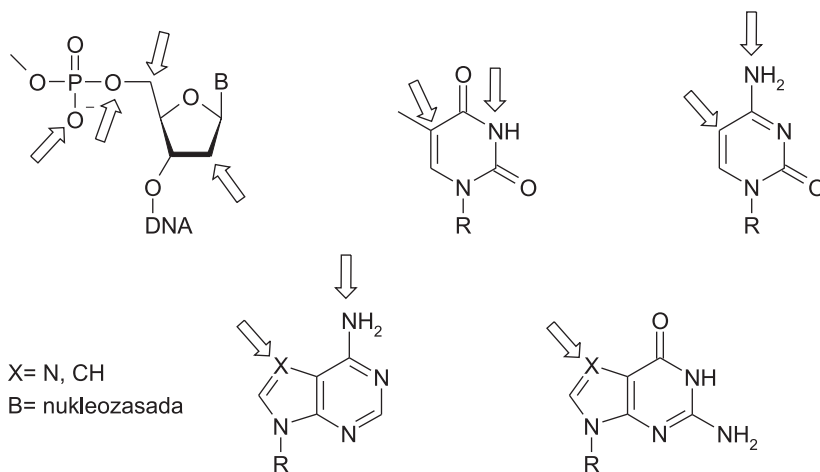
Pierwsza z nich obejmuje znakowanie monomerów nukleotydowych używanych do syntezy DNA za pomocą standardowo stosowanej metody amidofosforynowej. Stąd też wynika konieczność uzyskania odpowiednio zmodyfikowanego amidofosforynu, który musi być stabilny w warunkach prowadzenia reakcji na fazie stałej (warunki zasadowe, kwasowe, utleniające). Ponadto atom fosforu(III) w amidofosforynowym ugrupowaniu, który jest wrażliwy na utlenienie do fosforu(V), musi być stabilny w obecności znacznika. Alternatywną drogą presyntetycznej strategii jest

stosowanie wyznakowanych trójfosforanów, które są włączane do łańcucha DNA przez polimerazę w reakcji PCR. Ograniczeniem tej metodologii jest konieczność stosowania tylko takich modyfikacji, które są substratami dla polimerazy.

W strategii postsyntetycznej wprowadza się małe grupy reaktywne do DNA, które następnie są sprzęgane ze znacznikiem po zakończeniu procesu syntezy i deprotekcji DNA. Najczęściej stosuje się grupy aminowe, które później reagują z aktywnymi grupami estrowymi znacznika. Wadą tego podejścia jest niska wydajność sprzęgania i konieczność oczyszczania DNA techniką HPLC, co sprawia, że tworzenie znakowanych w ten sposób oligonukleotydów staje się bardzo kosztowne.

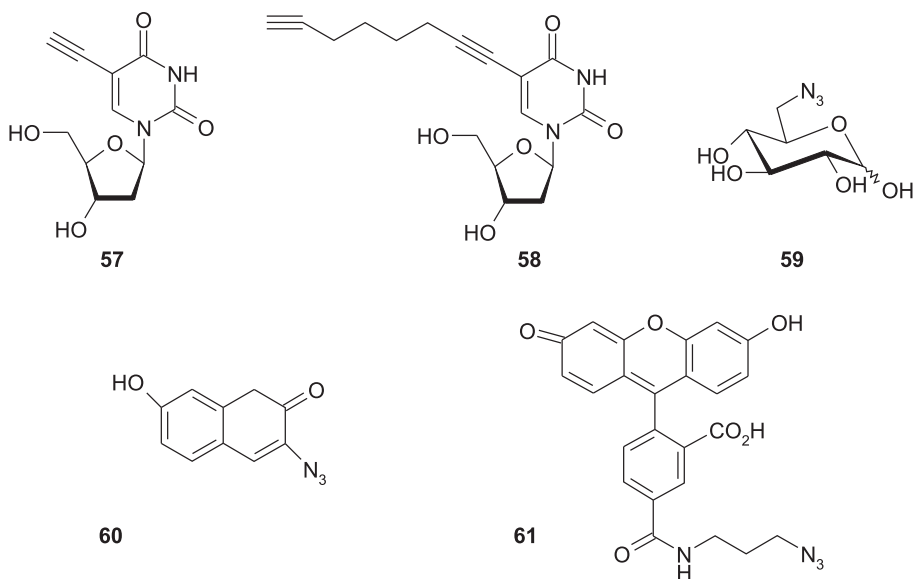
Zalety reakcji typu „click chemistry” w syntezie modyfikowanych oligonukleotydów to:

- wysoka wydajność,
- łagodne warunki prowadzenia syntezy,
- szerokie spektrum miejsc (zarówno w nukleozasadach, reszcie cukrowej i fosforanowej) pozwalających na przyłączenie grupy azydkowej i alkinylowej do DNA (Rys. 6).



Rysunek 6. Możliwe miejsca przyłączenia grupy azydkowej lub alkinowej do DNA  
Rysunek 6. Possible position for modification of DNA by attachment of azides or alkynes

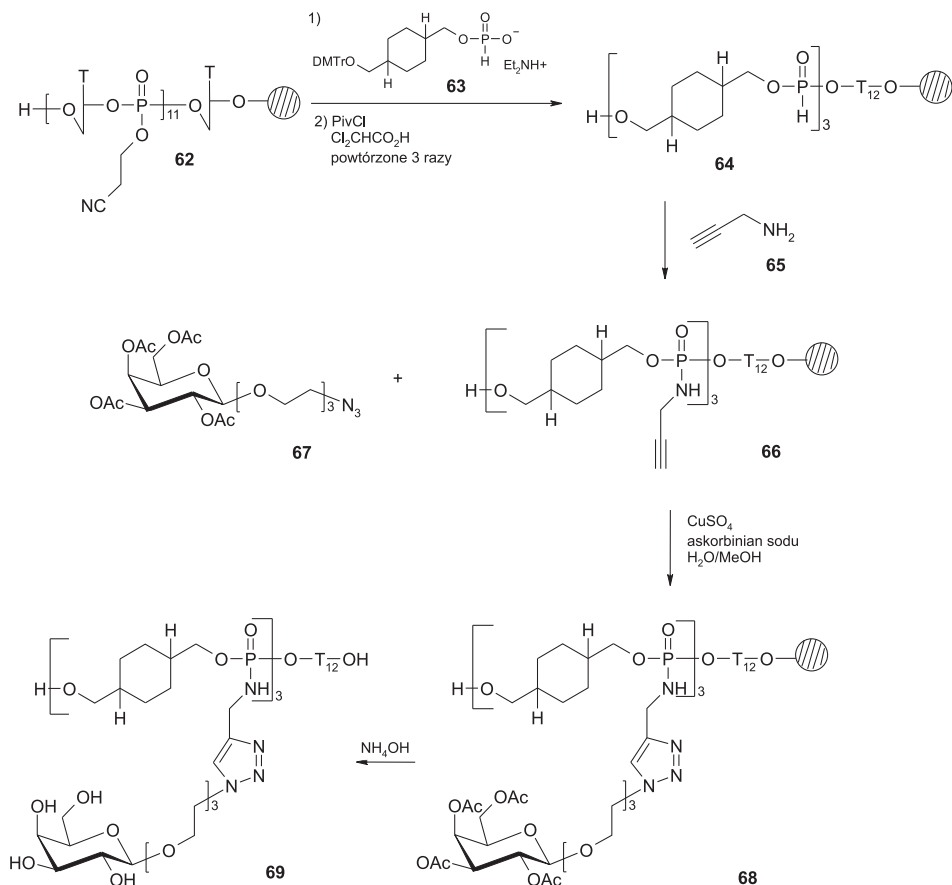
Gierlich i współpracownicy zastosowali CC do postsyntetycznej modyfikacji otrzymanego metodą amidofosforynową DNA zawierającego zmodyfikowane pochodne urydyny **57** i **58** (Rys. 7) [27]. Azydki **59–61** zostały wybrane ze względu na to, że mogą one stanowić potencjalne znaczniki molekularne.



Rysunek 7. Alkiny modyfikowane pochodne urydyny i azydu o potencjalnym zastosowaniu jako znaczniki molekularne

Figure 7. Alkyne modified uridine nucleosides and azides as potential molecular labels

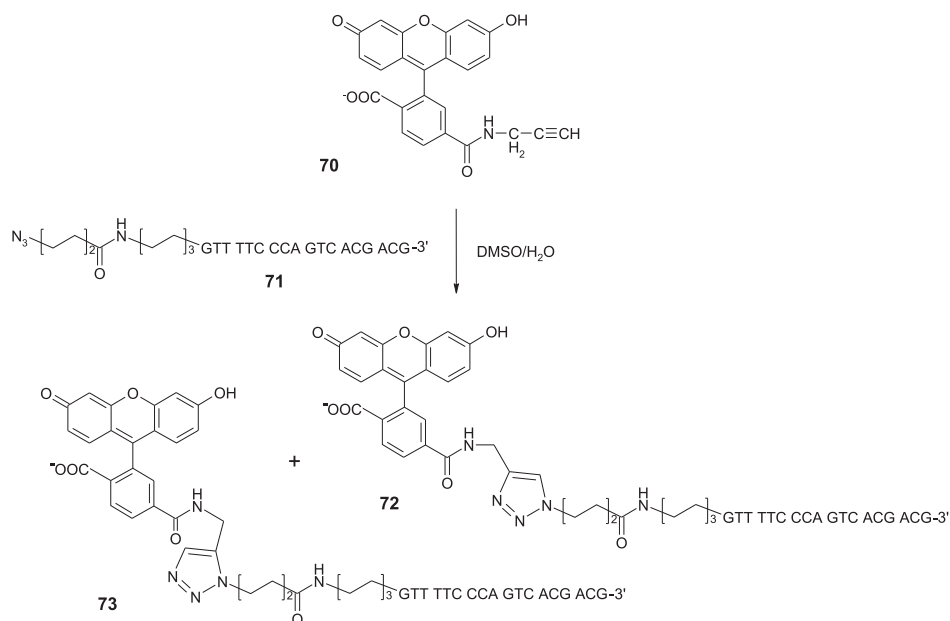
Bouillon i współpracownicy zaprezentowali dogodną syntezę wielokrotnie znakowanych oligonukleotydów opartą na wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym reakcji CuAAC [28]. Autorzy zastosowali w tym przypadku cykloaddycję do przyłączenia reszt węglowodanowych do szkieletu oligonukleotydowego (Schemat 18). Pierwszy etap syntezy polegał na otrzymaniu za pomocą metody amidofosforynowej przyłączonego do złoza dodekameru tymidynowego **62**. Następnie wprowadzono linker w skład którego wchodziły trzy ugrupowania H-fosfoniodiestrowe. Oksydatywne aminowanie otrzymanego związku **64** z użyciem  $\text{CCl}_4$  wobec propargiloaminy **65** prowadziło do związku **66**, który w następnym etapie poddawano reakcji cykloaddykcji ze związkiem **67** w obecności  $\text{CuSO}_4$  i askorbinianu sodu. Amonoliza otrzymanego w ten sposób związku **68** dawała finalny produkt **69**.



Schemat 18. Synteza na fazie stałej oligonukleotydów z przyłączonymi resztami cukrowym w reakcji CuAAC wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym

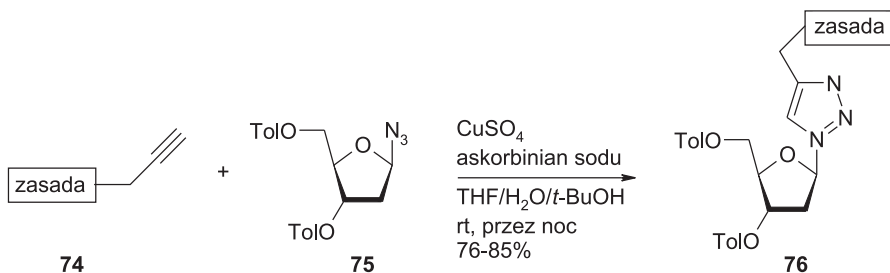
Scheme 18. Solid-phase synthesis of oligonucleotides with attached carbohydrate residues in CuAAC reaction via microwave activation

Reakcję 1,3-dipolarną cykloaddycji, pomiędzy alkiyno-6-karboksyfluoresceiną (FAM) **70** i zawierającą ugrupowanie azydkowe pojedynczą nicią DNA (**71**), zastosowano do syntezy fluorescencyjnych oligonukleotydów **72** i **73** (Schemat 19) [29]. Prowadząc reakcję CuAAC w środowisku wodnym otrzymano pożądane produkty z ilościową wydajnością. Znakowany w ten sposób DNA posłużył następnie jako primer w reakcji Sangera.



Schemat 19. Synteza znakowanych DNA **72** i **73** w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddykcji  
 Scheme 19. Synthesis of FAM-labeled DNAs **72** and **73** by 1,3-dipolar cycloaddition

Wzrastająca liczba otrzymanych struktur krystalicznych różnorodnych kompleksów enzym–substrat pokazała, że w enzymach istnieje wiele miejsc aktywnych, które są bardziej „elastyczne” niż wcześniej uważano. Konsekwencją tej „elastyczności” jest to, że pojedynczy enzym akceptuje szersze spektrum substratów. Z tego powodu metoda projektowania leków w oparciu o strukturę miejsca katalitycznego często bywa mało efektywna, a znaleziona struktura pomimo bardzo dobrego dopasowania przestrzennego okazuje się być słabym inhibitorem enzymu. Rozwiązaniem tego problemu może okazać się zastosowanie tak zwanych „fleximerów” tj. nukleozydów modyfikowanych w taki sposób, że nukleozasada zostaje oddzielona od reszty cukrowej poprzez wprowadzenie dodatkowego ugrupowania. Dzięki takiej modyfikacji pierścień purynowy umocowany jest bardziej „elastycznie”, a tym samym łatwiej dopasowuje się do miejsca aktywnego, przy czym związek nadal zachowuje cechy typowego nukleozydu. Obszerne badania w tej dziedzinie przeprowadziła grupa Chitpeua [30], która opracowała syntezę nowych 1,2,3-triazolowych analogów nukleozydów **76** stosując reakcję 1,3-dipolarnej cykloaddykcji pomiędzy nukleozasadą **74** posiadającą grupę alkinową, a azydową pochodną cukrową **75** (Schemat 20). Następnie związki **76** przekształcane były w amidofosforyny i inkorporowane do łańcucha DNA.



Zasada = uracyl, cytozyna, adenina, 6-chloro-7-deazapuryna, 2-amino-6-chloro-deazapuryna

Schemat 20. Synteza „fleximerów” **76**

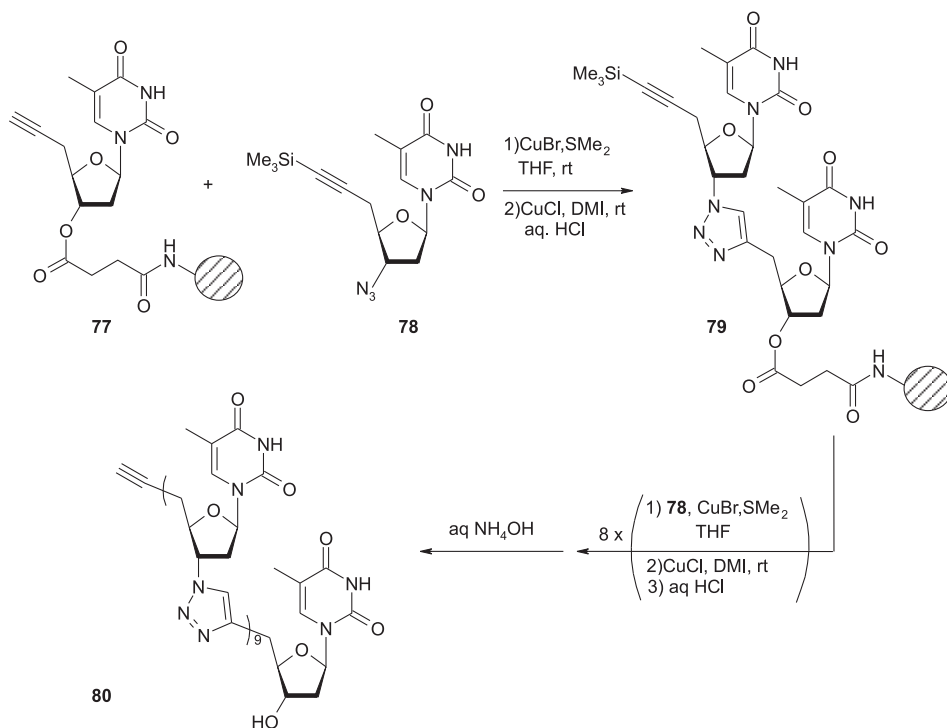
Scheme 20. Synthesis of „fleximers” **76**

### 3.2. 1,2,3-TRIAZOL JAKO ZAMIENNIK WIĄZANIA INTERNUKLEOTYDOWEGO

Reakcja katalizowanej miedzią 1,3-dipolarnej cykloaddycji stała się użytecznym narzędziem otrzymywania różnej klasy modyfikowanych oligonukleotydów. Znane są właściwości naturalnie nie występujących oligodeoksyrybonukleotydów antysensowych, które działają jako posttranskrypcyjne czynniki wyciszenia genów. W literaturze opisana jest synteza oligonukleotydów, w których internukleotydowe wiązanie fosfodiesterowe zastąpione zostało pierścieniem triazolowym powstałym w wyniku reakcji CuAAC.

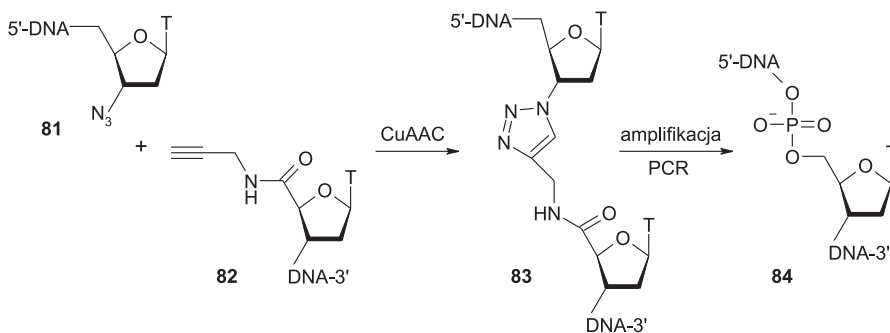
Wykorzystując strategię „click chemistry” Isobe i współpracownicy przedstawili syntezę nowego analogu DNA (**80**, Schemat 21), w którym kolejne nukleozasady połączone są pierścieniem triazolowym [31]. Reakcja zawieszona na fazie stałej związku **77** z monomerem **78** prowadziła do związku **79**. Kolejne przyłączenia monomeru **78** i następcze odcięcie od złoża dawało finalny produkt **80**.





Schemat 21. Synteza analogu DNA posiadającego pierścień triazolowy w miejscu wiązania internukleotydu  
Scheme 21. Synthesis of DNA analogue with triazole ring in place of internucleotide linkage

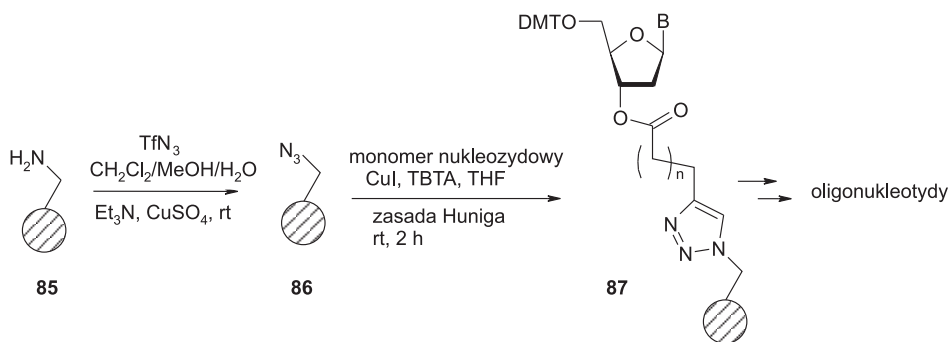
W literaturze przedstawiona jest także interesująca synteza nici DNA zawierających nie występujący naturalnie łącznik składający się z dwóch reszt tymidyny połączonych triazolem (T-triazol-T) [32]. Połączenie tego typu otrzymano na drodze ligacji oligonukleotydu **81** zawierającego na 3'-końcu resztę AZT z oligonukleotydem **82** zawierającym na 5'-końcu propargiloamidotymidynę. Następnie modyfikowany oligonukleotyd **83** był z powodzeniem użyty w reakcji amplifikacji PCR z wykorzystaniem kilku różnych polimeraz (Schemat 22).



Schemat 22. Synteza DNA zawierającego w szkielecie nie występujący naturalnie fragment T-triazol-T  
Scheme 22. Synthesis of oligonucleotides containing an unnatural T-triazole-T linkage

### 3.3. 1,2,3-TRIAZOL JAKO LINKER W SYNTEZIE NA FAZIE STAŁEJ

Synteza na fazie stałej stanowi obecnie najczęściej stosowaną metodę otrzymywania takich makrocząsteczek jak peptydy czy kwasy nukleinowe. Jednakże kowalencyjne przyłączenie pierwszego monomeru często bywa problematyczne. Na przykład przy zastosowaniu złoża posiadającego wolne grupy aminowe proces upakowania może przebiegać bardzo powoli i jednocześnie musi być przeprowadzany w ściśle bezwodnym medium. Konsekwencją niepełnego upakowania złoża są niepożądane reakcje uboczne, a co za tym idzie niższa wydajność i utrata czystości finalnego produktu. W celu obejścia tych trudności Oyelere i współpracownicy zaproponowali syntezę złoża z grupami azydowymi **86** (Schemat 23), co pozwalało na przyłączenie do niego nukleozydów podstawionych alkinylem w reakcji 1,3-dipolarnej cykloaddycji [33]. Funkcjonalizowane w ten sposób złoże **87** umożliwiło syntezę 15- i 30-merowych oligonukleotydów na fazie stałej.



Schemat 23. Synteza oligonukleotydów z wykorzystaniem złoża z przyłączonymi grupami azydowymi  
Scheme 23. Synthesis of oligonucleotides using the azido-coated support

## PODSUMOWANIE

Katalizowana miedzią reakcja 1,3-dipolarnej cykloaddycji pomiędzy azydami, a alkinami (CuAAC) stanowi nową drogę otrzymywania modyfikowanych nukleozydów, nukleotydów oraz oligonukleotydów. Metoda ta pozwala, przy pomocy modyfikowanego alkinylem amidofosforynów, na przyłączenie wszelkiego rodzaju znaczników do oligonukleotydów. Z pomocą modyfikowanego alkinylem trifosforanów lub przy użyciu technologii metylotransferaz można otrzymywać duże fragmenty genomowego DNA, które następnie można modyfikować wykorzystując reakcję CuAAC. Zaskakującym faktem jest to, że znaczna ilość podstawionych grupą alkinylową zasad jest łatwo akceptowana przez polimerazy, dzięki czemu mogą one w pełni zastąpić zasady kanoniczne we fragmencie DNA powstałym w wyniku naturalnej lub sztucznej amplifikacji. Następnie fragmenty DNA zawierające w swoim szkielecie ugrupowania alkinowe mogą być, z wysokimi wydajnościami, w reakcji 1,3 dipolarnej

cykloaddycji modyfikowane na wiele różnych sposobów. Znaczna część otrzymanych w ten sposób oligonukleotydów daje się w łatwy sposób oczyścić np. przez wytrącanie z etanolu, co pozwala uniknąć czasochłonnej i drogiej techniki HPLC.

Nici DNA z grupami alkinowymi mogą znaleźć zastosowanie w nowoczesnej diagnostyce molekularnej albo jako jednostki budulcowe do konstrukcji nanomateriałów. Dla chemików zajmujących się DNA reakcja CuAAC poszerza możliwości syntezy tej klasy połączeń, pozwalając jednocześnie otrzymywać zupełnie nowe pochodne DNA, które w przyszłości mogą być wykorzystywane w wielu obszarach między innymi w medycynie czy nanotechnologii.

Serdecznie dziękuję dr hab. Janinie Baraniak za materiały i sugestie, które pozwoliły na powstanie tego artykułu.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K.B. Sharpless et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 2004.
- [2] R. Huisgen, *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, Vol. 1, Wiley, New York, 1984, 1.
- [3] a) E. De Clercq, *J. Clin. Virol.*, 2004, **30**, 115; b) D. Jochmans, *Virus Res.*, 2008, **134**, 171; c) S. Miura, S. Izuta, *Curr. Drug Targets*, 2004, **5**, 191.
- [4] J.Y. Lau, R.C. Tam, T.J. Liang, Z. Hong, *Hepatology*, 2002, **35**, 1002.
- [5] R. Alvarez, S. Valazquez, A. San-Felix, S. Aquaro, E. De Clercq, C. F. Perno, A. Karlsson, J. Balzarini, M.J. Camarasa, *J. Med. Chem.*, 1994, **37**, 4185.
- [6] a) I. Perez-Castro, O. Caamano, F. Fernandez, M.D. Garcia, C. Lopez, E. De Clercq, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 3805; b) J.H. Cho, D.L. Bernard, R.W. Sidwell, E.R. Kern, C.K. Chu, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 1140; c) J. Broggi, N. Joubert, V. Aucagne, T. Zevaco, S. Berteina-Raboin, S.P. Nolan, L.A. Agrofoglio, *Nucleosides Nucleotides* 2007, **26**, 779.
- [7] L. Li, B. Lin, Z. Yang, L. Zhang, L. Zhang, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 4491.
- [8] L. Li, G. Zhang, L. Zhang, A. Zhu, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 3630.
- [9] a) Y. Xia, W. Li, F. Qu, Z. Fan, X. Liu, C. Berro, E. Rauzy, L. Peng, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 1695; b) W. Li, Y. Xia, F. Qu, Z. Fan, L. Peng, Q. Wu, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 2804.
- [10] R. Guezquez, K. Bourgin, K. El Akri, R. Benhida, *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 4807.
- [11] D.S. Ermolat'ev, V.P. Metha, E.V. Van der Eycken, *QSAR Com. Sci.*, 2007, **26**, 1266.
- [12] J. Broggi, N. Joubert, V. Aucagne, S. Berteina-Raboin, S. Diez-Gonzalez, S.P. Nolan, D. Topalis, D. Deville-Bonne, J. Balzarini, J. Neyts, G. Andrei, R. Snoeck, L. Agrofoglio, *Nucleosides Nucleotides*, 2007, **26**, 1391.
- [13] a) S.H. Cho, E.J. Yoo, I. Bae, S. Chang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 16046; b) E.J. Yoo, M. Ahlquist, I. Bae, K.B. Sharpless, V. Fokin, S. Chang, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 5520.
- [14] L. Cosyn, K.K. Palaniappan, S.K. Kim, H.T. Duong, Z.G. Gao, K.A. Jacobson, S. Van Calenbergh, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 7373.
- [15] a) C. Temple, C.L. Kussner, J. Montgommery, *J. Org. Chem.*, 1966, **31**, 2210; b) T. Lioux, G. Gosselin, C. Mathe, *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, **20**, 3997.
- [16] L. Cosyn, Z.G. Gao, P. Van Rompaey, C. Lu, K.A. Jacobson, S. Van Calenbergh, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 1403.
- [17] A. Gupte, H.I. Boshoff, D.J. Wilson, J. Neres, N. Labello, R.V. Somu, C. Xing, C.E. Barry, C.C. Aldrich, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 7495.

- [18] a) L. Zhou, A. Amer, M. Korn, R. Burda, J. Balzarini, E. De Clercq, E.R. Kern, P.F. Torrence, *Antiviral Chem. Chemother.* 2005, **16**, 375; b) H. Ding, R. Yang, Y. Song, Q. Xiao, J. Wu, *Nucleosides Nucleotides*, 2008, **27**, 368.
- [19] G. O'Mahony, S. Svensson, A. Sundgreen, M. Grotli, *Nucleosides Nucleotides*, 2008, **27**, 449.
- [20] L. Lee, K.H. Chang, F. Valiyev, H.J. Liu, S.J. W, J. Chin. Chem. Soc., 2006, **53**, 1547.
- [21] J. Cao, X. Huang, *J. Comb. Chem.*, 2008, **10**, 526.
- [22] A. Olejniczak, B.A. Wojtczak, Z. Lesnikowski, *Nucleosides, Nucleotides, Nucleic Acids*, 2007, **26**, 1611.
- [23] L.V. Lee et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 9588.
- [24] G. Godeau, C. Staedel, P. Barthelemy, *J. Med. Chem.*, 2008, **51**, 4374.
- [25] X. Jin, R. Yang, P. Jin, Q. Xiao, Y. Ju, *Synthesis*, 2007, **19**, 2967.
- [26] P.M.E. Gramlich, C.T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 8350.
- [27] J. Gierlich, G.A. Burley, P.M.E. Gramlich, D.M. Hammond, T. Carell, *J. Org. Lett.*, 2006, **8**, 3639.
- [28] C. Bouillon, A. Meyer, S. Vidal, A. Jochum, Y. Chevelot, J.-P. Cloarec, J.-P. Praly, J.-J. Vasseur, F. Morvan, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 4700.
- [29] T.S. Seo, Z. Li, H. Ruparel, J. Ju, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 609.
- [30] P. Chitttepu, V.R. Sirivolu, F. Seela, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 8427.
- [31] H. Isobe, T. Fujino, N. Yamazaki, M. Guillot-Nieckowski, E. Nakamura, *Org. Lett.*, 2008, **10**, 3729.
- [32] A. H. El-Sagheer, T. Brown, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 3958.
- [33] A.K. Oyelere, P.C. Chen, L.P. Yao, N. Boguslavsky, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 9791.

Praca wpłynęła do Redakcji 8 stycznia 2011