

**SYNTEZA MODYFIKOWANYCH  
OLIGONUKLEOTYDÓW ZAWIERAJĄCYCH  
STEREOZDEFINIOWANE INTERNUKLEOTYDOWE  
WIĄZANIA TIOFOSFORANOWE**

**SYNTHESIS OF MODIFIED OLIGONUCLEOTIDES  
CONTAINING STEREODEFINED INTERNUCLEOTIDE  
PHOSPHOROTHIOATE BONDS**

**Ewa Radzikowska<sup>\*1</sup>, Renata Kaczmarek<sup>1</sup>,  
Janina Baraniak<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> *Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk,  
Zakład Chemii Bioorganicznej  
ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź*

<sup>2</sup> *Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Instytut Chemii i Ochrony Środowiska,  
Akademia im. Jana Długosza  
al. Armii Krajowej 13/15, 42-200 Częstochowa  
<sup>\*</sup>e-mail: eradziko@cbmm.lodz.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych oznaczeń i symboli

Wstęp

1. Właściwości biologiczne i fizykochemiczne oligonukleozydotiofosforanów; 2. Zastosowanie technik chromatograficznych do otrzymywania diastereomerycznie czystych oligonukleozydotiofosforanów; 3. Wykorzystanie diastereomerycznie czystych dimerycznych bloków budulcowych; 4. Enzymatyczna synteza oligonukleozydotiofosforanów; 5. Stereokontrolowana synteza oligonukleozydotiofosforanów; 5.1. Stereoselektywna synteza w oparciu o chiralność reszty cukrowej; 5.2. Stereospecyficzna synteza z wykorzystaniem otrzymanych na drodze chromatograficznego rozdzielania diastereomerycznie czystych monomerów; 5.3. Stereoselektywna synteza monomerów i ich zastosowanie do syntezy stereoregularnych oligonukleozydotiofosforanów

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr Ewa Radzikowska** ukończyła studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego w 2007 roku i w tym samym roku rozpoczęła pracę w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi. Stopień naukowy doktora uzyskała w 2014 roku. Jej obszar zainteresowań naukowych obejmuje syntezę modyfikowanych nukleozydów oraz oligonukleotydów o potencjalnym zastosowaniu terapeutycznym, jest współautorką 8 publikacji.

**Dr Renata Kaczmarek** ukończyła studia na Wydziale Chemii Politechniki Łódzkiej (1995). Jest asystentem w Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMM PAN w Łodzi, gdzie pracuje od 1996 roku. Stopień naukowy doktora uzyskała w 2006 roku; jest współautorką 23 publikacji. Główny obszar działalności naukowej: synteza fosforylowanych i tiofosforylowanych pochodnych aminokwasów, peptydów i amidów, synteza modyfikowanych nukleozydów oraz oligonukleotydów o potencjalnym zastosowaniu.

**Dr hab. Janina Baraniak** po ukończeniu studiów na Wydziale Chemii Politechniki Łódzkiej rozpoczęła pracę w CBMM PAN w Łodzi, gdzie w 1986 roku uzyskała stopień naukowy doktora [staż naukowy w Zespole Prof. P. Frey'a (Department of Biochemistry, Institute for Enzyme Research, University of Wisconsin, Madison, USA)] a w 2005 roku stopień doktora habilitowanego. Głównym przedmiotem zainteresowań naukowych jest chemia modyfikowanych nukleozydów i oligonukleotydów, a w szczególności synteza związków o potencjalnych właściwościach terapeutycznych jak i istotnym znaczeniu poznawczym nakierowanym na badania mechanistyczne procesów biochemicznych. Jest współautorką 66 publikacji, opiekunem dwóch prac doktorskich. Obecnie pracuje w Akademii im. Jana Długosza w Częstochowie.

---

**ABSTRACT**

Synthetic oligonucleotides constitute an important class of compounds which can exhibit biological activity. As potential drugs they could be employed in antisense strategy by acting on the pathogenic mRNA, causing inactivation of the target molecules during the translation process [1]. Ideal antisense agent (ASO) should be resistant to exo and/or endonucleases, exhibit a suitable pharmacological and pharmacokinetic profile and exhibits high binding affinity towards the target mRNA. To improve some properties of the ASO plethora of the chemical modifications introduced within the nucleobase, sugar unit and internucleotide linkage are investigated [3]. Among them, phosphorothioate oligonucleotides (PS-oligo), created by replacing one of the nonbridging oxygen atoms with a sulfur atom, are the major representatives of DNA analogs. PS-oligo display several attractive features like nuclease resistance, activation of RNase H, and good pharmacokinetic properties [1].

Replacement of one of two nonbridging oxygens at phosphorus by sulfur induces asymmetry at the phosphorus atom. Hence, the synthesized oligo(nucleoside phosphorothioate) is a mixture of  $2^n$  diastereomers (where  $n$  is the number of internucleotide phosphorothioate functions). Therefore the actual biological activity of the P-chiral oligonucleotide analogues, (e.g., interactions with proteins or nucleic acids) may depend on stereochemical factors [7]. One has to keep in mind that the phosphoramidite [5] and *H*-phosphonate [32] methodologies (commonly used to prepare PS-oligo) are nonstereospecific and give a mixture of  $2n$  diastereomers. Thus, various methods have been elaborated to synthesize these P-chiral oligonucleotide analogs in a stereocontrolled manner [15, 17], among them the oxathia-phospholane method developed by Stec et al. [18], the method utilizing nucleoside 3'-*O*-(3-*N*-acyl)oxazaphospholidine derivatives as monomer units [19], and the method based on a stereoselective synthesis of nucleoside 3'-*O*-oxazaphospholidine monomers [21, 22] are the most significant.

Keywords: oligo(deoxy)ribonucleoside phosphorothioates, antisense oligonucleotides, synthesis of modified oligonucleotide, stereospecific synthesis

Słowa kluczowe: oligonukleozydotiofosforany, oligonukleotydy antysensowe, synteza modyfikowanych oligonukleotydów, synteza stereospecyficzna

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AIDS	– zespół nabytego niedoboru odporności
All	– grupa allilowa
ASO	– oligonukleotyd antysensowy
Bz	– grupa benzoilowa
CPG	– szkło o kontrolowanej wielkości porów
CMPT	– trifluorometanosulfonian <i>N</i> -(cyjanometylo)-pirolidynowy
CMV	– cytomegalowirus
DBU	– 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en
DEAD	– azodikarboksylan dietylowy
DMT <sub>r</sub>	– grupa 4,4'-dimetoksytrytylowa [bis(4-metoksy-fenyl)fenylometyl]
DTD	– disiarczkek <i>N,N'</i> -dimetylotiuramu
FDA	– Amerykańska Agencja do Spraw Leków i Żywności
Fm	– grupa 9-fluorenylometylowa
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa
LCA-CPG	– ang. <i>long chain alkylamine controlled pore glass</i>
MMT <sub>r</sub>	– grupa 4-monometoksytrytylowa
mRNA	– matrycowy/informacyjny kwas rybonukleinowy
NEPCI	– 2-chloro-5,5-dimetylo-2-okso-1,3,2-dioksafosforin
PivCl	– chlorek piwaloilu
TBAF	– fluorek tetra- <i>n</i> -butyloamoniowy
TBDMS	– grupa <i>tert</i> -butylodimetylosililowa
TBDPS	– grupa <i>tert</i> -butylodifenylosililowa
THF	– tetrahydrofuran
TMG	– <i>N,N,N',N'</i> -tetrametyloguanidyna

## WSTĘP

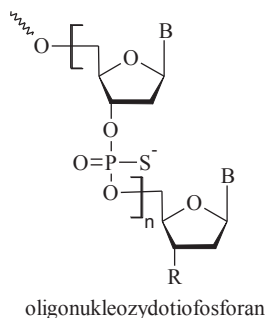
Zsekwencjonowanie ludzkiego genomu oraz rozwój nowych technik badawczych sprawił, że pod koniec XX wieku w procesie poszukiwania nowych leków nastąpił istotny przełom. Wcześniejsza strategia była oparta na fizjologii choroby, czyli wykorzystywała widoczne symptomy choroby i była skoncentrowana na poszukiwaniu związków niskocząsteczkowych zazwyczaj oddziaływujących bezpośrednio z białkiem odpowiedzialnym za powstanie określonej choroby. Stąd też tradycyjne farmaceutyki usuwają skutki, a nie przyczyny choroby.

Nowe podejście oparte na tzw. molekularnym mechanizmie choroby ma za zadanie tworzyć leki, które będą zapobiegały przyczynom choroby poprzez precyzyjne oddziaływanie ze źródłem procesów chorobotwórczych.

W nurt tych badań wpisuje się między innymi tzw. strategia antysensowa wykorzystująca syntetyczne oligonukleotydy komplementarne do sekwencji mRNA docelowego genu i wiążące się do niego poprzez sekwencyjnie specyficzny proces hybrydyzacji za pomocą wiązań typu Watsona-Cricka [1]. Rezultatem tego zjawiska jest hydroliza bądź uszkodzenie docelowego mRNA, a zatem inhibicja ekspresji określonego genu czyli zahamowanie syntezy białka. Stosowane w tej strategii oligonukleotydy nazywane są oligonukleotydami antysensowymi (ang. antisense oligonucleotides, ASO).

Aby ASO mogły być stosowane jako leki muszą po dotarciu do docelowych komórek występować przez pewien określony czas w takim stężeniu, aby były zdolne wywoływać oczekiwany efekt terapeutyczny. Stąd też koniecznym jest, aby ASO były odporne na degradację enzymatyczną wobec wewnątrzkomórkowych nukleaz. Natywne cząsteczki ASO, tak jak i naturalne oligonukleotydy fosforanowe, są jednakże szybko degradowane przez nukleazy obecne *in vivo*. Dodatkowo, inne czynniki takie jak np. słaba rozpuszczalność w płynach ustrojowych czy mała przepuszczalność przez błony biologiczne sprawiły, że stosowanie naturalnych fosfodiesterowych ASO było bardzo ograniczone [2]. Stąd też aby oligonukleotydy antysensowe mogły wykazywać pożądaną efektywność terapeutyczną, wprowadzono liczne modyfikacje chemiczne mające na celu polepszenie własności biologicznych i fizykochemicznych tych biomolekuł [3].

Spośród licznej grupy oligonukleotydów modyfikowanych w obrębie wiązania internukleotydogo na szczególną uwagę zasługują analogi, w których jeden z niemoistkowych atomów tlenu w tym wiązaniu zastąpiony został atomem siarki. Otrzymane w ten sposób ASO nazywane są oligonukleozydotiofosforanami (Rys. 1).



Rysunek 1. Struktura chemiczna oligonukleozydotiofosforanów  
 Figure 1. Chemical structure of phosphorothioate oligonucleotides (PS-oligos)

Oligonukleozydotiofosforany posiadają wiele zalet w porównaniu do odpowiednich niemodyfikowanych oligonukleotydów, a najważniejszą z nich jest zwiększona odporność na działanie wewnątrzkomórkowych nukleaz. Równie istotną cechą tych związków jest ich dogodny profil farmakokinetyczny (tj. przebieg zmian stężenia/ilości leku i jego metabolitów w płynach ustrojowych, tkankach i wydalinach) [3].

## 1. WŁAŚCIWOŚCI BIOLOGICZNE I FIZYKOCHEMICZNE OLIGONUKLEOZYDOTIOFOSFORANÓW

Prace dotyczące syntezy tiofosforanowych analogów oligonukleotydów zostały zapoczątkowane pod koniec lat 60. minionego wieku, kiedy to tiofosforanowe analogi dinukleotydów były wykorzystywane jako substraty w badaniach nad aktywnością niektórych nukleaz [4]. Dopiero opracowana przez Caruthersa w latach 80. XX wieku amidofosforynowa metoda syntezy oligonukleotydów na stałym podłożu [5] stała się dogodną metodą syntezy oligonukleozydotiofosforanów [6].

Zastąpienie jednego z niemostkowych atomów tlenu w wiązaniu internukleotydom atomem siarki indukuje powstawanie centrum chiralności na atomie fosforu. Jednakże w przypadku związków chiralnych własności poszczególnych enancjomerów bądź diastereomerów są zróżnicowane. Toteż rozważając aktywność biologiczną oligonukleozydotiofosforanów należy uwzględnić chiralność atomu fosforu w każdym wiązaniu tiofosforanowym [7]. Oznacza to, że tiofosforanowy oligonukleotyd jest mieszaniną  $2^n$  diastereoizomerów, gdzie  $n$  jest liczbą wiązań internukleotydom. Rozdział poszczególnych izomerów za pomocą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej jest możliwy tylko w przypadku bardzo krótkich oligonukleotydów: tri-, tetra- i pentamerów.

Wspólną cechą stosowanych powszechnie metod syntezy oligonukleozydotiofosforanów jest ich niestereokontrolowany charakter. Ten ogólny problem związany z chiralnością tych związków mógł być rozwiązany jedynie na drodze stereokontrolowanej syntezy.

Przez wiele lat stereokontrolowana chemiczna synteza tiofosforanowych pochodnych oligonukleotydów stanowiła prawdziwe wyzwanie dla chemików zajmujących się tym obszarem badań. Początkowe prace ograniczały się do poszukiwania stereoselektywnych metod [8], a w późniejszym etapie koncentrowały się na opracowaniu stereospecyficznych syntez [7].

## 2. ZASTOSOWANIE TECHNIK CHROMATOGRAFICZNYCH DO OTRZYMYWANIA DIASTEREOMERYCZNIE CZYSTYCH OLIGONUKLEOZYDOTIOFOSFORANÓW

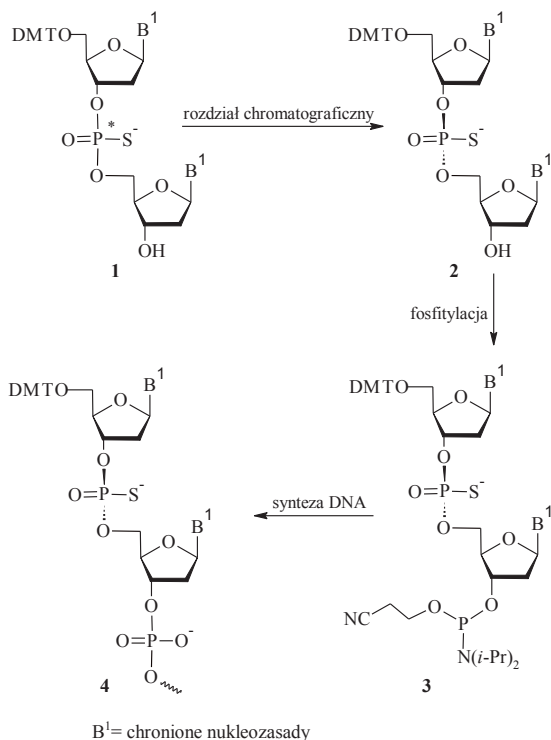
W początkowym etapie badań nad P-chiralnymi oligonukleozydotiofosforanami kluczową rolę w otrzymywaniu ich w diastereomerycznie czystej postaci odgrywały metody oparte na technice rozdziału chromatograficznego. Aż do wczesnych lat 70. minionego wieku rozdzielone na tej drodze P-chiralne dinukleozydotiofosforany ( $R_p$  vs  $S_p$ ) wykorzystywane były w badaniach dotyczących ich stabilności hydrolitycznej wobec nukleaz jak również do określenia ich powinowactwa względem jedno- lub dwuniciowego RNA i DNA [9].

Klasyczny rozdział chromatograficzny stosowano również do otrzymywania dłuższych fragmentów oligonukleotydów, w których wprowadzona była jedynie pojedyncza modyfikacja tiofosforanowa, dzięki czemu badano wpływ takich modyfikacji na trwałość odpowiednich dupleksów i trypleksów [10].

Zaletą metody opartej o rozdział chromatograficzny jest możliwość otrzymania poszczególnych izomerów o bardzo dużej czystości. Niestety sam proces rozdziału bywa kłopotliwy i jest zależny od struktury związku (długość, sekwencja zasad, pozycja centrum P-chiralnego). Im oligomer dłuższy, a sekwencja bardziej urozmaicona, tym rozdział trudniejszy. [11]. Jeszcze większy problem stanowi rozdział związków w których występuje większa ilość centrów P-chiralności. Biorąc pod uwagę fakt, że poszczególne diastereomery posiadają bardzo zbliżone cechy (w tym czasy retencji) ich rozdział metodami chromatograficznymi jest właściwie niemożliwy. Nawet stosując zaawansowane techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) rozdział ten ogranicza się do bardzo krótkich oligonukleotydów: tri-, tetra- i pentamerów [12].

## 3. WYKORZYSTANIE DIASTEREOMERYCZNIE CZYSTYCH DIMERYCZNYCH BŁOKÓW BUDULCOWYCH

Dinukleozydotiofosforany z centrum chiralności na atomie fosforu **1** (Schemat 1) rozdzielone na poszczególne  $R_p$  i  $S_p$  izomery **2** z wykorzystaniem chromatografii typu „flash” zostały przekształcone w odpowiednie 3'-amidofosforyny **3**, które następnie posłużyły jako dimeryczne bloki budulcowe **4** w syntezie oligonukleotydów na fazie stałej metodą amidofosforynową [13].



Schemat 1. Synteza stereoregularnych oligonukleozydotiofosforanów **4** z wykorzystaniem diastereomerycznie czystych dimerycznych bloków budulcowych **3**

Scheme 1. Synthesis of stereoregular PS-oligos **4** using diastereopure dimer building blocks **3**

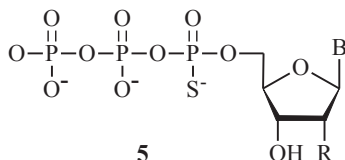
W ten sposób można było otrzymywać oligomery zawierające wiele P-chiralnych centrów w określonych pozycjach oligonukleotydu, związków niemożliwych do otrzymania na drodze rozdzielania chromatograficznego skomplikowanych mieszanin diastereomerycznych.

Zaletą opisanego podejścia było to, że w dalszym etapie syntezy nie było konieczne stosowanie stereokontrolowanej metody. Jednakże, aby za pomocą tej metody zsyntezować określony oligonukleotyd zawierający cztery podstawowe zasady azotowe potrzebne były aż 32 dimery (4 kanoniczne heterozasady odpowiednio na 5' i 3'-końcu oraz dwa P-diastereomery) i ich rozdzielanie chromatograficzne na poszczególne izomery nie zawsze było możliwe. Ponadto efektywność procesu kondensacji dimerycznych bloków budulcowych jest znacząco niższa niż w przypadku standardowo stosowanych monomerów amidofosforynowych oraz niemożliwym jest otrzymanie na tej drodze oligonukleotydów zawierających następujące po sobie kolejne P-chiralne centra tiofosforanowe.



#### 4. ENZYMATYCZNA SYNTEZA OLIGONUKLEOZYDOTIOFOSFORANÓW

Równolegle do badań dotyczących opracowania chemicznych metod syntezy P-chiralnych oligonukleozydotiofosforanów trwały prace wykorzystujące do tego celu reakcje enzymatyczne. Jako substraty do syntezy tychże związków na drodze enzymatycznej stosowano odpowiednie  $\alpha$ -tio-modyfikowane analogi naturalnych 5'-trifosforanów (5; Rys. 2) [14], które włączane były do łańcucha oligonukleotydu z wykorzystaniem takich enzymów jak polimeraza DNA I z *E. coli*. Reakcje prowadzone były w obecności odcinka starterowego (ang. *primer*) i odpowiedniej matrycy.



Rysunek 2. Struktura chemiczna  $\alpha$ -P-tio-nukleozydo-5'-trifosforanów  
Figure 2. Chemical structure of  $\alpha$ -P-thio-nucleoside 5'-triphosphates

W odróżnieniu od metody bazującej na rozdziale chromatograficznym wykorzystanie metody enzymatycznej umożliwiło otrzymanie diastereomerycznie czystych oligonukleotydów zawierających w swojej strukturze następujących po sobie kilka internukleotydowych wiązań tiofosforanowych o długości powyżej 5 zasad.

Jednakże enzymatyczna synteza oligonukleozydotiofosforanów posiada również ograniczenia wynikające ze stereospecyficzności stosowanych enzymów, gdyż jedynie Sp-izomer NTPP $\alpha$ Ss jest ich substratem. Stąd też można było otrzymać tylko tiofosforany o konfiguracji R na atomie fosforu (proces tworzenia wiązania internukleotydowego zachodzi w tym przypadku z inwersją konfiguracji). Ponadto nie możliwym było otrzymanie na tej drodze oligomerów modyfikowanych w określonych pozycjach łańcucha ze względu na to, że określony  $\alpha$ -P-tio-trifosforan zostawał wprowadzony w każde miejsce, w którym występowała dana nukleozasada. Dodatkowo pożądanym oligomerem połączony był z „primerem” wiązaniem kowalencyjnym.

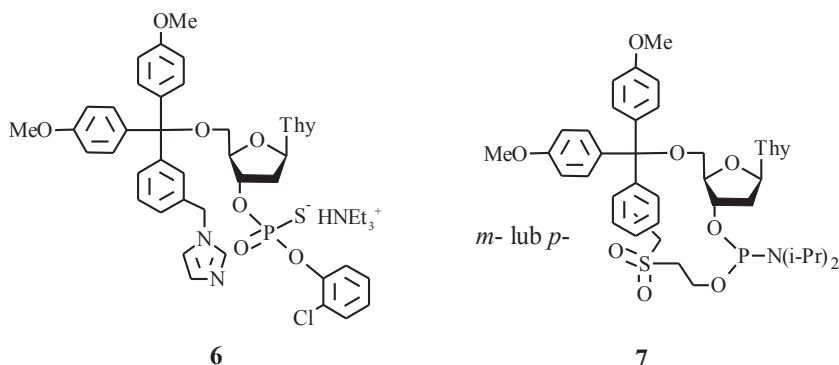
### 5. STEREOKONTROLOWANA SYNTEZA OLIGONUKLEOZYDOTIOFOSFORANÓW

#### 5.1. STEREOSELEKTYWNA SYNTEZA W OPARCIU O CHIRALNOŚĆ RESZTY CUKROWEJ

Jedno z najwcześniej realizowanych podejść do stereoselektywnej syntezy P-chiralnych analogów oligonukleotydów opierało się na wykorzystaniu chiralności reszty cukrowej tj. rybozy bądź deoksyrybozy, których obecność indukuje stereoselektywność reakcji syntezy odpowiednich analogów. Faktem jest, że nawet prowa-

dzona na „niestereoselektywnej” drodze (np. metodą amidofosforynową) synteza dinukleozydotiofosforanów nie daje mieszaniny izomerów Sp:Rp w stosunku 50:50, ale w zależności od warunków prowadzenia reakcji stosunek ten waha się w przedziale 63:37 do 43:57 [12a]. Stąd też, prowadzone były liczne badania mające na celu zwiększenie obserwowanej stereoselektywności reakcji tak, aby możliwa była synteza stereoregularnych analogów oligonukleotydów.

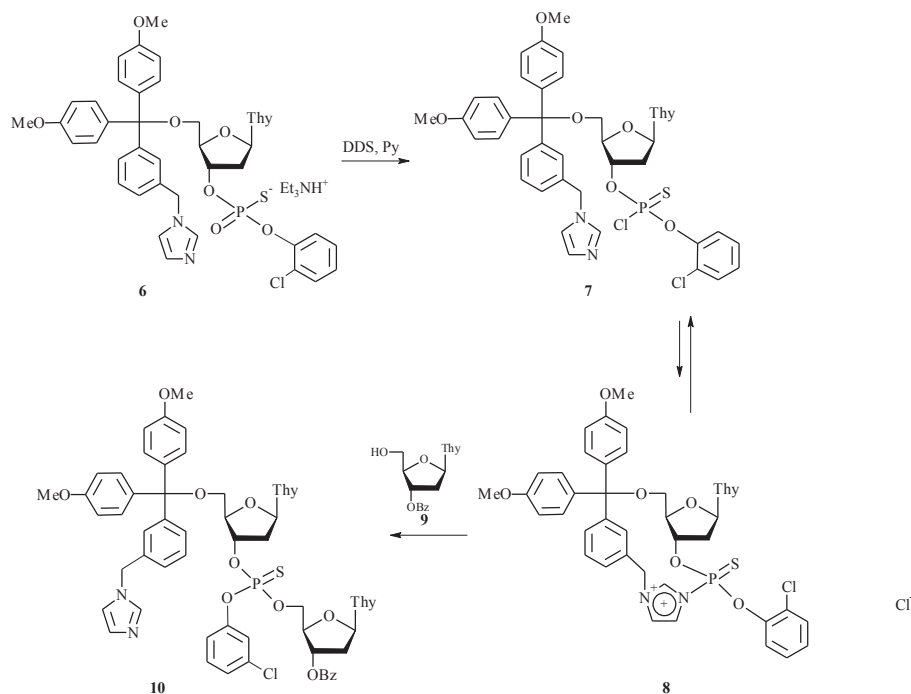
Interesujące podejście do stereoselektywnej syntezy oligonukleozydotiofosforanów zaprezentował Sekine i współpracownicy [15]. Zaprojektowali oni monomery w których, stosowana standardowo do ochrony funkcji 5'-hydroksylowej, grupa dimetoksytrytylowa modyfikowana była poprzez wprowadzenie podstawnika imidazolowego (związek **6**) bądź grupa ta była połączona poprzez łącznik z amidofosforynowym atomem fosforu na 3'-końcu nukleozydu (**7**; Rys. 3). Takie usztywnienie struktury miało w zamyśle autorów wymusić przebieg reakcji w kierunku tworzenia jedynie jednego z P-diastereomerów.



Rysunek 3. Struktura chemiczna monomerów **6** i **7** wykorzystywanych w stereoselektywnej syntezie dinukleozydotiofosforanów

Figure 3. Structure of monomers **6** and **7** used for stereoselective synthesis of dinucleoside phosphorothioates

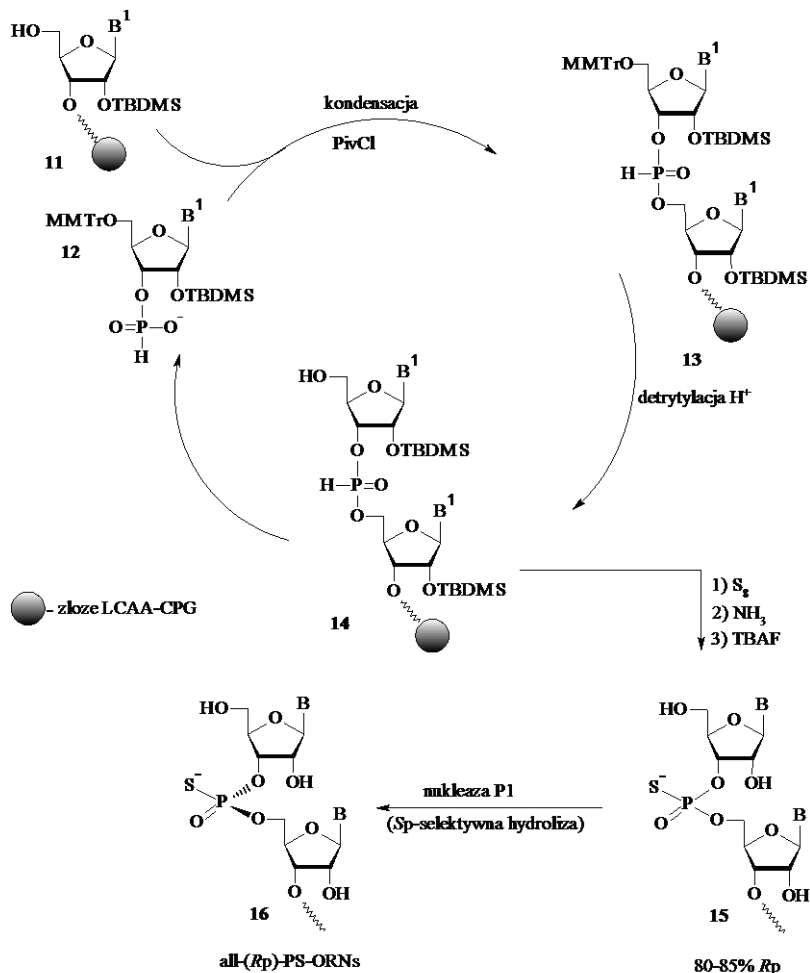
Stosując jako substraty monomer **6** oraz 3'-O-benzoilowaną tymidynę (**9**) autorzy otrzymali metodą triestrową pożądane diastereoizomery dinukleozydotiofosforanu **10** w stosunku Rp:Sp równym 18:82 (Schemat 2). Jako aktywator w tym przypadku użyta została pochodna sulfonylowa (tzw. DDS).

Schemat 2. Stereoselektywna synteza dinukleozydotiofosforanu **10** metodą triestrowąScheme 2. Stereoselective synthesis of dinucleoside phosphorothioate **10** via phosphotriester method

Obserwowana stereoselektywność procesu wynikała najprawdopodobniej z obecności reszty imidazolowej pełniącej funkcję wewnątrzcząsteczkowej grupy katalitycznej. Natomiast w przypadku użycia jako monomeru związku **7** dinukleozydotiofosforan **10** otrzymano ze stereoselektywnością wahającą się w granicach od 50:50 do 86:14 w zależności od zastosowanego linkera jak i użytego aktywatora jakimi były pochodne 1-*H*-tetrazolu, imidazolu lub triazolu. Niestety mimo wielu prób optymalizacji warunków syntezy dla obu typów monomerów nie udało się autorom uzyskać całkowitej stereoselektywności reakcji.

Chiralność rybozy była również wykorzystana w celu zwiększenia stereoselektywności syntezy oligonukleozydotiofosforanów w przypadku stosowania metody *H*-fosfonianowej. Efekt ten uzyskiwano poprzez zastosowanie dużego podstawnika w pozycji 2'-rybozy, co tym samym stanowiło ograniczenie zastosowania takiego podejścia dla pochodnych 2'-deoksyrybozy.

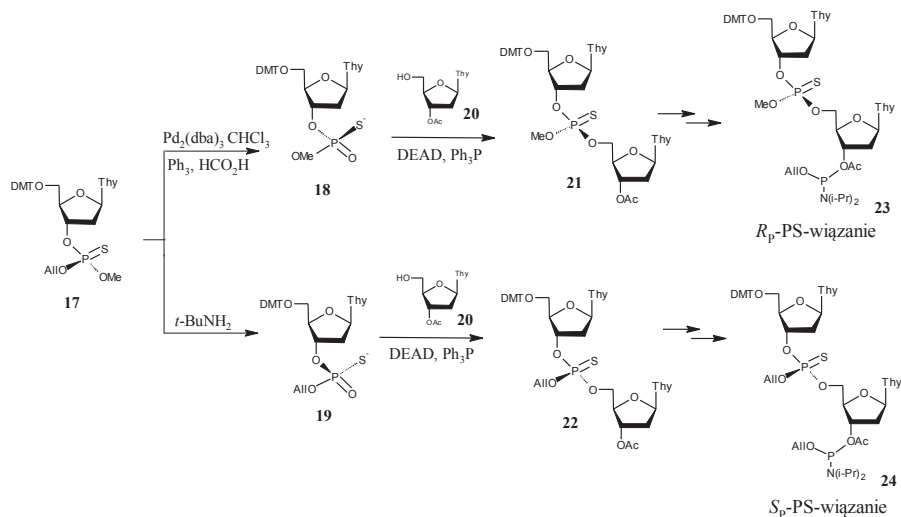
Przykładem ilustrującym powyższą strategię jest pochodząca z laboratorium Stromberga synteza diastereomerycznie czystego oligorybonukleozydotiofosforanu **16** o konfiguracji all-*(Rp)* przy zastosowaniu *H*-fosfonianowych monomerów **12** chronionych na funkcji 2'-hydroksylowej grupą tert-butyldimetylosililową [16]. Związki **12** kondensowane były z 5'-hydroksylową funkcją zawieszoną na złożu nukleozydu **11** wobec chlorku piwaloilu jako odczynnika kondensującego (Schemat 3).

Schemat 3. Synteza oligonukleozydotiofosforanu **16** metodą *H*-fosfonianowąScheme 3. Synthesis oligonucleotide phosphorothioate **16** via the *H*-phosphonate method

Otrzymano w ten sposób w pierwszym etapie po usunięciu z 5'-końca grupy monometoksytrytylowej (MMTr) odpowiednie dinukleozydo-*H*-fosfoniany **14** ze stereoselektywnością rzędu 80–85% dla *P*-epimeru o konfiguracji *S*. Związki te następnie utleniono za pomocą elementarnej siarki do odpowiednich tiofosforanów **15**. Z racji tej, że proces usiarczania *H*-fosfonianowych diestrów **14** przebiega z retencją konfiguracji (zgodnie z regułą Cahna-Ingolda-Preloga spośród czterech podstawników przyłączonych do atomu fosforu atom *S* jest starszy niż atom *H*) to oligonukleozydotiofosforany **15** były wzbogacone w izomer *R<sub>p</sub>*.

W ostatnim etapie syntezy oligomery **15** poddawane były trawieniu enzymatycznemu za pomocą nukleazy P1 (specyficzna dla izomerów *Sp*) dzięki czemu jako ostateczny produkt uzyskiwany był diastereomerycznie czysty oligonukleozydotiofosforan **16** o konfiguracji *R<sub>p</sub>*.

Wadą opisanych powyżej podejść jest to, że pozwalają one na syntezę tylko jednego z P-epimerów oligonukleozydotiofosforanów. W tym świetle niezwykle interesujący przykład syntezy dinukleozydotiofosforanów jako diastereoizomerycznie czystych bloków budulcowych, stanowi praca Hayakawy i współpracowników [17]. Autorzy opracowali syntezę triestrowego tiofosforanowego monomeru **17**, który w zależności od zastosowanych warunków deprotekcji jednej z grup (grupa allilowa vs metylowa) był prekursorem odpowiedniego diestru o konfiguracji  $R_p$  lub  $S_p$  (Schemat 4). Usunięcie grupy allilowej z ugrupowania tiofosforanowego prowadziło do odpowiedniego diestru **18** podczas gdy usunięcie grupy metylowej dawało diester **19**, które to związki utworzyły się w postaci czystych P-epimerów. Następnie kondensacje tych związków z 3'-O-acetylotymidyną (**20**) w warunkach reakcji Mitsunobu (DEAD,  $Ph_3P$ ), prowadziły do oczekiwanych triestrowych pochodnych **21** i **22**. W kolejnym etapie związki te w reakcji fosfitylacji były przekształcane w odpowiednie 3'-amidofosforyny **23** i **24**, a następnie włączane do łańcucha oligonukleotydu.



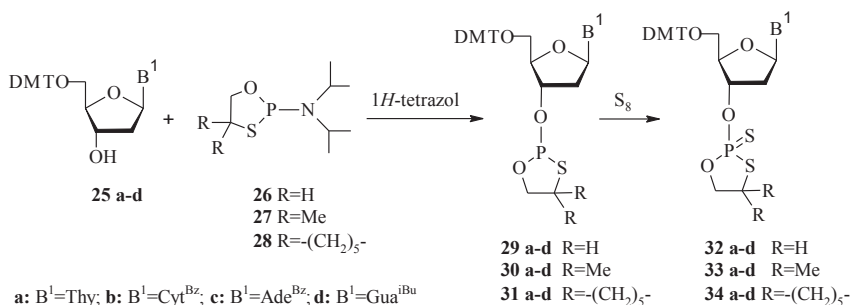
Schemat 4. Synteza diastereoizomerycznie czystych bloków budulcowych **23** i **24**

Scheme 4. Synthesis of diastereomeric pure dimer building blocks (**23**, **24**) via common intermediate **17**

## 5.2. STEROSPECYFICZNA SYNTEZA Z WYKORZYSTANIEM OTRZYMANÝCH NA DRODZE CHROMATOGRAFICZNEGO ROZDZIAŁU DIASTEREOMERYCZNIE CZYSTYCH MONOMERÓW

Prawdziwy przełom w dziedzinie stereokontrolowanej syntezy tiofosforanowych analogów oligonukleotydu stanowiła opracowana w zespole Steca oksatiafosforanowa metoda syntezy oligonukleozydotiofosforanów o określonej i z góry założonej konfiguracji absolutnej na atomie fosforu w obrębie wiązań internukleotydu [18].

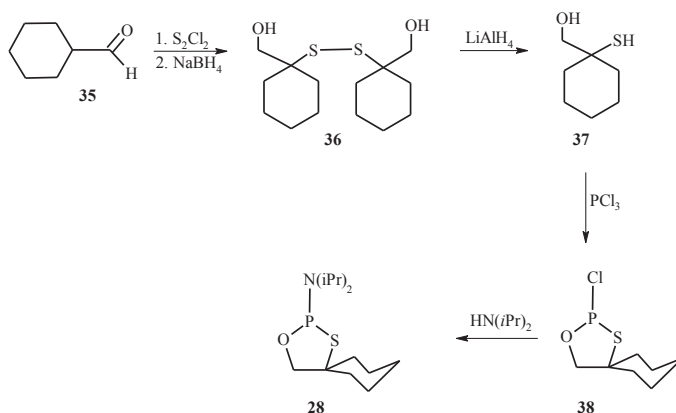
Istotę tej metody stanowiło użycie diastereomerycznie czystych odpowiednio chronionych 5'-*O*-DMT-nukleozydo-3'-*O*-(2-tiono-1,3,2-oksatiafosfolanów), niepodstawionych (**32**) lub dipodstawionych w pozycji 4 w pierścieniu oksatiafosfolanowym (**33-34**). Były one otrzymane w reakcji 5'-*O*-DMT-nukleozydów **25** z 2-*N,N*-diizopropylamino-1,3,2-oksatiafosfolanem (**26-28**) w obecności 1*H*-tetrazolu (Schemat 5) z następczym utlenieniem *in situ*, za pomocą elementarnej siarki, tworzących się w pierwszym etapie trójkoordynacyjnych związków fosforu **29-31**. Zsyntezowane oksatiafosfolanowe pochodne **32-34** były rozdzielone na *Rp*- i *Sp*-izomery techniką chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Efektywność tego rozdziału była uzależniona od rodzaju podstawnika obecnego w ugrupowaniu 2-tiono-1,3,2-oksatiafosfolanowym.



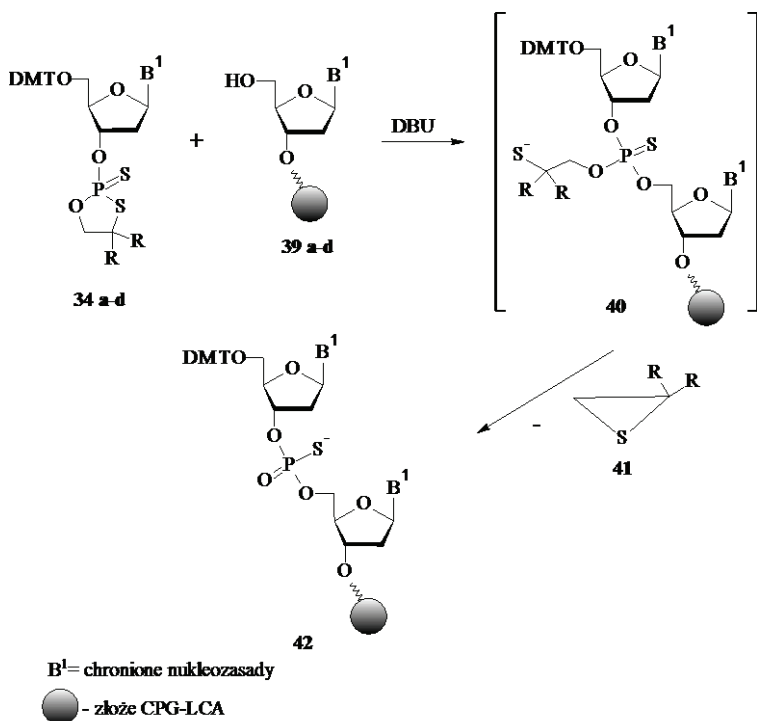
Schemat 5. Synteza oksatiafosfolanowych monomerów **32-34**

Scheme 5. Synthesis of oxathiaphospholane monomers **32-34**

Ostatecznie stosowano pochodne 4,4-pentametylenowe **34** (związki typu „spiro”), chociaż niedostępny handlowo odpowiedni merkptoalkohol **37** potrzebny do syntezy odczynnika **28** był otrzymywany w kilkuetapowej syntezie (Schemat 6). Do syntezy tego odczynnika użyto cykloheksanokarboksyaldehyd (**35**), którego reakcja w pierwszej kolejności z dichlorkiem disiarki a następnie redukcja za pomocą NaBH<sub>4</sub> prowadziła do 1,1'-ditio-bis(1,1-pentametylenoetan-2-olu) (**36**). W kolejnym etapie związek **36** pod działaniem tetrahydroglinianu litu przekształcony został w 1-merkpto-1,1-pentametylenoetan-2-ol (**37**), który wobec PCl<sub>3</sub> oraz następczej reakcji z diizopropylaminą dawał oczekiwany „spiro”-4,4-pentametyleno-1,3,2-oksatiafosfolan **28**.

Schemat 6. Synteza 2-*N,N*-diizopropylamino-„spiro”-4,4-pentametyleno-1,3,2-oksatiafosfolanu (28)Scheme 6. Synthesis of 2-*N,N*-diisopropylamino-“spiro”-4,4-pentamethylene-1,3,2-oxathiafospholane (28)

Diastereoizomerycznie czyste monomery oksatiafosfolanowe **34** były poddawane w roztworze acetonitrylu reakcji z 5'-hydroksylową grupą nukleozydu **39** (bądź oligonukleotydem) wobec silnie zasadowego aktywatora jakim jest 1,8-diaza-bicyklo[5.4.0]-undek-7-en (DBU) (Schemat 7). W pierwszym etapie reakcji zaktywowany przez DBU 5'-hydroksylowy atom tlenu atakuje oksatiafosfolanowy atom fosforu powodując otwarcie pięcioczłonowego pierścienia z utworzeniem nietrwałego związku pośredniego **40** o strukturze triestru 2-merkaptoetylowego. Przebiegająca następnie w warunkach reakcji spontaniczna eliminacja episiarczku **41** prowadziła do utworzenia dinukleotydu **42** z wiązaniem internukleotydomowym o charakterze diestru tiofosforanowego. Otwarcie pierścienia oksatiafosfolanowego okazało się być procesem chemoselektywnym i stereospecyficznym (retencja konfiguracji), którego siłę napędową stanowiło napężenie pierścienia 1,3,2-oksatiafosfolanowego. Natomiast różnice w energii dysocjacji endocyklicznych wiązań P-O i P-S decydują o chemoselektywności reakcji.



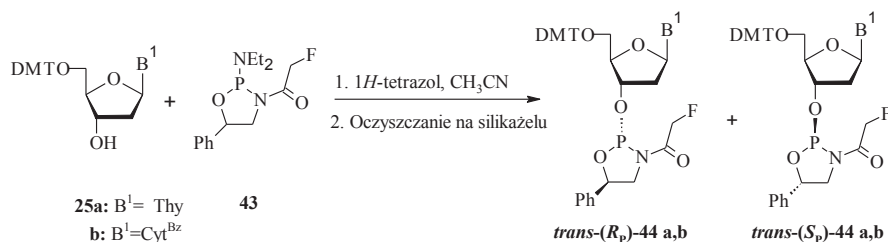
Schemat 7. Stereokontrolowana synteza oligonukleozydotiofosforanów na fazie stałej metodą oksatiafosfolanową

Scheme 7. Stereocontrolled synthesis of phosphorothioate oligonucleotides on solid phase by oxathiaphospholane method

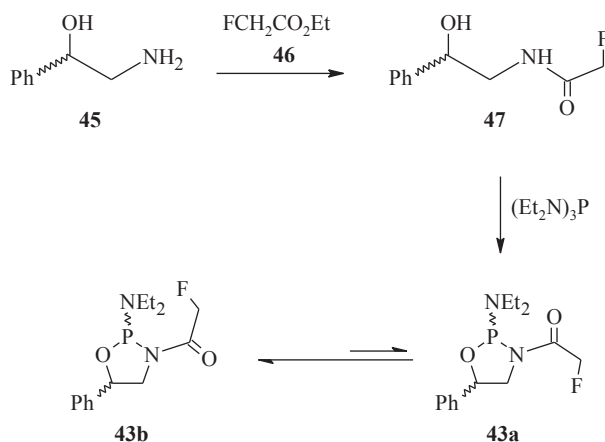
Powtórzenie powyższego cyklu reakcji z następczym odblokowaniem i odcięciem oligonukleotydu **42** od złoża za pomocą wodnego roztworu amoniaku pozwalało otrzymywać z bardzo dobrymi wydajnościami oligonukleotydotiofosforany zawierające w swoim szkielecie wiązania internukleotydydowe wyłącznie o konfiguracji absolutnej atomu fosforu *S<sub>p</sub>* lub *R<sub>p</sub>*.

W zaproponowanej znacznie później przez Beaucage'a [19] i współpracowników synteze stereoregularnych oligonukleozydotiofosforanów wykorzystano jako monomery nukleozydo-3'-*O*-(3-*N*-acylo-1,3,2-oksazafosfolidynowe) pochodne **44**, które posiadały chiralny P-III atom fosforu (Schemat 8). Monomery **44** powstawały w reakcji odpowiednio chronionych nukleozydów **25** z 2-(dietylamino)-3-*N*-acylookszafosfolidynową pochodną **43**. Związki **44** były w kolejnym etapie rozdzielane na P-diastereomery techniką chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Jednakże wydajność, z jaką wyizolowano poszczególne izomery była niska (20–26%) ze względu na ich niestabilność w procesie chromatograficznego rozdzielania.



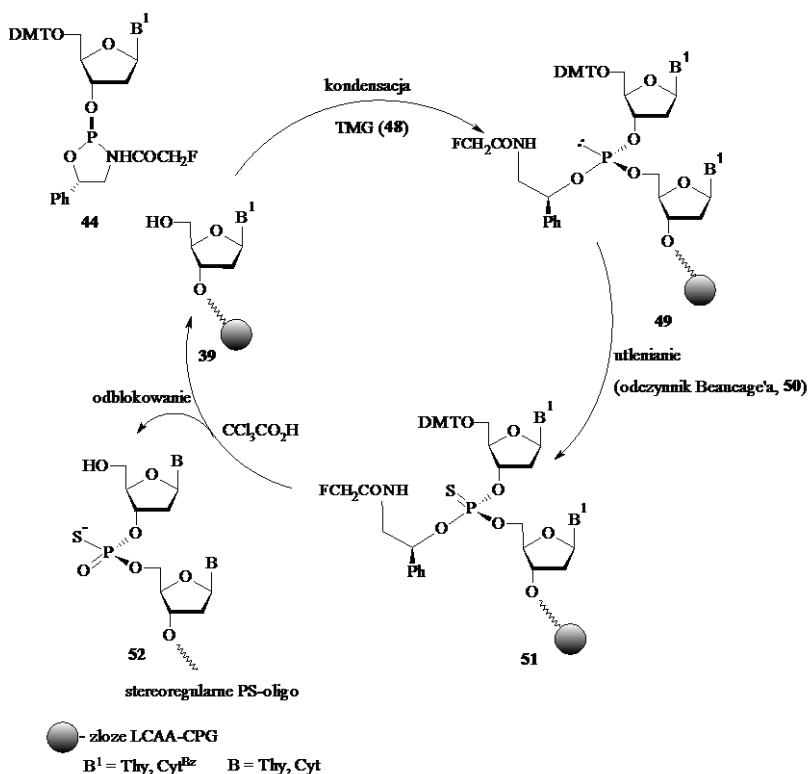
Schemat 8. Synteza nukleozydo-3'-*O*-(3-*N*-acylo-1,3,2-oksazafosfolidynowych) monomerów **44**Scheme 8. Synthesis of nucleoside 3'-*O*-(3-*N*-acyl)oxazaphospholidine monomers **44**

Zastosowana oksazafosfolidynowa pochodna **43** otrzymana była z ( $\pm$ )-2-amino-1-fenyletanolu (**45**) w dwuetapowej syntezie. W pierwszym etapie związek **45** został przekształcony wobec fluoroocetanu etylowego (**46**) w odpowiedni amidoalkohol **47** (Schemat 9).

Schemat 9. Synteza związku **43**Scheme 9. Synthesis of compound **43**

Następnie reakcja związku **47** z tris(dietyloamino)fosfiną prowadziła do cyklicznego *N*-acyloamidofosforynu **43** [w formie dwóch rotamerów (**43a** i **43b**)].

Monomery **44** w stereospecyficzny sposób reagowały wobec *N,N,N',N'*-tetrametyloguanidyny (TMG, **48**) z 5'-hydroksylową grupą nukleozydu **39** związanego ze stałym podłożem. Otrzymany w ten sposób fosforyny (1,1-diokso-3*H*-1,2-benzoditiol-3-on, **50**) do odpowiedniego dinukleozydotiofosforanu **51** (Schemat 10).



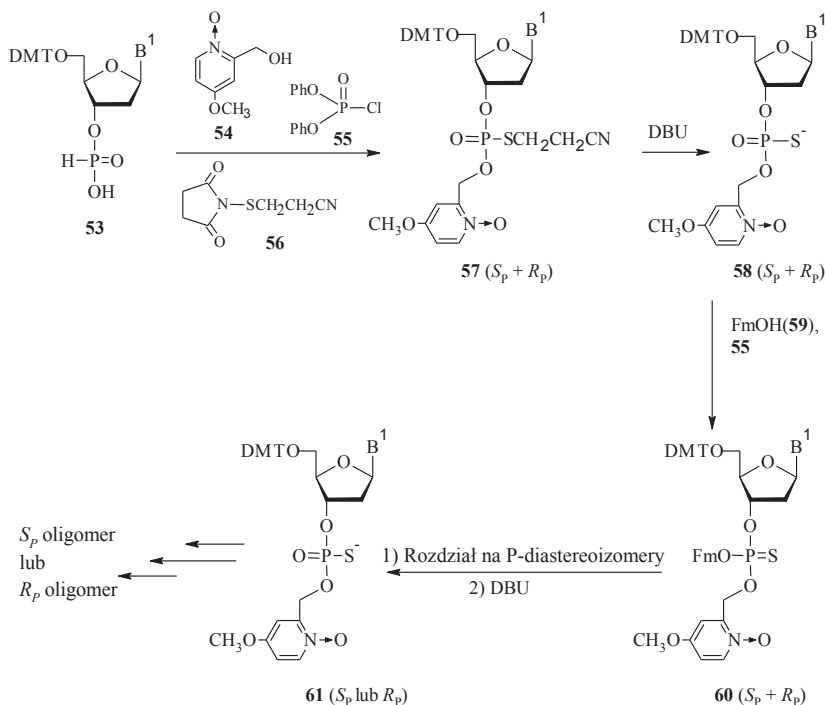
Schemat 10. Synteza oligonukleozydotiofosforanów na fazie stałej z wykorzystaniem monomerów 52  
 Scheme 10. Solid phase synthesis of PS-oligos using monomers 52

Finalny produkt **52** został otrzymany poprzez usunięcie grup ochronnych z zasad azotowych oraz z wiązania internukleotydu odpowiednio za pomocą wodnego roztworu amoniaku i kwasu octowego. Stosując opisaną metodologię Beaucage i współpracownicy otrzymali na nośniku stałym między innymi 11-merowy homotymidylanowy tiofosforan o konfiguracji *R<sub>p</sub>* na wszystkich atomach fosforu [all *R<sub>p</sub>*-d[(Tps)<sub>10</sub>T].

Pośród innych metod syntezy oligonukleozydotiofosforanów wykorzystujących otrzymane na drodze chromatograficznego rozdzielania diastereomerycznie czyste monomery na uwagę zasługują prace zapoczątkowane przez Efimova dotyczące wykorzystania monomerów zawierających ugrupowanie 4-metoksy-1-oksydo-2-pikolinowe jako nukleofilowy katalizator w tworzeniu internukleotydu wiązań tiofosforanowych [20].

Efimov opisał automatyzowaną syntezę P-chiralnych tiofosforanowych analogów zarówno DNA jak i RNA, gdzie kluczowymi związkami były „pikolilowe” monomery **61** (Schemat 11) otrzymane w kilku etapowej syntezie, w której substratem był 3'-*H*-fosfonian nukleozydu **53** [21]. W pierwszym został on przekształcony w triester **57** pod działaniem 1-tlenku 4-metoksy-2-pirydynometanolu (**54**) wobec chlo-

rofosforanu difenyłu (**55**) jako odczynnika kondensującego i *N*-(2-cyanoetylomerkpto)imidu kwasu bursztynowego (**56**). Następnie grupa  $\beta$ -cyanoetylowa usuwana była z atomu siarki za pomocą DBU, a otrzymany tiofosforan **58** kondensowany był z 9-fluorenylometanolem (**59**, FmOH).



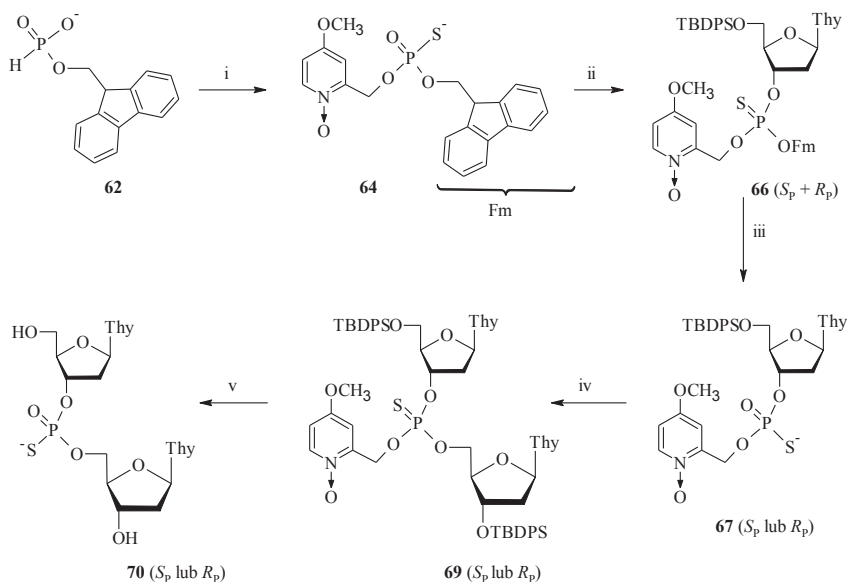
Fm= 9-fluorenylometyl; B<sup>1</sup>= chronione nukleozasady

Schemat 11. Synteza stereoregularnych oligonukleozydotiofosforanów z wykorzystaniem *O*-nukleofilowej katalizy wewnątrzcząsteczkowej

Scheme 11. Synthesis of stereoregular phosphorothioate oligonucleotides using *O*-nucleophilic intramolecular catalysis

Powstały w ten sposób triester **60** był rozdzielony chromatograficznie na *P*-diastereoizomery, po czym reszta 9-fluorenylometylowa została usunięta pod działaniem DBU. Otrzymane w ten sposób *P*-chiralne monomery **61** wykorzystane zostały do syntezy na fazie stałej stereozdefiniowanych oligonukleozydotiofosforanów.

Ugrupowanie „pikolinowe” jako nukleofilowy katalizator w tworzeniu internukleotydu wiązania tiofosforanowych zostało również wykorzystane przez Stawińskiego w syntezie *P*-diastereomerycznych ditymidyl-(3'-5')tiofosforanów (**70**) [22]. Kluczowym związkiem pośrednim w tym przypadku był odpowiedni triester **66** (Schemat 12) powstający w reakcji tiofosforylacji 5'-*O*-*tert*-butylo-difenylosililotymidyny (**65**) za pomocą 4-metoksy-1-oksydo-2-pikolilo-(9-fluorenylometyl)-tiofosforanu (**64**) wobec 2-chloro-5,5-dimetylo-2-okso-1,3,2-dioksafosforinanu (**63**, NEPCl).



i: 1) 1-tlenek 4-metoksy-2-pirydynometanolu (**54**), NEP-Cl (**63**), Py; 2) H<sub>2</sub>O; 3) S<sub>8</sub>; ii: 5'-TBDPS-T (**65**), **63**, Py; iii: 1) rozdział na P-diastereoizomery; 2) *t*-BuNH<sub>2</sub>, Py; iv: 3'-TBDPS-T (**68**), **63**, Py; v: 1) TEA-PhS; 2) F<sup>-</sup>

Schemat 12. Stereospecyficzna synteza ditymidyl-(3'-5')tiofosforanów (**70**) z wykorzystaniem nukleofilowej katalizy wewnątrzcząsteczkowej

Scheme 12. Stereospecific synthesis of dithymidyl-(3'-5') phosphorothioates (**70**) based on intramolecular nucleophile catalysis

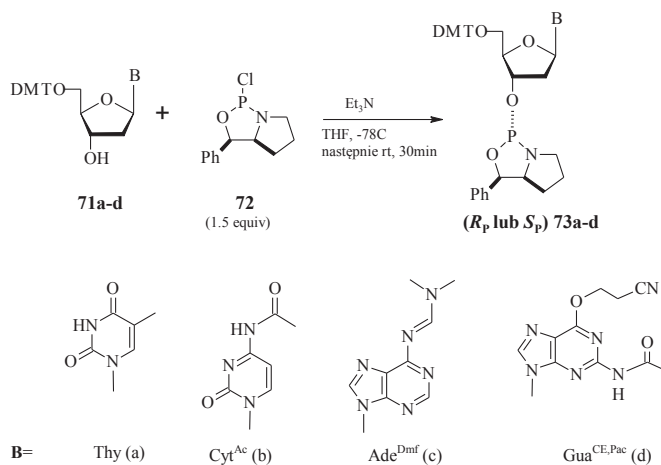
Zastosowany odczynnik **64** został otrzymany poprzez działanie na 9-fluorenylometylofosfonian (**62**) 1-tlenkiem 4-metoksy-2-pirydynometanolu (**54**), z następczym usiarczeniem tworzącego się fosforynu za pomocą elementarnej siarki. Wprowadzenie dużego podstawnika 9-fluorenylometylowego w strukturę związku **66** pozwoliło na stosunkowo łatwe rozdzielanie go na P-diastereoizomery metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. W kolejnym etapie wspomniana grupa usuwana była za pomocą *tert*-butyloaminy, a uzyskane na tej drodze, poszczególne P-diastereoizomery **67** kondensowane były z 3'-*O*-*tert*-butylodifenylosililotyminy (**68**) w obecności NEPCl (**63**) jako odczynnika kondensującego. Powyższa reakcja zachodziła ilościowo, a co najważniejsze w sposób całkowicie stereospecyficzny.

Grupy ochronne w otrzymanych związkach **69** były usuwane w pierwszym etapie za pomocą układu trójetyloaminatiofenol (reszta „pikolilowa”), a następnie pod działaniem anionu fluorkowego (grupy *tert*-butylo-difenylosililowe). Uzyskane tiofosforany **70** zostały następnie poddane trawieniu enzymatycznemu dzięki czemu przypisano im odpowiednią konfigurację na atomie fosforu (*R<sub>p</sub>* lub *S<sub>p</sub>*).

### 5.3. STEREOSELEKTYWNA SYNTEZA MONOMERÓW I ICH ZASTOSOWANIE DO SYNTEZY STEREOREGULARNYCH OLIGONUKLEOZYDOTIOFOSFORANÓW

Wadą zarówno metody oksatiafosfolanowej jak i metody opartej na wykorzystaniu cyklicznych *N*-acetyloamidofosforynów 2'-deoksyrybonukleozydów **44** jest konieczność chromatograficznego rozdzielenia odpowiednich monomerów na poszczególne *P*-epimery. Dodatkowo w obu podejściach kondensacja z kolejnym nukleozydem zachodzi wobec silnej zasady (DBU, TMG). Stąd też były podejmowane próby otrzymania w stereoselektywny sposób monomerów, które byłyby wykorzystane do syntezy *P*-chiralnych oligonukleozydotiofosforanów [23].

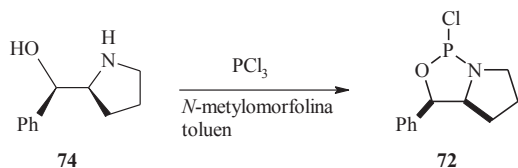
Ostatecznie problem ten został rozwiązany przez Wadę [24], który opracował strategię syntezy stereoregularnych oligonukleozydotiofosforanów opartą na oksazafosfolidynowych pochodnych nukleozydów oryginalnie zaproponowanych przez Agrawala [23c]. Istotą metody Wady są diastereoizomerycznie czyste bicykliczne monomery 1,3,2-oksazafosfolidynowe **73** (Schemat 13) otrzymane w sposób stereoselektywny w reakcji odpowiednio blokowanych nukleozydów **71** z odczynnikiem fosfitylującym **72** wobec trietyloaminy.



Schemat 13. Synteza bicyklicznych monomerów 1,3,2-oksazafosfolidynowych **73**

Scheme 13. Synthesis of bicyclic 1,3,2-oxazaphospholidine monomers **73**

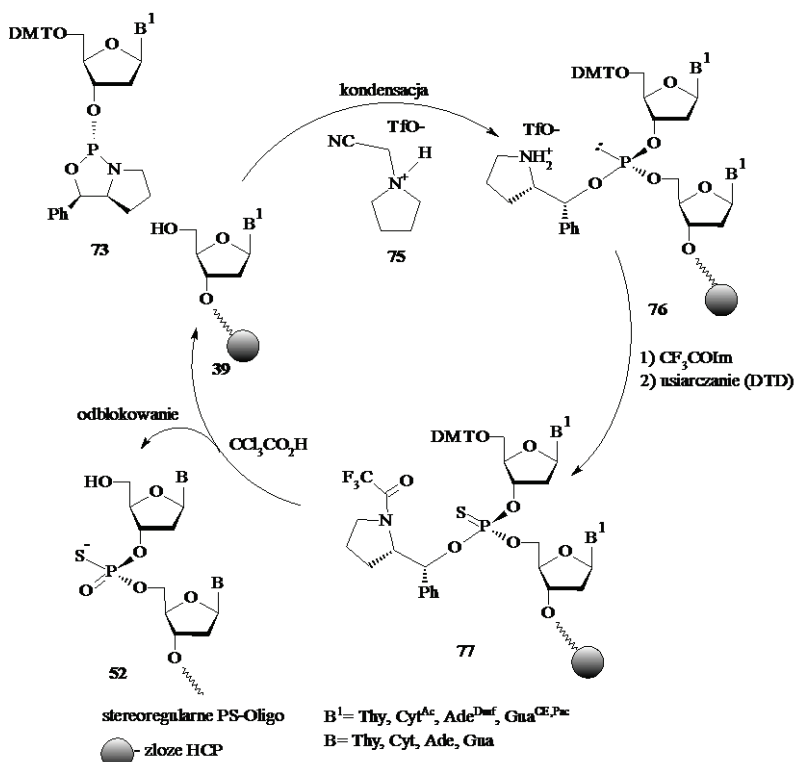
Zastosowany w syntezie odczynnik fosfitylujący, [4*S*, 5*R*]-2-chloro-1,3,2-oksazafosfolidyna **72**, otrzymany został w reakcji enancjomerycznie czystego aminoalkoholu **74**, będącego pochodną *L*-proliny, z trichlorkiem fosforu (PCl<sub>3</sub>) wobec *N*-metylomorfoliny (Schemat 14) [25].



Schemat 14. Synteza odczynnika fosfitylującego 72

Scheme 14. Synthesis of phosphitylating reagent 72

Aktywacja związków **73** polegała na protonowaniu atomu azotu za pomocą trifluorometanosulfonianu *N*-(cyjanometylo)pirolidynowego (CMPT, **75**). Diastereoselektywność kondensacji **73** z 5'-hydroksylową grupą drugiego nukleozydu związanego ze stałym podłożem (**39**) wynosiła 99:1 (Schemat 15).



Schemat 15. Synteza stereoregularnych oligonukleozydotiofosforanów metodą oksazafosolidynową

Scheme 15. Synthetic cycle for stereoregulated PS-oligos by the oxazaphospholidine method

Prześciowo utworzony fosforin **76** był utleniony za pomocą disiarczku *N,N'*-dimetylotiuramu (DTD) do tiofosforanu **77**. Usunięcie grupy dimetoksytrytylowej z funkcji 5'-hydroksylowej w **77** oraz powtórzenie powyższego cyklu *n*-razy pozwalało na otrzymanie stereoregularnych oligonukleozydotiofosforanów (**52**) o długości od 8 do 12 nukleotydu. Oligonukleotydy odblokowywane były i odcinane od złoża za pomocą wodnego roztworu amoniaku.

## PODSUMOWANIE

Jakkolwiek wśród różnorodnych analogów oligonukleotydów modyfikowanych w ugrupowaniu fosforanowym oligonukleozydotiofosforany należą do najwcześniej opisanych w literaturze chemicznej oraz najlepiej poznanych związków tej klasy, to metody otrzymywania związków zawierających stereozdefiniowane internukleotydowe wiązania tiofosforanowe zostały zaproponowane znacznie później.

Stąd też w 1998 roku został zarejestrowany przez FDA (Amerykańską Agencję do Spraw Leków i Żywności) w postaci mieszaniny diastereoizomerów pierwszy lek antysensowy pod nazwą handlową Vitravene. Pod względem chemicznym jest on 21-merowym oligonukleotydem tiofosforanowym stosowanym w leczeniu zapalenia siatkówki wywołanego wirusem cytomegalii (CMV) u pacjentów z Zespołem Nabytego Upośledzenia Odporności (AIDS) [26]. Vitravene podawany jest poprzez bezpośrednią iniekcję do oka.

Wiele oligonukleozydotiofosforanów jest obecnie na różnych etapach badań klinicznych [27]. W 2013 roku FDA dopuściło do leczenia hipercholesterolemii Mipromersen (nazwa handlowa Kynamro) [28]. Pod względem budowy chemicznej jest to oligonukleozydotiofosforan w którym centralny fragment zbudowany jest z jednostek deoksyrybonukleotydowych natomiast na obu końcach wstępują rybonukleotydy, w których funkcja 2'-hydroksylowa chroniona jest grupą metylową (2'-O-Me).

Pomimo zaznaczonych powyżej przykładów terapeutyczne zastosowanie tiofosforanowych analogów kwasów nukleinowych w medycynie niesie za sobą również istotne ograniczenia, a nawet zagrożenia. Należy pamiętać, że główną wadą oligonukleozydotiofosforanów jest ich zdolność do wiązania się z pewnymi białkami, w szczególności takimi, które mogą oddziaływać z polianionami [29]. Do tej grupy należą na przykład białka wiążące heparynę. Mechanizm tego typu niespecyficznego interakcji nie jest jeszcze w pełni poznany, chociaż wiadomo, że skutkiem tych oddziaływań może być zwiększona toksyczność oligonukleozydotiofosforanów w komórkach. Ponadto, istotny problem stanowi również trwałość tychże związków w organizmie człowieka. W rzeczywistości jedynie diastereomer Sp jest odporny na działanie wewnątrzkomórkowych nukleaz [30]. Jak wskazują liczne badania diastereomer Rp, tak jak naturalne oligonukleotydy, jest wrażliwy na działanie tych enzymów. Z drugiej jednak strony tiofosforany typu Sp wywierają destabilizujący efekt na strukturę tworzonych przez nie dupleksów, jak również kompleksów oligonukleotyd/mRNA, czego odzwierciedleniem jest spadek ich temperatury mięknięcia w porównaniu do dupleksów utworzonych przez niemodyfikowane oligonukleotydy.

Niemniej jednak istniejąca obecnie możliwość syntezy stereozdefiniowanych oligonukleozydotiofosforanów ma szczególne znaczenie w kontekście ich terapeutycznego wykorzystania. Kiedy tworzą one podwójne helisy z komplementarnymi oligonukleotydami, podstawniki na chiralnych atomach fosforu są skierowane do wewnątrz lub na zewnątrz dużej bruzdy helisy w zależności od konfiguracji abso-

lutnej na każdym atomie fosforu. W rezultacie na własności takich dupleksów (np. termiczną stabilność) ma wpływ konfiguracja na atomach fosforu. Stąd też efekt terapeutyczny może być uzależniony od stereochemii wiązania internukleotydo-  
wego [31].

Niewątpliwie stereoregularne P-chiralne analogi naturalnych oligonukleoty-  
dów na pewno będą znajdowały coraz szersze zastosowanie zarówno w medycynie  
(terapię antysensowe) jak i w biologii molekularnej jako tzw. sondy molekularne  
pozwalające na selektywne związanie i wykrycie określonych substancji.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Y.C. Zhang, M.M. Taylor, W.K. Samson, M.I. Phillips, *Methods in Molecular Medicine, Antisense Therapeutics*, 2nd ed. (Edited by: I. Phillips © Humana Press Inc., Totowa, NJ), 2005, **106**, 11.
- [2] L. Vidal, S. Blagden, G. Attard, J. de Bono, *Eur. J. Cancer*, 2005, **41**, 2812.
- [3] J. Kurreck, *Eur. J. Biochem.*, 2003, **270**, 1628.
- [4] a) F. Eckstein, *Tetrahedron Lett.*, 1967, **8**, 1157; b) F. Eckstein, *Tetrahedron Lett.*, 1967, **8**, 3495.
- [5] M.D. Matteucci, M.H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 3185.
- [6] W. J. Stec, G. Zon, W. Egon, B. Stec, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 6077.
- [7] W.J. Stec, A. Wilk, *Angew. Chem. Int. Ed. English*, 1994, **33**, 709.
- [8] a) E. Ohtsuka, M. Shiraishi, M. Ikehara, *Tetrahedron*, 1985, **41**, 5271; b) Hayakawa, Y. Hirabayashi, M. Hyodo, S. Yamashita, T. Matsunami, D.M.-. Cui, R. Kawai, H. Kodama, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 3834.
- [9] a) P.M.J. Burgers, F. Eckstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1978, **75**, 4798; b) P.M.J. Burgers, F. Eckstein, *Biochemistry*, 1979, **18**, 592.
- [10] K.K. Chacko, K. Lindner, W. Saenger, P.S. Miller, *Nucleic Acids Res.*, 1983, **11**, 2801.
- [11] J.K. Frederiksen, J.A. Piccirilli, *Methods Enzymol.*, 2009, **468**, 289.
- [12] a) A. Wilk, W.J. Stec, *Nucleic Acids Res.*, 1995, **23**, 530; b) Y. Tamura, H. Miyoshi, T. Yokota, K. Makino, A. Murakami, *Nucleosides Nucleotides*, 1998, **17**, 269.
- [13] R. Cosstick, F. Eckstein, *Biochemistry*, 1985, **24**, 3630.
- [14] a) H. Matzura, F. Eckstein, *Eur. J. Biochem.*, 1968, **3**, 448; b) F. Eckstein, V.W. Armstrong, H. Sternbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, **73**, 2987; c) P.M.J. Burgers, F. Eckstein, *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 6889.
- [15] a) T. Wada, N. Kobayashi, T. Mori, M. Sekine, *Nucleosides Nucleotides*, 1998, **17**, 351; b) K. Seio, K. Kumura, J.-C. Bologna, M. Sekine, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 3849.
- [16] H. Almer, J. Stawinski, R. Stromberg, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, 1459.
- [17] Y. Hayakawa, Y. Hirabayashi, M. Hyodo, S. Yamashita, T. Matsunami, D.-M. Cui, R. Kawai, H. Kodama, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 3834.
- [18] a) W.J. Stec, A. Grajkowski, B. Karwowski, A. Kobyłańska, M. Koziolkiewicz, K. Misiura, A. Okruszek, A. Wilk, P. Guga, M. Boczkowska, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 12019; b) W.J. Stec, B. Karwowski, M. Boczkowska, P. Guga, M. Koziolkiewicz, M. Sochacki, M.W. Wiczorek, J. Błaszczyk, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 7156.
- [19] A. Wilk, A. Grajkowski, L.R. Phillips, S.L. Beaucage, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 2149.
- [20] V.A. Efimov, A.A. Buryakova, S.V. Reverdatto, O.G. Chakhmakhcheva, Yu. A., Ovchinnikov, *Nucleic Acids Res.*, 1983, **11**, 8369.
- [21] V.A. Efimov, N.S. Molchanova, O.G. Chakhmakhcheva, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2007, **26**, 1087.



- [22] H. Almer, T. Szabo, J. Stawinski, *Chem. Commun.*, 2004, 290.
- [23] a) Y. Lu, G. Just, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, **39**, 4521; b) R.P. Iyer, D. Yu, N.-H. Ho, W. Tan, S. Agrawal, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, **6**, 1051; c) R.P. Iyer, M.-J. Guo, D. Yu, S. Agrawal, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 2491.
- [24] a) N. Oka, T. Wada, K. Saigo, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 8307.
- [25] N. Oka, M. Yamamoto, T. Sato, T. Wada, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 16031.
- [26] M.D. De Smert, C.J. Meenken, G.J., van den Horn, *Ocul. Immunol. Inflamm.*, 1999, **7**, 189.
- [27] H.L. Lightfoot, J. Hall, *Nucleic Acids Res.*, 2012, **40**, 10585.
- [28] Dane zaczerpnięte ze strony internetowej: [www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm337195.htm](http://www.fda.gov/newsevents/newsroom/pressannouncements/ucm337195.htm).
- [29] D.A. Brown, S.H. Kang, S.M. Gryaznov, L. DeDionisio, O. Heidenreich, S. Sullivan, X. Xu, M.I. Nerenberg, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 26801.
- [30] N. Dias, C.A. Stein, *Mol. Cancer Ther.*, 2002, **1**, 347.
- [31] H. Jahns, M. Roos, J. Imig, F. Baumann, Y. Wang, R. Gilmour, J. Hall, *Nature Comm.*, **6**, 2015, Article nr: 6317, doi:10.1038/ncomms7317
- [32] (a) B.C. Froehler, *Tetrahedron Lett.*, 1986, **27**, 5575; (b) B.C. Froehler, [w:] *Methods in Molecular Biology*, Vol. 20: *Protocols for Oligonucleotides and Analogues*, S. Agrawal (Red.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1993, str. 63.

Praca wpłynęła do Redakcji 8 września 2015

