



(12)

BREVET DE INVENTIE

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: **148926**

(22) Data de depozit: **09.12.1991**

(30) Prioritate: **11.12.1990-DE-P4039488.3**

(41) Data publicării cererii:
BOPI nr.

(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului:
29.11.1996 BOPI nr. **11/1996**

(45) Data eliberării și publicării brevetului:
BOPI nr.

(61) Perfecționare la brevet:
Nr.

(62) Divizată din cererea:
Nr.

(86) Cerere internațională PCT:
Nr.

(87) Publicare internațională:
Nr.

(56) Documente din stadiul tehnicii:
PCT/US 87/01422

(71) Solicitant: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT, Frankfurt/Main, DE**

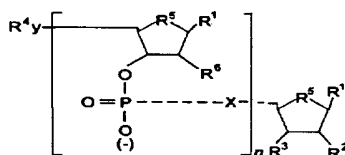
(73) Titular: **(71)**

(72) Inventatori: **Joachim Engels, Mathias Herrlein, Renate Konrad, Matthias Mag, DE**

(74) Mandatar: **S.C. ROMINVENT S.A., București, RO**

(54) Nucleozide, nucleotide și oligonucleotide, cuplate cu coloranți fluorescenți și procedeu de obținere a acestora

(57) **Rezumat:** Invenția de față se referă la nucleozide, nucleotide sau oligonucleotide, cuplate cu coloranți fosforici, având formula generală I:



(i)

De asemenea, invenția mai conține și un procedeu de obținere a acestor compuși, care se utilizează în sinteza diverselor nucleozide, nucleotide și oligonucleotide ADN și ARN; la detectarea fluorescentmicroscopică și fluorescentmacroscopică *in vivo* și *in vitro*; la sinteze de contracatene.

Revendicări: 6

RO 111575 B1



Invenția de față se referă la nucleozide, nucleotide și oligonucleotide, cuplate cu coloranți fluorescenți și la un procedeu de obținere a acestora.

Oligonucleotidele marcate și-au găsit deosebit de multe utilizări în tehnologia genelor, deoarece manipularea lor este mai ușoară decât a sondelor ADN folosite până acum ca probe de hibridizare, și care se obțin prin digerarea de restricție din materialul genetic nativ.

Oligonucleotidele, care se folosesc sub forma așa numitelor oligonucleotide ADN "antisens", pot acționa în mod regulator în fenomenul din celulă și câștigă cu aceasta o importanță din ce în ce mai mare, de exemplu, pentru cercetarea *in vivo* a expresiei proteinelor. Mecanismul decurge, conform cunoștințelor actuale, prin acțiuni de schimb ADN-ADN, ADN-ARN și ARN-ARN, dar nu este încă clarificat în detaliu.

In vitro servesc oligonucleotidele marcate, de exemplu, pentru identificarea fragmentelor de gene în cadrul unei bănci de gene, sondând și identificând cu ajutorul oligonucleotidei marcate probele colorate ale băncii de gene.

Pentru a putea realiza astfel de cercetări *in vitro* sau *in vivo*, oligonucleotidele trebuie marcate, așa cum s-a menționat deja. Pe lângă marcarea radioactivă prin izotopi adecvați, se folosesc deja, ca formă a unei modificări neradioactive, coloranți de fluorescență, care dau posibilitatea unei manipulări mai ușoare și nepericuloase.

Până acum s-a folosit o asemenea tehnică cu succes, pentru secvențarea ADN. În această ordine de idei, s-au realizat începuturi bazate în principal pe metoda lui Sanger (F.Sanger, S.Nickeln și S.Coulson, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74, 5463 (1977)).

Adaosul de fluorescență se prinde, fie la capătul 5' al oligonucleotidei (L.E. Hood, L.M. Smith și C.Heiner, Nature 321, 674 (1986)), sau la baza nucleului (J.M.Prober, G.L.Trainor și R.J.Dam, Science 238, 336 (1987)) (G.L. Trainor, Anal.Chem. 62, 418, (1990)). Un dezavantaj esențial al procedurii

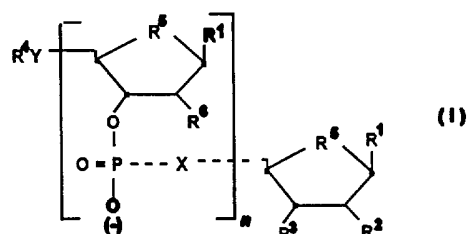
menționat la urmă se bazează pe faptul că adaosul de fluorescență se introduce în timpul sintezei, adică în timpul polimerizării. Această treaptă de procedeu are drept consecință, faptul că se mai pot introduce pentru sinteză numai câteva polimeraze, că accepția trifosfaților prin polimerază scade și că în afară de aceasta este necesar un exces mare de substrat.

Introducerea adaosului de fluorescență nu este însă limitată la secvențarea Sanger. Este cunoscută și secvențarea chimică după Maxam-Gilbert cu adaosul de fluorescență (H.Voss, C. Schwager, U.Wirkner, B.Sproat, J.Zimmermann, A.Rosenthal, H.Erfle, J.Stegemann și W.Ansorge, Nucl.Acids Res. 17, 2517 (1989)).

În mod analog la aceasta mai este descrisă și cartarea fragmentelor de restricție cu detectori de fluorescență (A.V.Carrano, J.Lamerdin, L.K.Aschworth, B.Watkins, E.Branscomb, T.Slezak, M.Raff, P.J. de Jong, D.Keith, L.McBride, S.Meister, M.Kronick, Genomics 4, 129, (1989)) și S.Brenner și K.J. Livak, Proc.Natl. Acad.Sci.USA 86, 8902 (1989).

Acum s-a găsit, că un colorant de fluorescență se poate cupla printr-o grupă amino sau tiol în poziția 3'-(2') (în așezarea *alfa* sau *beta*) a unei oligonucleotide și acest compus se poate folosi în mod favorabil pentru sinteza de contralinii în prezența unei linii de templat sau de oligonucleotide precum și pentru detectarea de material genetic *in vivo* și *in vitro*.

Astfel, invenția se referă la nucleozide, nucleotide și oligonucleotide cu coloranți fluorescenți având formula generală (I):



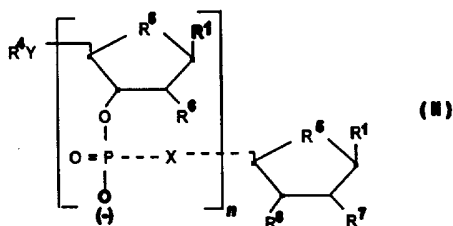
în care R¹ este o bază de purină sau pirimidină, cel puțin unul din radicalii R² și

R^3 este un colorant de fluorescență legat printr-o grupă de amino sau tiol în poziția *alfa* sau *beta* și celălalt radical reprezintă eventual hidrogen, o grupă hidroxil, o grupă hidroxil protejată sau metoxi în poziția *alfa* sau *beta*, n este un număr > 0 ; R^4 este o grupă de protecție 5' sau un radical fosfat, pirofosfat, trifosfat, R^5 este oxigen, fluormetilenă, difluormetilenă sau metilenă, R^6 reprezintă o grupă hidroxil sau metoxi, sau hidrogen în poziția *alfa* sau *beta*, R^1 , R^5 și R^6 putând avea semnificații identice sau diferite, Y și X este oxigen, sulf, NH sau un radical metilen, X și Y putând fi identici sau diferiți.

Invenția se referă și la un procedeu pentru obținerea nucleozidelor, nucleotidelor și oligonucleotidelor cuplate cu coloranți de fluorescență, prin transformarea grupei OH care se găsește în poziția 2' și/sau 3' a nucleozidei, nucleotidei sau oligonucleotidei, se transformă într-o grupă amino sau tiol și apoi se cuplează cu un colorant fluorescent. De asemenea, invenția mai conține utilizarea compuşilor cu formula generală I la: a) sinteza de contra-linii în prezența unei linii de templat; b) sinteza unor nucleotide definite; c) detectarea lor *in vivo* și *in vitro* și d) detectarea de acizi nucleici *in vivo* și *in vitro*.

Compușii cu formula generală I sunt sintetizați în esență conform metodelor cunoscute în literatură (M.Gait, Oligonucleotide Synthesis, JRL-Press, Oxford 1984).

Pentru cuplarea colorantului la poziția 3' și/sau 2', se pornește de la un compus cu formula (II), de preferință de la o nucleozidă.



Compusul cu formula II, în care R^1 - R^6 , X, Y și n au semnificațiile indicate mai sus, substituenții putând să fie identici sau diferiți și R^7 sau R^8 reprezintă

hidrogen, o grupă hidroxil, sau hidroxil protejat, sau metoxi, care se folosesc pentru cuplare. Cuplarea colorantului are loc prin grupa de hidroxil aflată în poziția 3' și/sau 2' prin introducerea unei amine sau a unui tiol.

Pentru introducerea azidei se introduce în poziția 3'-(2') o grupă Leaving. Ca grupă Leaving sunt valabile, de preferință, grupa triflat, mesilat sau tiosilat. Introducerea azidei are loc printr-un atac nucleofil cu azidă, de preferință azidă de litiu. Din atacul nucleofil al unui tiolat sau al unui tiolat protejat cu S, rezultă tiol sau tiolul protejat.

Stereochimia dorită a părții de zaharidă a nucleozidei se poate realiza cel mai bine prin substituții SN^2 .

Grupa amino se poate obține în mod simplu prin intermediul azidei și prin reducerea în continuare la amină (lit.: W.S.Mungall și R.L.Letsinger, J.Org. Chem. vol.40, nr.11, 1659 (1975)). Se preferă în această treaptă reacția Stauding cu trifenilfosfină și apă (Lit.: M.May și J.W.Engels, Nucl.Acids. Res. 17, 15, 5973 (1989)).

Toți compușii au fost determinați prin NMR, analiză elementară, UV, IR etc., în ceea ce privește constituția și configurația lor.

După terminarea policondensării, grupa liberă de 3'-(2')-amino sau de tiol a părții de zaharidă poate reacționa la capătul 3' al ADN cu un colorant de fluorescență conform procedeelor cunoscute în literatură, (Hunkapiller, Nucl. Acids. Res., 13, 2399, 1985; Hodges R.R. et al. Biochemistry, vol. 28, 261 (1989)).

În mod alternativ, grupa amino se obține și prin reacția Mitsunobu (Synthesis, vol.1, 1981, pg.1) și corespunzător reacției descrise de Yamamoto et al. (J.Chem. Soc. Perk. trans.I, 1, 306, 1980).

Cuplarea colorantului cu fluorescență prin grupa de tiol are loc în mod analog. Totuși, în loc de grupa de azidă, se poate introduce o grupă de tiol sub formă protejată sau neprotejată.

Cuplarea colorantului de fluorescență la grupa liberă amino sau la funcția de tiol al nucleozidei, nucleotidei sau

oligonucleotidei poate avea loc în mod alternativ și după utilizarea acestora. Este, de exemplu, posibil, să se realizeze reacția colorantului de fluorescență după treapta de terminație a reacției de sec-

vențare ADN sau ARN, prin aceea că întregul precipitat se marchează cu colorantul de fluorescență.

Drept colorant de fluorescență se pot utiliza în principiu toți coloranții care se pot obține în mod obișnuit din comerț, care reacționează cu o grupă amino sau tiol, de preferință, fluoresceine, rodamine, roșu de Texas, NBD (4-fluor-7-nitrobenzofurazan de la Sigma) cumarine, fluorecamine, succinilfluoresceine și dansile.

Amestecul de reacție derivatizat poate fi desfăcut printr-o gel-electroforeză și poate fi detectat prin fotometrie sau spectroscopie în laser (H.Swerdlow și R.Gesterland, Nucl.acids. Res. 18, p. 1415 (1990)). S-a dovedit a fi utilizabilă cu succes și electroforeza capilară (A.S. Cohen at al., P.N.A.S. US 85, 9660 (1988)), de exemplu cu geluri de acrilamidă, detectarea are loc apoi de preferință la ieșirea din capilar (H. Swerdlow, S.Wu, H.Harke, N.Dovich, Chromatography 516, 61 (1990)).

Pornind de la un compus cu formula I, care posedă în poziția 5' un trifosfat, se poate realiza cu ajutorul unui primer oarecare și a unei linii de templat cu ajutorul unei polimeraze, adică a unei enzime, care în prezența unor substraturi adecvate sintetizează o copie fidelă complementară a secvenței, în prezența a patru nucleozidtrifosfați, sinteza liniei duble de ADN, de preferință, cu ajutorul polimerazei T7 sau Taq, a polimerazei ADN I și a transcriptazei reverse. Ca grupe de protecție 5', sunt valabile grupa tritol, metoxi sau dimetoxitritol (Gait, Oligonucleotide Synthesis, JRL-Press, Oxford 1984).

Terminarea sintezei se poate determina în mod specific prin folosirea unei nucleotide A, C, G, T 3'-(2')-amino modificate cu formula I, în mod specific. Acest lucru este de o deosebită importanță pentru sinteza contraliniilor ADN în prezența unei linii de templat și

cu aceasta și pentru secvențarea liniilor ADN, deoarece folosirea unei nucleotide modificate realizează o întrerupere foarte specifică din punct de vedere a bazei reacției.

Sinteza nucleozidelor ARN, nucleotidelor și oligonucleotidelor are loc într-un mod analog.

În afară de aceasta, este posibilă sinteza oligonucleotidelor derivatizabile cu ajutorul unei nucleotide de pornire, care variază la capătul 3'-(2') ca amino sau tio și care a fost fixată la un purtător polimer.

Ca oligonucleotide sunt valabile toate nucleotidele ADN și ARN obținute în sensul de până acum, totuși, de preferință, într-o lungime de 2 până la 100, deosebit de preferabil 12 la 50 nucleotide (sinteză chimică) respectiv într-o lungime de până la cca. 3000 (nucleotide din sinteză enzimatică), în funcție de eficiența polimerazei utilizate.

Sinteza oligonucleotidelor are loc pornind de la complexul suport-nucleotide de pornire, în sensul de până acum, adică în direcția 3' și 5' și dă posibilitatea sintezei unei oligonucleotide cu secvență definită.

Fixarea nucleozidei ca materie primă de pornire, pe suportul obișnuit din comerț are loc printr-un braț de legătură care se poate scinda după sinteză; de exemplu, printr-o legătură cu acid succinic cunoscută în literatură, sau printr-o legătură cu uretan (Efimov et al. Nucl. Acids. Res. 11, 8369, 1983).

După ce sinteza a avut loc, oligonucleotida trebuie să fie scindată de suport cu ajutorul unor reactivi adecvați. Derivatizarea cu un colorant de fluorescență are loc direct după aceea.

Oligonucleotidel astfel sintetizate și modificate la capătul 3'-(2') pot să fie folosite apoi pentru detectarea de exemplu a oligonucleotidelor complementare.

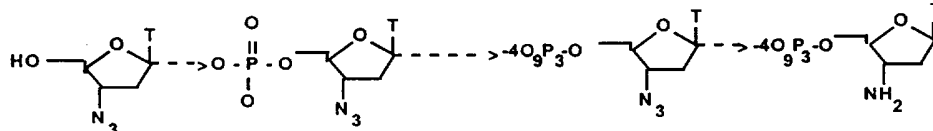
Invenția de față prezintă următoarele avantaje:

- obținerea unei contralinii marcate are loc în același timp cu ruperea liniei prin nucleotida finală 3'-(2')-amino sau tiomodificată;

7

- prin marcarea cu colorant de fluorescență a acesteia în poziția 3'-(2') este posibilă în afară de aceasta, o detectare fără pericole;

- la obținerea oligonucleotidelor definite exact, prin marcarea 3'-(2')-amino nucleotidei de pornire sau tiol-modificate cuplate de un suport, sinteza exactă a sintezei oligonucleotidei este legată cu posibilitatea marcării prin



5'-monofosfat-3'-azido-3'-deoxiribozid-timidină

3'-azidotimidină (sigma) (160 mg, 0,6 mmol) se dizolvă sub agitare în 10 ml trietilfosfat. Cu o pâlnie de picurare se adaugă soluției la 4°C, 0,2 ml POCl₃ în 6 ml trietilfosfat. După 24 h se neutralizează cu 50 ml de soluție saturată de NaHCO₃ și se scutură de câte două ori cu 60 ml toluen și 100 ml de eter. Faza apoasă se diluează cu apă distilată la 500 ml și se încarcă într-o coloană de schimbători de anioni (®Sephadex A-25; 50 x 2,5 cm), care prin încărcare în exces cu 200 ml tampon 0,2 M TBK (tampon de bicarbonat de trietilamoniu; pH-ul s-a autoreglat la 7,5) mai conține HCO₃⁻ drept contra-ion. Apoi se purifică prin încărcare în exces de apă distilată 300 ml și se eluează mai întâi cu 200 ml tampon 0,1 M TBK și apoi cu un gradient linear de 0,1-0,2 tampon M TBK (volum total de gradient 1350 ml). În cromatogramă se arată un maxim care este specific produsului. Produsul s-a eluat la o concentrație a tamponului de 0,12 până la 0,15 tampon TBK. Frațiunile pozitive de 20 ml DC se unifică și se concentrează prin uscare cu congelare. Bicarbonatul de trietilamoniu se îndepărtează prin adaos repetat de etanol. Produsul rezultă ca o sare albă, cristalină de trietilamoniu.

Cantitatea obținută: 220 mg (randament 56,2 %); greutate moleculară 651,81; R_f (amoniac: izoprop.:apă 10:70:20); 0,40; 300 MHz-¹H-NMR (D₂O): 1,36 (t, 3H, CH₃); 1,90 (s, 3H, CH₃); 2,50 (m, 4H, 2', 2''-H); 3,18-3,30 (dd,

8

fluorescență și cu o detectare exactă.

Se dau, mai jos, exemple de realizare a invenției.

Exemplul 1. (1) 3'-sau 2'-amino sau azido-nucleozid-5-trifosfați anomeri

Sinteza 5'-trifosfat-3'-amino-3'-de-zoxiribozid-timidinei are loc conform schemei de mai jos:

2H, CH₂); 4,10 (m, 1H, 4'-H); 4,3 (m, 1H, 3'-H); 6,31 (t, 1H, 1'-H); 7,7 (s, 1H, 6-H); 11,50 (s, 1H, NH), 300 MHz ³¹P-NMR (85 % = conc. H₃PO₄ extern, D₂O): 1,23 (s, 1P).

5'-trifosfat-3'-azido-3'-deoxiribozid-timidină

5'-monofosfat-3'-azido,2'-dezoiribozid-timină ca sare de trietilamoniu (130 mg, 0,2 mmol) se dizolvă în 6 ml DMF abs. (dimetilformamidă) și soluției i se adaugă la 25°C N',N'-carbonil-diimidazol (162,15 mg, 1 mmol) în 3 ml DMF abs. sub agitare. După un timp de reacție de 2 h, se adaugă 1 ml metanol abs., se agită încă 15 min și se îndepărtează metanolul prin distilare. Reziduul se tratează cu 5 ml dintr-o soluție 0,2 M de pirofosfat de tri-*n*-butilamoniu în DMF și se agită peste noapte la temperatura camerei. Se filtrează precipitatul și se agită peste noapte la temperatura camerei. Se filtrează precipitatul constând din pirofosfat de imidazol, se spală cu 20 ml DMF și se concentrează filtratul pe evaporatorul rotativ. Reziduul se dizolvă în 250 ml tampon TBK 0,1 M și soluția se încarcă într-o coloană de schimbător de anioni Sephadex A-25 încărcată cu HCO₃⁻. Se purifică produsul prin alimentarea în exces de 200 ml apă distilată și se eluează cu un gradient linear de 0 până la 0,5 M tampon TBK (volum total de gradient 2000 ml). În cromatogramă apar două maxime, dintre care prima este a produsului monofosfat, iar al doilea a produsului inițial. Produsul obținut s-a eluat la o concentrație a tamponului de 0,30 până la 0,35 M TBK. Frațiunile

9

pozitive de 20 ml se unifică și se concentrează prin uscarea cu congelare. Bicarbonatul de trietilamoniu se îndepărtează prin adaos repetat de etanol. Produsul rezultă ca sare albă, cristalină de trietilamoniu.

Cantitatea obținută: 92 mg (50,4 %); greutatea moleculară: 911,95; R_f (amoniac:izotrop:apă 10:70:20): 0,14; 300 MHz- ^{31}P -NMR (P-NMR (P-NMR (H_3PO_4 extern 85 %, D_2O): -10,74 (d, $^2J_{\text{pp}}=22,1$ Hz, 1P, atom *alfa*-P); -11,45 (d, $^2J_{\text{pp}}=21,9$ Hz, 1P, atom *gamma*-P); -22,99 (t, $^2J_{\text{pp}}=20,3$ Hz, 1P, atom *beta* P).

5'-triofosfat-3'-amino-3'-deoxi-ribozid-timidină

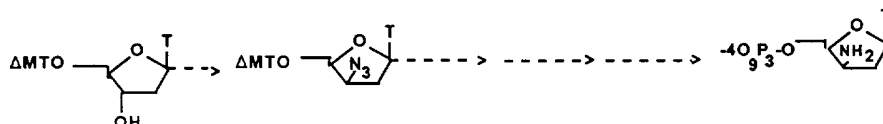
5'-triofosfat-3'-azido-3',2'-deoxi-ribozid-timină (68 mg, 0,75 mmol) se dizolvă în 5 ml dioxan-apă distilată (2:1) și se tratează sub agitare la temperatura camerei cu trifenilfosfină (200 mg, 0,75 mmol). Amestecul de reacție se agită la 25°C timp de 30 h și apoi se scoate solventul. Reziduul se dizolvă în 30 ml apă distilată și se extrage de trei ori cu câte 30 ml eter. Faza apoasă se diluează la 150 ml și se încarcă soluția într-o coloană de schimbător de anioni Sephadex A-25 încărcată cu HCO_3^- . Se purifică produsul prin trecerea prin exces a 200 ml de apă distilată peste el și se

10

eluează cu un gradient linear de tampon TBK, 0 până la 0,5 M (volum de gradient 2000 ml). Cromatograma arată trei maxime, din care primul reprezintă compusul de monofosfat 6, al doilea al produsului și al treilea vârful eductului 7. Produsul a fost eluat la o concentrație a tamponului de 0,40 până la 0,42 M TBK. Frațiunile pozitive de 25 ml se unesc și se concentrează prin uscare cu congelare. Bicarbonatul de trietilamoniu se îndepărtează prin adaos de etanol. Produsul rezultă sub forma unei sări albe-amorfe de trietilamoniu.

Cantitatea obținută: 57 mg (85,7 %); greutate moleculară: 885,90; R_f (amoniac: izoprop.: apă 10:70:20): 0,08; 300 MHz- ^1H -NMR (D_2O): 1,30 (t, 3H, CH_3); 1,92 (s, 3H, CH_3); 2,64 (m, 4H, 2', 2''-H); 3,19 - 3,21 (dd, 2H, CH_2); 4,26 (m, 1H, 4'-H); 4,41 (m, 1H, 3'-H); 6,34 (t, $^3J_{\text{pp}}=6,74$ Hz, 1H, 1'-H); 7,69 (s, 1H, 6-H); 11,50 (s, 1H, NH). 300 MHz- ^{31}P -NMR (H_3PO_4 extern 85 %, D_2O): -10,75 (d, $^2J_{\text{pp}}=22$ Hz, 1P; atom *alfa* P); -11,45 (d, $^2J_{\text{pp}}=21,9$ Hz, 1P, atom P *gamma*); -22,05 (t, $^3J_{\text{pp}}=20,4$ Hz, 1P, atom *beta* P).

Exemplul 2. Sinteza de 1-(3'-amino-2',3'-didezoxi-5'-trifosfat-*beta*-D-treopentofuranozil)-timină are loc conform schemei de reacție de mai jos:



1-(3'-azido-2',3'-didezoxi-5'-O-dimetroxiritol-beta-D-treopentofuranozil)-timină

La o soluție de 5'-dimetroxiriltimidină (descrierea vezi M. Gait, *Oligonucleotide Synthesis*, IRL Press (1984), p. 27) (5,98 g, 11 mmol), trifenilfosfină (3,076 g, 11,73 mmol) și azidă de litiu (3,1 g, 55 mmol) în 37 ml DMF uscat se adaugă sub agitare tetrabromură de carbon (11,91 mmol, 4,10 g). Se agită depunerea la temperatura camerei timp de 56 h și se adaugă apoi 15 ml metanol. Produsul se precipită apoi în 800 ml apă distilată rece ca gheața. Precipitatul se reia în cloroform și se purifică prin cromatografia în Flash (ester acetic: *n*-hexan =3:1). Valoarea R_f cloroform: metanol, 9:1 = 0,52. $1R$ (cm^{-1}): 2100 azidă, randament 80 %, 4,95 g.

tografia în Flash (ester acetic: *n*-hexan =3:1). Valoarea R_f cloroform: metanol, 9:1 = 0,52. $1R$ (cm^{-1}): 2100 azidă, randament 80 %, 4,95 g.

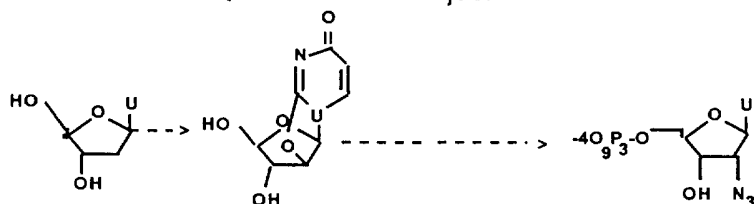
1-(3'-amino-2',3'-didezoxi-5'-O-dimetroxiritol-beta-D-treopentofuranozil)-timină.

La o soluție agitată de 1-(3'-azido-2',3'-didezoxi-5'-O-dimetroxiritol-beta-D-treopentofuranozil)-timină (0,5 g, 0,8 mmol) se adaugă 0,15 g trifenilfosfină (1,3 g, 4,94 mmol) și se lasă să reacționeze timp de 4 h.

Pentru hidrolizarea fosfiniminei amestecul se tratează cu 3 ml de apă distilată și se agită încă 3 h. După

separarea prin rotire a solventului se purifică uleiul rămas prin cromatografie cu flash (cloroform:metanol 99:1 = 1% trietilamină). Valoarea R_f în același mediu de circulație = 0,27. Amina se colorează în violet prin tratare cu ninhidrină în cromatografia în strat subțire (DC). Randament 87,5 %, 0,42 g. Produsul arată spectrul corespunzător $^1\text{H-NMR}$.

Pentru transformarea în continuare la 5'-trifosfat, deci în 1-(3'-amino-



[2,2'-anhidro-1-beta-arabinofuranosil]-uracil

La o soluție din 19 g (77,8 mmol) uridină și 22,2 g (103,6 mmol) difenilcarbonat în 75 ml dimetilformamidă abs. s-au adăugat 0,5 g (5,93 mmol) carbonat-hidrogen-sodiu. După o dizolvare completă se încălzește lichidul limpede incolor la o temperatură de 150°C timp de 30 min. După răcire, se toarnă soluția rece în eter absolut. Se decantează eterul de precipitatul format și se cristalizează produsul brut din 1650 ml metanol. După uscare se obține o pulbere albă, cristalină.

Punct de topire: 239°C; MS: 227; valoarea R_f : 0,31 clorură de metilen/metanol 8:2; randament 9,22 g (52,3 %) $^1\text{H-NMR}$ 60 MHz corespunde indicațiilor din literatură.

2'-azido-2'-deoxi-uridină

1,16 g (10 mmol) azidă de litiu se încarcă sub agitare în 25 ml DMPU absolut (1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2-(1-H)pirimidinol). Suspensia se încălzește la 120°C, soluția de reacție colorându-se în negru. După 3 zile se diluează soluția neagră cu 80 ml apă și se extrage de 2 ori cu 100 ml clorură de metilen. Se

2',3'-didezoxi-5'-trifosfat-beta-D-treopentofuranozil)-timină se îndepărtează grupa de dimetoxitritil, în mod analog ca la M.Gait Oligonucleotide synthesis, IRL Press p.49 (1984) și se realizează cuplarea trifosfatului la poziția 5', așa cum se menționează în exemplul 1.

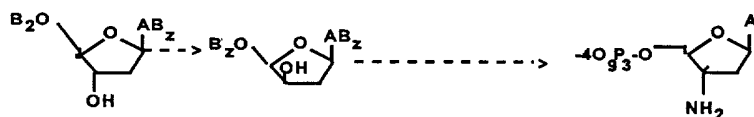
Exemplul 3. Prepararea 2'-amino-2'-desoxi-5'-trifosfat-uridinei, se realizează conform schemei de reacție de mai jos:

spală fazele organice reunite încă de patru ori cu apă și se concentrează într-un evaporator rotativ. Reziduul solid ca smoala se purifică cromatografic în coloană cu gel de silice. (Clorură de metilen/metanol) 8:2). După rotirea rezidului uleios negru se purifică încă de două ori pe bază de gel de silice (acetonă:metanol, 8:3 și acetonă: ester acetic, 1:1). Se obține o sticlă incoloră omogenă (DC) (valoarea R_f clorură de metilen/metanol 8:1=0,61. Cantitatea obținută 2,035 g (30 %). 1R (film de cloroform):

2120 cm ^1MS (FAB): 270. Produsul posedă spectrul așteptat $^1\text{H-NMR}$.

Prepararea 2'-amino-2'-deoxi-5'-trifosfat-uridinei are loc prin acilarea în poziția 3' selectivă a funcției hidroxil. Introducerea grupei 5'-trifosfat se realizează apoi în mod analog cu exemplul 1. După dezacilare la poziția 3' azida se reduce prin tratare cu trifenilfosfină (ca în exemplul 2) la amină.

Exemplul 4. Sinteza 3'-amino-2', 3'-didezoxi-5'-trifosfat-adenozinei se realizează conform schemei de reacție de mai jos:

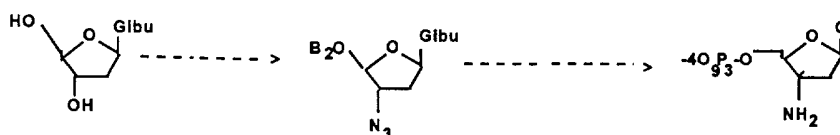


N⁶-benzoil-9-(5-O-benzoil-2-dezoxi-beta-D-treo-pentofuranozil)-adenină

O suspensie de 920 mg (2 mmol) N⁶,5'-O-dibenzoil-2'-deoxiadenozină (s-a preparat prin metoda descrisă de Nishino et al., Nucleosides & Nucleotides 1986, 5, 159) în 30 ml diclormetan abs. (conține 2 ml piridină) se răcește la 30°C și i se adaugă încet prin picurare 5 ml dintr-o soluție de anhidrină a acidului trifluormetansulfonic în diclormetan (10 vol.-%). După îndepărtarea băii de răcire, se lasă soluția să se încălzească și i se adaugă 1 ml de apă. După 3 h se adaugă încă 5 ml apă și se spală faza organică. După îndepărtarea solventului, reziduul rămas se dizolvă în 50 ml metanol și se adaugă 100 mg bicarbonat de sodiu. Se mai agită alte 2 h la temperatura camerei, se neutralizează cu acid acetic 10 %, se separă solventul prin distilare și se purifică prin cromatografie în flash peste gel de silice (cloroform:metanol 97:3). Cantitatea obținută 710 mg (1,48 mmol) 75 % valoarea R_f cloroform: metanol 97:3 = 0,49. MS = 459.

3'-azido-2',3'-didezoxiadenozină

O soluție de 920 mg (2 mmol) N⁶-benzoil-9-(5-O-benzoil-2-dezoxi-beta-D-treo-pentofuranozil)-adenină în 20 ml diclor-



Prepararea 3'-amino-2',3'-didezoxi-5'-trifosfat-guanozinei are loc pornind de la N²-izobutiril-5'-O-benzoil-2'-dezoxiguanozină, care se poate prepara prin metoda lui Nishino et al. (Nucleosides & Nucleotides 5, 159, 1986). Transformarea nucleozidei în 3'-azidă are loc analog cu prepararea descrisă în exemplul 4. Trebuie să se țină seama în acest caz, ca tratarea cu soluția amoniacală de metanol să nu se mai facă, deoarece îndepărtarea grupei de protecție izobutiril are loc abia după introducerea grupei de trifosfat și înainte de reducerea azidei la amină. Transformarea în trifosfat are loc și la guanozină după metoda menționată la exemplul 1. Reducerea la amină este

metan abs. (și 2 ml piridină) se răcește la 30°C. Apoi se adaugă prin picurare 5 ml (3 mmol) dintr-o soluție de anhidrină a acidului trifluormetansulfonic în diclormetan abs. Se îndepărtează baia de răcire, se agită încă 20 min și se adaugă la soluție 980 mg (20 mmol) azidă de litiu în 20 ml DMF. După o agitare de încă 2 h la RT, se adaugă 50 ml apă și 150 ml cloroform, faza organică se scutură și se spală cu apă distilată. Se îndepărtează solventul pe rotavapor și se tratează cu soluție amoniacală de metanol pentru îndepărtarea grupei de protecție a bazei peste noapte. După îndepărtarea din nou a solventului se purifică prin cromatografie în flash (cloroform: metanol 95:5) peste gel de silice. Cantitatea obținută: 430 mg (1,6 mmol, 79 %) pulbere albă, cristalină. IR: 2.100 cm⁻¹ grupă de azido.

3'-amino-2',3'-didezoxi-5'-trifosfat-adenozină

Obținerea trifosfatului 5' are loc în mod analog cu exemplul 1. Apoi se reduce azida ca în exemplul 2 la amină.

Exemplul 5. Sinteza 3'-amino-2',3'-didezoxi-5'-trifosfat-guanozinei se realizează conform schemei de mai jos:

descrisă în exemplul 2.

Sinteza 3'-amino-oligomerilor și marcarea ulterioară cu 3'-fluorescență.

Exemplul 6. Sinteza unui oligomer din 20 nucleotide

3'-H₂N-TTTTTTTTTTTTTTTTTT-5' are loc pornind de la 3'-amino-3'-dezoxitimidină protejată prin 5'-dimetoxitritil. Prepararea acestui compus are loc conform descrierii din exemplul 1. Se pornește în acest caz de la AZT (azido-3'-dezoxiribosid-timidină) protejată de 5'-dimetoxitritil care se poate prepara din AZT și clorură care se poate prepara din AZT și clorură de dimetoxitritil conform, care se poate prepara din AZT și clorură de dimetoxitritil, conform metodei lui

M.Gait (Oligonucleotide Synthesis, IRL Press 1984, pag.27).

Apoi, compusul se reduce, așa cum se descrie în exemplul 1, cu trifetilfosfină. Treapta următoare este prepararea materialului de suport. Pentru aceasta se încarcă 200 mg 5'-O-(4,4-dimetoxitritil)-3'-amino-3'-dezoxitimidină în 700 μ l piridină abs. La această soluție se adaugă 45 mg DMAP (dimetilaminopiridină) și apoi 40 mg anhidrida acidului succinic. După ce se lasă să stea peste noapte, se hidrolizează anhidrina rămasă a acidului succinic prin adaos de 10 μ l apă. Se co-evaporă de trei ori cu toluen și se preia reziduul în 12 ml clorură de metilen, se spală cu 4 ml acid citric rece (10 %) și de două ori cu 4 ml apă. Se usucă faza organică peste sulfat de sodiu, se concentrează volumul de solvent și se dizolvă substanța cu 1 ml clorură de metilen. Această soluție se lasă să picure încet sub agitare în 30 ml *n*-hexan. Precipitatul separat se absoarbe și se usucă la 40°C în vid cu pompa de ulei. Prepararea mai departe a materialului de suport pe bază de CPG are loc conform protocolurilor standardizate și pentru prepararea oligomerului din 12 nucleotide se lucrează mai departe cu ciclul Standard (ABI 380A User Bulletin, Issue No. 36m Juli 1986) pe un ABI 380 A DNA Synthesizer conform procedurii fosforamidit. După separarea grupelor de protecție și scindarea 3'-aminooligonucleotidei de substanța de suport se purifică conform standardului și se caracterizează. Rezultate mai bune se pot obține în acest caz prin metode de cuplare mai labile în ceea ce privește bazele pentru legarea de substanța purtătoare. Este favorabilă substituția amidei acide care trebuie scindată printr-o funcțiune uretanică, așa cum aceasta s-a descris la Efimov (Nucleic Acid Res. 11, 8369, 1983).

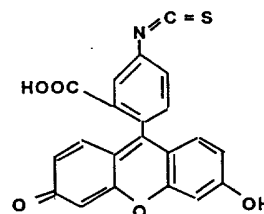
Exemplul 7. Sinteza unui oligomer

din 23 nucleotide cu capăt de 3'-amino, 3'-H₂N-ACACCCAATTCTGAAAATGGAT-5' are loc conform descrierii din exemplul 1. Purificarea și caracterizarea are loc prin metode standard.

Exemplul 8. Derivatizarea care urmează a oligomerilor la terminația 3'-amino are loc cu izotiocianat de fluoresceină. 50 nmol 3'-aminooligonucleotidă se dizolvă într-un vas Eppendorf în 25 μ l dintr-o soluție de 500 mM carbonat acid de sodiu. Se adaugă 20 μ l dintr-o soluție FITC (Sigma) în DMSO. După un timp de reacție de 6 ore la temperatura camerei amestecul de reacție se purifică prin trecerea într-o soluție de 20 mM acetat de amoniu printr-o coloană Sephadex G-25, Oligomerul 3'-FITC a fost analizat atât prin analiză HPLC prin detectare cu fluorescență cât și prin detectare UV.

Rezultatele HPLC au fost verificate și prin analiza prin electroforeză în capilare cu gel (firma Dionex).

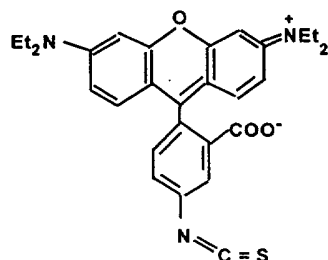
Formula izocianatului de fluoresceină este următoarea:



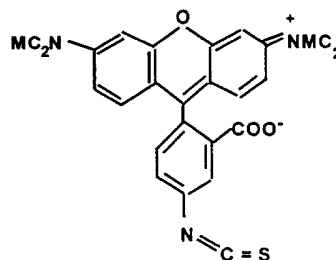
Exemplul 9. Ambii aminooligomeri din exemplul 1 și 2 se lasă să reacționeze conform procedurii descris în exemplul 3 cu izotiocianat de rodamină și izotiocianat de tetrametilrodamină. Oligomerii marcați cu fluorescență în poziția 3' se analizează printr-un procedeu HPLC, atât prin detectarea fluorescenței, cât și prin detectarea UV. Rezultatele HPLC au fost verificate și printr-o electroforeză în capilare cu gel (firma Dionex).

Formulele coloranților izotiocianat de rodamină și izotiocianat de tetrametilrodamină sunt următoarele:

17

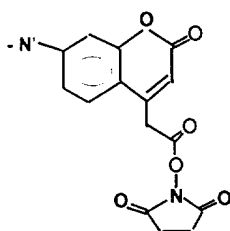


18



Exemplul 10. Ambii aminooligomeri din exemplele 1 și 2 se tratează, conform procedurii descris în exemplul 3 cu derivatul de cumarină de mai sus. Oligomerul marcat prin fluorescență se analizează printr-o metodă HPLC, atât prin detectare a fluorescenței, cât și prin detectare UV. Rezultatele HPLC se verifică și prin analize cu o electroforeză în capilare pe gel (firma Dionex).

Formula moleculei de colorant de cumarină este dată mai jos:



(3). Incorporarea nucleotidelor modificate prin polimeraze ADN și analiza experimentelor de secvențare.

Pentru verificarea acceptanței aminotrifosfaților prin enzimele de secvențare uzuale s-au preparat soluții corespunzătoare de terminare și s-au verificat prin testare polimerazele (Klenow, Boehringer; Taq. Amerssam; 77, Pharmacia; Sequenaze, USB). În acest caz s-au analizat ratele de incorporare și proprietățile terminațiilor ale trifosfaților, atât clasic, cât și prin marcarea cu coloranți de fluorescență.

Exemplul 11. 5'-trifosfat-3'-amino-3'-dezoxiribozid-timidina descrisă ca în exemplul 1, s-a înlocuit cu 2'-3'-didezoxi-5'-trifosfat-timidina. Acest lucru a avut loc la soluțiile de terminare ale tuturor polimerazelor indicate mai sus. S-au încercat rapoarte dNTP/Terminator echimoleculare, de zece ori mai mari și de zece ori mai mici. Secvențările s-au

realizat conform metodelor de protocol standard. La aceste cercetări detectarea s-a făcut prin încorporarea de α -³⁵S-dATP în mod autoradiografic. Se constată că:

a) 3'-amino-nucleotida acționează prin terminare asupra enzimelor folosite;

b) ratele de încorporare la T7, Taq și secvențare sunt identice ca la didezoxiterminatoarele obișnuite;

c) în cele din urmă se poate realiza cu amino-nucleotida o secvențare neproblematică.

Exemplul 12. Compusul 5'-trifosfat-3'-amino-3'-dezoxiribozid-timidină a fost transformat cu izotiocianat de fluoresceină la 5'-trifosfat-3'-amino-3'-dezoxiribozid-3'-N-tiocianat de fluoresceină-timidină.

5'-trifosfat-3'-amino-3',2'-dezoxiribozid-timină (2,5 mg, 2,8 μmol) se dizolvă într-un Eppendorf-Cap în 200 μl apă distilată și se tratează cu 200 μl 1M soluție tampon de Na₂CO₃ (pH=9). Amestecul de reacție se protejează cu o manta de folie de aluminiu față de lumina de zi și se adaugă cu o pipetă de 100 μl, 80 μl dintr-o soluție de izotiocianat de fluoresceină (10 mg în 1 ml DMF). După un timp de reacție de 10 min la temperatura camerei eductul s-a transformat cantitativ în DC. Purificare are loc prin filtrare pe gel.

Coloana Sephadex G-10 se protejează printr-o manta de folie de aluminiu de lumină, apoi se trece toată cantitatea de amestec de reacție pe materialul coloanei și se eluează cu un curent de 1 ml/min apă. Cromatograma arată două maxime. Prima maximă indică produsul și a doua de colorantul nereacționat.

Mărimea fracțiunii este de 5 ml,

În total se obțin 24 fracțiuni. Pe baza cromatogramei, fracțiunea 4 se dovedește a fi pozitivă. Acest lucru se confirmă prin DC. Se concentrează solventul prin liofilizare și se depozitează substanța la -80°C . Randament 3,32 mg (93 %); greutate moleculară: 1274,32; R_f (amoniac:izopropanol:apă, 10:70:60):0,62; spectrul de emisie a fluorescenței: lungimea de undă a luminii iradiate este la 420 nm. Maximumul de emisie a compusului este la 514,8 nm. S-a măsurat o soluție 2,5 mM în apă distilată. Maxima de emisie a unei soluții 2,5 mM a colorantului nederivatizat în apă distilată este la o lungime de undă de 519,4 nm.

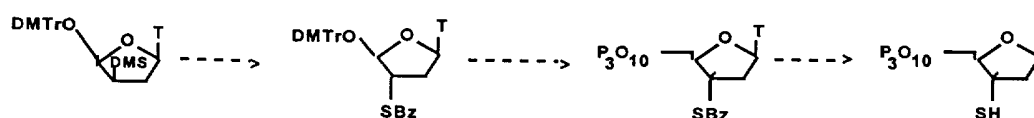
Compusul 5'-trifosfat-3'-amino-3'-dezoxiribozid-3'-N-izocianat de fluoresceină-timidină s-a înlocuit cu 2',3'-dideoxi-5'-trifosfat-timidină.

Acest lucru a avut loc la soluții de terminație ale tuturor polimerazelor indicate mai sus. S-au verificat rapoarte dNTP/terminator echimolare, de zece ori mai mari și de zece ori mai mici. Secvențările au fost realizate conform protocoalelor standard. La aceste cercetări s-a detectat prin încorporarea de α - ^{35}S -dATP în mod autoradiografic. Se dovedește că:

a) nucleotida marcată prin fluorescență 3' are o acțiune de terminare asupra enzimelor utilizate, b) ratele de încorporare la T7, Taq și secvența sunt identice pe baza restului de colorant exigent steric la concentrații de zece ori mai mari față de terminatorii dideoxi și c) cu terminatorul marcat prin fluorescență în poziția 3' se poate realiza o secvențare neproblematică.

Exemplul 13. Compusul 5'-trifosfat-3'-amino-3'-dezoxiribozid-3'-N-tiocianat de fluoresceină-timidină s-a înlocuit cu 2',3'-dideoxi-5'-trifosfat-timidină. Acest lucru a avut loc la soluții de terminație ale tuturor polimerazelor T7 și Taq. S-au luat ca bază rapoarte dNTP/terminator de zece ori mai mari. Secvențările s-au realizat conform protocoalelor standard. La aceste cercetări s-a renunțat la încorporarea de α - ^{35}S -dATP și analiza secvenței s-a realizat cu succes cu terminatorul marcat prin fluorescență și poziția 3' pe un secvențator ADN disponibil din comerț.

Exemplul 14. Sinteza 5'-trifosfat-3'-tio-3'-dezoxiribozid-timidinei se realizează conform schemei de reacție de mai jos:



5'-O-dimetoxitritil-3'-S-benzoil-tiotimidină

Introducerea sulfului la poziția 3' are loc prin substituția unei grupe plecate (mesilat) prin tiobenzoat de sodiu.

Sinteza tiobenzoatului de sodiu are loc prin adaos de NaOH , 10M, la o soluție răcită cu gheață de acid tiobenzoidic (10g) în apă 15ml până când soluția este alcalină. Apoi se reglează valoarea pH la pH=7 cu acid tiobenzoic, se răcește la -5°C și se filtrează soluția pentru a îndepărta reziduurile solide. După îndepărtarea apei în evaporatorul rotativ cu

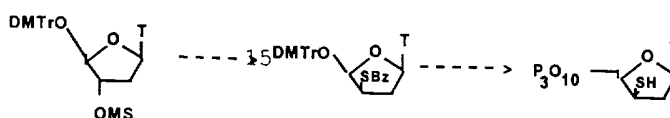
etanol se usucă sarea galbenă în vid peste pentaoxid de fosfor.

O soluție de 5'-O-dimetoxitritil-3'-O-metansulfonil-2'-dezoxitimidină (8,45 mmol) (sinteza metilatului: Miller, Fox (1964) J. Org. Chem. 29, 1772) și tiobenzoat de sodiu (33 mmol) în DMF (30 ml) se agită timp de 4 h la 100°C . Se scutură amestecul cu diclormetan și se spală faza organică cu soluție saturată de NaHCO_3 și soluție saturată de NaCl. După uscarea fazei organice peste sulfat de sodiu, se coevaporă de două ori cu toluen și se purifică produsul brut uleios

prin cromatografie în flash (gel de silice 60H, cloroform/metanol 0-10%).

Randament: 60%, produsul posedă spectrul așteptat ¹H-NMR.

Grupă de protecție 5'-dimetoxitritil se scindează pentru fosfitylare la poziția 5' conform metodelor cunoscute din literatură (M. Gait, Oligonucleotide Synthesis, JRL-Press, Oxford 1984). Apoi se obține 5'-trifosfatul conform metodei lui Eckstein și Ludwig (J. Org. Chem., 1989, vol 54, nr. 3.631) cu salicilfosforcloridit (Aldrich) și tratament cu pirofosfat. Tiolul se pune în libertate



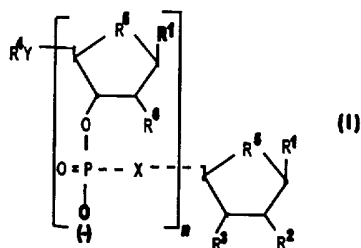
Pornind de la 5'-DMTr-O-, 3'-O-mesil-timidină se face substituția, așa cum se descrie în exemplul 14, cu tiobenzoat de sodiu. Apoi are loc scindarea grupei de protecție 5', introducerea 5'-trifosfatului, eliberarea tiolului și legarea iodacetamidfluoresceinei în mod analog cu procedeul din exemplul 14.

Exemplul 16. Sinteza unui oligomer din 10 nucleotide 3'-beta-H₂N-TTT TTT TTT T-5'

Sinteza unui oligomer 3'-beta-H₂N-TTT TTT TTT T-5' are loc pornind de la 1-(3'-amino-2', 3'-dideoxi-5'-DMTr-beta-D-treopentofuranosil)-timină, care se tratează conform procedeului din exemplul 6, se transformă în materialul de suport pentru procedeul fosforamidit. Marcarea apoi prin fluorescență a 3'-beta-amino-oligonucleotidei cu izotiocianat de fluoresceină are loc conform exemplului 8.

Revendicări

1. Nucleozide, nucleotide și oligonucleotide cuplate cu coloranți fluorescenți, caracterizate prin aceea că, au formula generală (I):



prin reacția cu NaOH 10 M în etanol saturat cu argon (R. Cosstick, Nucleic Acids Research 18, 4, 829).

3'-tio-5'-trifosfat-timidină a fost cuplată după metoda din exemplul 8 cu iodacetamidfluoresceină (Molecular Probes) și se obține în această treaptă tionucleotida marcată prin fluorescență cu un randament de 80%.

Exemplul 15. Sinteza 1-(3'-tio-2', 3'-dideoxi-5'-trifosfat-beta-D-treopentofuranosil)-timinei se realizează conform schemei de reacție de mai jos:

în care: R¹ este o bază purinică sau pirimidinică; cel puțin una din grupele R² și R³ reprezintă un colorant fluorescent legat printr-o grupă aminică sau tiol în pozițiile α sau β, iar cealaltă grupă reprezintă hidrogen, o grupă hidroxil, hidroxil protejat sau metoxi, legată în poziția α sau β; iar:

n este un număr mai mare sau egal cu 0;

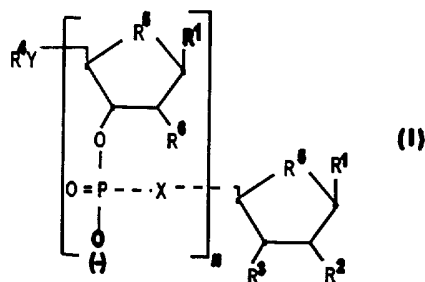
R⁴ reprezintă o grupă de protecție în poziție 5' sau fosfat, pirofosfat sau trifosfat;

R⁵ reprezintă oxigen, fluormetilen, difluormetilen sau metilen;

R⁶ reprezintă o grupă hidroxil sau metoxi sau hidrogen în poziție α sau β; în condițiile în care R¹, R⁵ și R⁶ pot avea semnificații identice sau diferite;

X și Y reprezintă oxigen, sulf, NH sau metilen, în condițiile în care X și Y pot avea semnificații identice sau diferite.

2. Procedeu pentru prepararea nucleozidelor, nucleotidelor și oligonucleotidelor cuplate cu coloranți fluorescenți, având formula generală (I):



în care: R^1 este o bază purinică sau pirimidinică; cel puțin una din grupele R^2 și R^3 reprezintă un colorant fluorescent legat printr-o grupă amino sau tiol în pozițiile α sau β ; iar cealaltă grupă reprezintă hidrogen, o grupă hidroxil, hidroxil protejat cu metoxi, legată în poziția α sau β ; iar:

n este un număr mai mare sau egal cu 0;

R^4 reprezintă o grupă de protecție în poziția 5' sau fosfat, pirofosfat sau trifosfat;

R^5 reprezintă oxigen, fluormetilen, difluormetilen sau metilen;

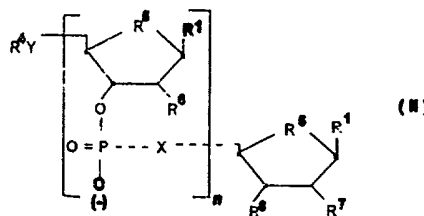
R^6 reprezintă o grupă hidroxil sau metoxi sau hidrogen în poziția α sau β ; în condițiile în care R^1 , R^5 și R^6 pot avea semnificații identice sau diferite;

X și Y reprezintă oxigen, sulf, NH sau metilen, în condițiile în care X și Y pot avea semnificații identice sau diferite, **caracterizat prin aceea că**, grupa OH care se găsește în poziția 2' și/sau 3' a nucleozidei, nucleotidei sau oligonucleotidei, se transformă într-o grupă amino sau tiol și apoi se cuplează cu un colorant fluorescent.

3. Procedeu, conform revendicării 2, pentru prepararea compusului cu formula generală (I), **caracterizat prin aceea că**, grupa OH care se află în poziția 2' și/sau 3' a unei nucleozide, nucleotide sau oligonucleotide se transformă într-o grupă amino sau tiol, prin înlocuirea într-o primă etapă a grupei hidroxi din poziția 2' și/sau 3' cu o grupă scindabilă după care se realizează un atac nucleofil cu o azidă, de preferință, azidă de litiu, pentru formarea unei azide, respectiv un atac nucleofil cu un tiolat sau un tiolat protejat la sulf pentru formarea unui tiol sau a unui tiol protejat la sulf, iar în continuare grupa amino sau tiol liberă din poziția 3'-(2') a fragmentului zaharat la capătul 3' al acidului nucleic

reacționează cu un colorant fluorescent reactiv.

4. Procedeu, pentru obținerea compusului cu formula generală (I), **caracterizat prin aceea că**, în compusul cu formula generală (II):



în care: R^1 - R^8 , X , Y și n au semnificațiile date anterior, în condițiile în care R^1 , R^5 și R^6 pot avea fiecare în parte semnificații identice sau diferite, iar R^7 sau R^8 reprezintă hidrogen, o grupă hidroxil, hidroxil protejat sau metoxi.

a). se introduce prin atac nucleofil la poziția 3' și/sau 2', o azidă, respectiv un tiol protejat sau neprotejat, iar azida se reduce cu trietilfosfină la amină, și

b). se cuplează un colorant fluorescent prin grupa amino respectiv grupa tiol.

5. Procedeu, conform revendicărilor 2 și 4, **caracterizat prin aceea că**, drept coloranți fluorescenți se folosesc fluoresceina, rodamina, roșu Texas, NBD, cumarine, fluorescamine, succinil-fluoresceine și dansile.

6. Compuși, conform revendicării 1, **caracterizați prin aceea că**, se utilizează la:

(a) sinteza nucleozidelor, nucleotidelor și oligonucleotidelor ADN și ARN; (b) detectarea fluorescentmicroscopică și fluorescentmacroscopică *in vivo* și *in vitro*; (c) sinteză de contracatene în prezență de catene-tipar; (d) sinteză de oligonucleotide.

Președintele comisiei de invenții: **farm.Pentelescu Elena**
Examinator: **chim.Novac Maria**