

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **241227**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **428084**

(22) Data zgłoszenia: **06.12.2018**

(51) Int.Cl.

C09K 11/06 (2006.01)

C09K 11/01 (2006.01)

C07D 401/14 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

C07D 213/74 (2006.01)

C12Q 1/68 (2018.01)

G01N 33/52 (2006.01)

(54) **Znaczniki fluorescencyjne, sposób znakowania i sposób ich usuwania**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

15.06.2020 BUP 13/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

22.08.2022 WUP 34/22

(73) Uprawniony z patentu:

**FUTURESYNTHESIS SPÓŁKA
Z OGRANICZONĄ ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ,
Poznań, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MARCIN K. CHMIELEWSKI, Poznań, PL
JOLANTA BRZEZIŃSKA, Swarzędz, PL
AGNIESZKA WITKOWSKA, Poznań, PL
PIOTR PUTAJ, Poznań, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Elżbieta Piątkowska

PL 241227 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe barwniki fluorescencyjne, sposób znakowania materiału biologicznego barwnikami fluorescencyjnymi wykorzystywany w analizach biologicznych, chemicznych i fizycznych oraz sposób usuwania tych barwników.

Wiele współcześnie stosowanych technik analitycznych, diagnostycznych i syntetycznych wykorzystuje zjawisko fluorescencji. Wśród najbardziej rozpowszechnionych wymienić należy FISH (Fluorescent Hybridization In Situ), RT-PCR (Real-Time PCR), FRET (Förster Resonance Energy Transfer), metodologię stosowania sond molekularnych pojedynczo i podwójnie znakowanych, fluorescencję aminokwasów, białek lub kropek kwantowych. Źródłem fluorescencji jest najczęściej barwnik, który w procesie znakowania jest łączony z inną cząsteczką np. biopolimerem, najczęściej kwasem nukleinowym, peptydem lub białkiem.

Fluorescencyjne znakowanie biocząsteczek ma na celu pozyskiwanie informacji o lokalizacji biomolekuł w komórkach lub narządach, o oddziaływaniach fizyko-chemicznych czy zmianach konformacyjnych, np. fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH) służy do wykrywania w badanym materiale genetycznym określonej sekwencji DNA (kwas deoksyrybonukleinowy), za pomocą specyficznych sond znakowanych barwnikami fluorescencyjnymi. Metody fluorescencyjne charakteryzują się małą inwazyjnością, jak również niewielkim negatywnym wpływem na zdrowie operatora i środowisko, dzięki czemu w wielu przypadkach mają przewagę nad innymi technikami znakowania, np. znakowaniem radioizotopowym.

Znane barwniki fluorescencyjne stosowane do znakowania materiału biologicznego różnią się między sobą widmem absorpcyjno-emisyjnym. W dodatku zakres każdego z widm reprezentuje jedynie wąski wycinek z zakresu światła widzialnego. Wynika z tego, że nie ma jednego barwnika o uniwersalnym zastosowaniu i szerokiej funkcjonalności. Czasami, aby uzyskać oczekiwany efekt, należy zastosować kombinację kilku barwników.

Mianem znacznika fluorescencyjnego określa się barwnik o właściwościach fluorescencyjnych, skoniugowany z jakąkolwiek cząsteczką organiczną na przykład biopolimerem takim jak kwas nukleinowy, peptyd czy białko.

Wśród metod wykorzystywanych do fluorescencyjnego znakowania oligonukleotydów najbardziej wygodne i efektywne jest przekształcenie barwnika fluorescencyjnego w postać amidofosforynu, który wykorzystywany jest do znakowania oligonukleotydów poprzez przyłączenie do grupy hydroksylowej, aminowej lub karboksylowej w oligomerze lub jego części.

Do najpopularniejszych barwników fluorescencyjnych dostępnych w postaci amidofosforynów należą: fluoresceina i jej tetra- i heksachlorowane pochodne (TET i HEX). Zaletą tych barwników jest wystarczająca stabilność w środowisku zasadowym, koniecznym w końcowym odblokowaniu oligonukleotydu poprzez usunięcie grup ochronnych. Pochodne amidofosforynowe stosujemy również do znakowania oligomerów za pomocą barwników takich jak cyjaniny, jednak związki te, po przyłączeniu do oligomeru mogą być niestabilne w warunkach zasadowych, i wymagają zmiany warunków odblokowywania oligonukleotydów.

Drugim sposobem fluorescencyjnego znakowania oligonukleotydów jest znakowanie wewnątrz sekwencji oligonukleotydowej.

W tym rodzaju znakowania fluorescencyjnego oligonukleotydów możliwe jest przyłączanie barwnika fluorescencyjnego do zasad azotowych lub pierścienia rybozy odpowiedniego nukleozydu albo podczas syntezy oligonukleotydu albo po zakończeniu syntezy oligomeru.

W pierwszym przypadku, barwnik na drodze chemicznej konwersji przekształcany jest w amidofosforyn, który następnie w wyniku aktywacji za pomocą pochodnych 1-*H*-tetrazolu przyłącza się do wolnej grupy hydroksylowej oligonukleotydu podczas chemicznej syntezy oligonukleotydu metodą amidofosforynową, na podłożu stałym.

W drugim przypadku barwnik fluorescencyjny jest włączany do oligonukleotydu w procesie post-syntetycznym, czyli po zakończeniu syntezy oligonukleotydu, pochodna barwnika w wyniku reakcji z odpowiednio modyfikowanym nukleotydem oligomeru jest przyłączana wiązaniem kowalencyjnym.

Przykładami post-syntetycznego znakowania oligomerów są:

- wykorzystanie reakcji wolnej grupy aminowej jednego z nukleotydów oligomeru z estrem *N*-hydroksy sukcynimidowym barwnika lub pochodną izotiocyanianową barwnika. W wyniku reakcji pomiędzy takimi pochodnymi barwnika a częścią heterocykliczną oligomeru powstaje stabilne wiązanie chemiczne, odpowiednio: amidowe lub tiomocznikowe;

- reakcja bazująca na tzw. „click chemistry”, pomiędzy oligonukleotydem zawierającym nukleotyd modyfikowany ugrupowaniem alkinowym a barwnikiem fluorescencyjnym zawierającym grupę azydkową. W wyniku reakcji pomiędzy nimi tworzy się pierścień triazolowy, poprzez powstanie wiązań kowalencyjnych węgiel – azot.

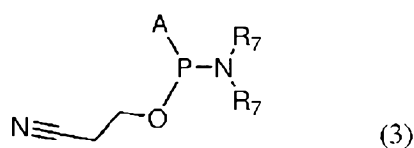
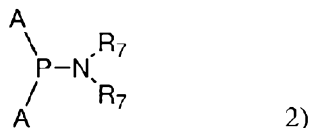
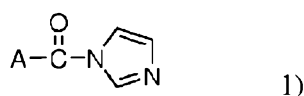
Wszystkie znane i przedstawione powyżej metody znakowania opierają się na wytworzeniu trwałego wiązania chemicznego między barwnikiem a kwasem nukleinowym.

W pewnych sytuacjach pożądanym byłoby jednakże, aby barwnik fluorescencyjny mógł być odłączony od kwasu nukleinowego bez jego całkowitej lub częściowej degradacji. Nawet częściowy rozkład kwasu nukleinowego skutkuje bowiem utratą naturalnych funkcji. Dla przykładu – często obserwowanym zjawiskiem jest to, że przyłączenie barwnika zmienia właściwości kwasu nukleinowego (tj. blokuje jej niektóre funkcje), przez co uniemożliwia jej wykorzystanie zgodnie z naturalnymi właściwościami.

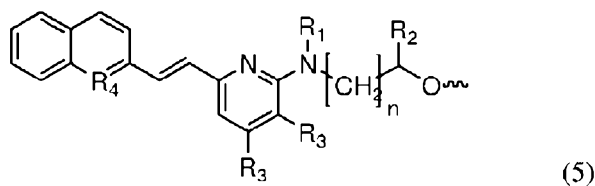
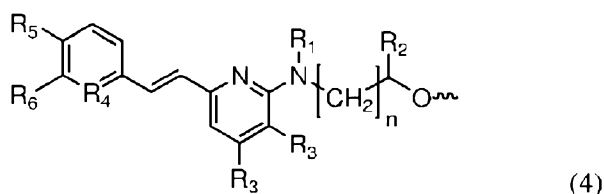
Do dnia dzisiejszego nie zostały ujawnione w literaturze przypadki bezpiecznego usuwania znaczników z kwasów nukleinowych. Dotychczas znane metody usunięcia znacznika powodują jednoczesny proces destrukcji całej cząsteczki kwasu nukleinowego. Dla przykładu: istnieją metody usuwania barwników fluorescencyjnych ze znakowanych kwasów nukleinowych za pomocą trawienia enzymatycznego: enzym krok po kroku usuwa z biopolimeru elementy przyłączone wiązaniem fosfordiestrowym, poczynając od końca 5'. Jeśli na końcu 5' takiego biopolimeru znajduje się barwnik fluorescencyjny, to zostanie on usunięty w pierwszej kolejności, jednak działania enzymu nie można zatrzymać, co w konsekwencji prowadzi do degradacji całego kwasu.

Celem wynalazku było opracowanie barwnika fluorescencyjnego, stosowanego jako znacznik fluorescencyjny, zwłaszcza do znakowania kwasów nukleinowych, nukleozydów, nukleotydów, peptydów lub białek, który mógłby być odłączany od znakowanej biocząsteczki bez jej uszkodzenia lub degradacji. W drugim aspekcie celem wynalazku było opracowanie sposobu znakowania biocząsteczek znacznikiem barwnikiem fluorescencyjnym oraz sposobu usuwania znacznika z biocząsteczki, pozostawiając biocząsteczkę w formie nienaruszonej.

Przedmiotem wynalazku są znaczniki fluorescencyjne na bazie prekursorów o wzorach ogólnych 1, 2 lub 3

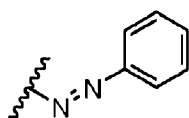


w których A oznacza grupę o wzorze 4 lub 5



w których:

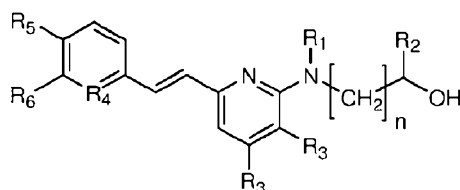
- n przyjmuje wartość 1 lub 2,
- „~” oznacza wiązanie pomiędzy tlenem grupy A a atomem węgla prekursora o wzorze 1 lub tlenem grupy A a atomem fosforu prekursora o wzorze 2 lub 3,
- R_1 oznacza:
 - o wodór, metyl, grupę aminową, grupę karbonylową, naftyl, naftylometyl, fenyl, benzyl, chinolinometyl,
 - o benzyl podstawiony jednym lub kilkoma takimi samymi lub różnymi podstawnikami: chlorem, fluorem, metylem,
 - o nasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla, nasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla podstawiony fenylem, grupą aminową, grupą hydroksylową lub równocześnie fenylem i grupą hydroksylową lub fenylem i grupą aminową,
 - o lub nienasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla oraz jedno wiązanie podwójne,
- R_2 oznacza: wodór, metyl, benzyl, fenyl, naftyl, nasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla, nienasycony alkil zawierający 2 do 8 atomów węgla oraz jedno wiązanie podwójne,
- R_3 są takie same lub różne i oznaczają wodór, metyl, nasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla, lub nienasycony alkil zawierający 2 do 8 atomów węgla oraz jedno wiązanie podwójne, grupę aminową, grupę nitrową, grupę azydkową, grupę o wzorze ogólnym 6



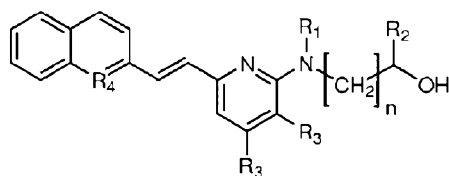
(6)

- R_4 oznacza azot,
- R_5 i R_6 są takie same lub różne i oznaczają wodór, metyl, benzyl, fenyl, naftyl, halogen (F, Cl, Br, I), hydroksyl, grupę aminową, grupę nitrową, grupę karboksylową, nasycony alkil zawierający 2 do 8 atomów węgla, nienasycony alkil zawierający 2 do 8 atomów węgla oraz jedno wiązanie podwójne, nienasycony alkil zawierający 2 do 8 atomów węgla oraz jedno wiązanie podwójne podstawiony fenylem,
- R_7 oznacza izo-propyl.

Sposób wykonania znakowania według wynalazku polega na przyłączeniu do nukleozydów, nukleotydów lub oligonukleotydów prekursorów o wzorach ogólnych 1, 2 lub 3, w których A, n, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 i R_6 mają wyżej podane znaczenie, przy czym w celu przyłączenia tych znaczników, w pierwszym etapie związki o wzorach 7 lub 8



(7)



(8)

w których n, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 i R_6 mają wyżej podane znaczenie, poddaje się reakcji chemicznej z 1,1'-karbonyldiimidazolem lub z N,N,N',N' -tetraizopropylodiamidochloro-fosforem lub (2-cyjanoe-tylo)- N,N,N',N' -bis(diizopropylodiamido)fosforem w odpowiednich reakcjach przedstawionych w dalszej treści opisu, uzyskując prekursorów według wzorów 1, 2 lub 3.

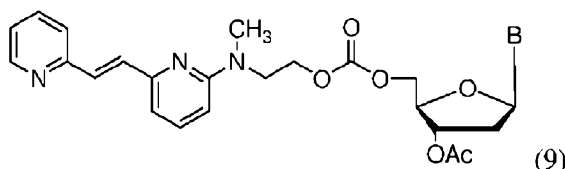
Związki o wzorach 7 i 8 oraz sposób ich otrzymywania zostały ujawnione i opisane w polskim zgłoszeniu patentowym nr P.428083.

Po przekształceniu w wyżej wspomniane formy prekursorowe poddaje się je reakcji z wolną pierwszorzędową grupą hydroksylową lub aminową nukleozydu, nukleotydu lub oligonukleotydu w celu znakowania tych biocząsteczek.

Sposób wykonania znakowania poprzez aktywne pochodne imidazolowe według wzoru 1

Barwnik fluorescencyjny według wzorów ogólnych 7 i 8 rozpuszcza się w bezwodnym polarnym aprotycznym rozpuszczalniku organicznym, korzystnie acetonitrylu lub tetrahydrofuranie i dodaje się do niego karbodiimidazol w proporcji molowej od 1 : 1 do 1 : 1,5 stosunku molowego, korzystnie w stosunku 1 : 1,3 molowym do zastosowanego barwnika fluorescencyjnego. Reakcję prowadzi się w temperaturze otoczenia, korzystnie 25°C, nie wyższej niż 30°C. Czas reakcji wynosi od 30 minut do 2 godzin, korzystnie 1 godzinę. Po tym czasie powstaje aktywna forma imidazolowa (według wzoru 1), którą dodaje się do nukleozydu, nukleotydu lub oligonukleotydu (z wolną grupą hydroksylową lub aminową) w nadmiarze od 1 : 1 do 2 : 1 stosunku molowego, korzystnie 1,5 : 1 stosunku molowego do nukleozydu, nukleotydu lub oligonukleotydu. Reakcję prowadzi się z dodatkiem nienukleofilowej zasady organicznej z grupy imin, pochodnych guanidyny, korzystnie tetrametyloguanidyny (TMG) w proporcji molowej w przedziale od 0,3 : 1 do 7,8 : 1, korzystnie 3,5 : 1 stosunku molowego do nukleozydu, nukleotydu lub oligonukleotydu w temperaturze otoczenia, korzystnie 25°C, nie wyższej jednak niż 30°C. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik jest usuwany, a produkt izolowany standardowymi metodami.

Przykładem nukleozydu znakowanego aktywną pochodną imidazolową według wzoru 1 jest związek o wzorze 9



gdzie B oznacza zasadę heterocykliczną, np. tyminę.

Sposób wykonania znakowania poprzez amidofosforyn

Metoda znakowania oligomerów za pomocą amidofosforynu według wzoru 2

Etap I: otrzymywanie amidofosforynu według wzoru 2

Barwnik fluorescencyjny z grupy barwników opisanych wzorem 7 lub 8 rozpuszcza się w bezwodnym aprotycznym rozpuszczalniku organicznym, korzystnie acetonitrylu lub chlorku metylenu, stosując atmosferę gazu obojętnego, korzystnie argonu. Cały proces prowadzi się stosując temperaturę z zakresu 15–30°C, korzystnie 20°C. Następnie do roztworu dodaje się bezwodną trzeciorzędową aminę alifatyczną, korzystnie diizopropylodiaminę w ilości nie mniejszej niż 1 : 1 stosunku molowego, korzystnie 1,3 : 1 stosunku molowego do barwnika fluorescencyjnego. Następnie do roztworu dodaje się *N,N,N',N'*-tetraizopropylodiamidochlorofosforyn w ilości od 0,8 : 1 do 1,1 : 1 stosunku molowego, korzystnie w stosunku 1 : 1 molowym do barwnika fluorescencyjnego. Przebieg reakcji monitoruje się, korzystnie analizą TLC stosując fazę rozwijającą benzen : trójetyloamina (9 : 1). Po zaobserwowaniu zaniku substratu dodaje się kolejną porcję barwnika fluorescencyjnego w stosunku molowym 1 : 1 do ilości tego samego barwnika fluorescencyjnego dodanych na początku reakcji oraz pochodną 1-*H*-tetrazolu, korzystnie 5-benzyl-mercaptotetrazol (BMT) w stosunku molowym do barwnika fluorescencyjnego o wzorze ogólnym 7 lub 8 dodanego w drugim etapie reakcji od 0,2 : 1 do 0,8 : 1, korzystnie 0,5 : 1 stosunku molowego. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik jest usuwany, a produkt według wzoru 2 izolowany standardowymi metodami, stosując oczyszczanie chromatograficzne produktu końcowego w obecności trzeciorzędowej aminy alifatycznej, korzystnie trójetyloaminy.

Etap II: znakowanie nukleozydu lub nukleotydu, lub oligomerów

Otrzymany i oczyszczony amidofosforyn według wzoru 2 rozpuszcza się w bezwodnym aprotycznym rozpuszczalniku organicznym, korzystnie acetonitrylu, chlorku metylenu lub toluenie i miesza się z pochodną 1-*H*-tetrazolu, korzystnie BMT w stosunku molowym nie mniejszym niż 1 : 1 do zastosowanego amidofosforynu. Następnie mieszaninę dodaje się do nukleozydu lub nukleotydu, lub oligonukleotydu posiadającego wolną grupę hydroksylową lub aminową. Proporcje równomolowej mieszaniny amidofosforynu, według wzoru 2, z pochodną 1-*H*-tetrazolu, korzystnie BMT, w stosunku molowym do nukleozydu lub nukleotydu, lub oligonukleotydu dla reakcji w fazie ciekłej stanowią 2 : 1 stosunku molowego, natomiast

dla reakcji prowadzonych na fazie stałej (porowate szkło) 20 : 1 stosunku molowego. Czas reakcji również zależy od zastosowanej metodologii prowadzenia reakcji i wynosi dla reakcji w fazie ciekłej od 0,5 do 3 godzin, korzystnie 1 godzinę, na fazie stałej od 0,5 do 6 minut, korzystnie 3 minuty. Po przyłączeniu amidofosforynu do nukleozydu lub nukleotydu, lub oligonukleotydu, przeprowadza się reakcję utleniania atomów fosforu z III do V stopnia utlenienia za pomocą czynnika utleniającego, korzystnie roztworu jodu w uwodnionej pirydynie. Po zakończeniu ww. reakcji otrzymuje się znakowany nukleozyd lub nukleotyd, lub oligonukleotyd. Następnie rozpuszczalnik jest usuwany metodami standardowymi dla odpowiedniej metodologii reakcji (faza stała lub ciekła), a produkt izolowany standardowymi metodami.

Metoda znakowania oligomerów za pomocą amidofosforynu według wzoru 3

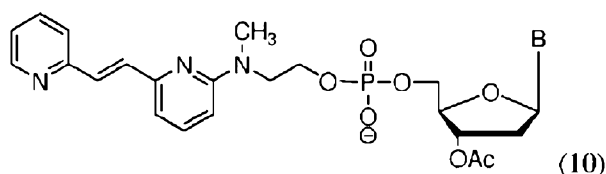
Etap I: otrzymywanie amidofosforynów według wzoru 3

Barwnik fluorescencyjny według wzoru 7 lub 8 rozpuszcza się w bezwodnym aprotycznym rozpuszczalniku organicznym, korzystnie acetonitrylu lub chlorku metylenu stosując atmosferę gazu obojętnego, korzystnie argonu. Następnie do roztworu dodaje się (2-cyanoetylo)-N,N,N',N'-bis(diizopropylodiamido)fosforyn w ilości od 1 : 1 do 3 : 1 stosunku molowego, korzystnie 1,3 : 1 stosunku molowego do zastosowanego barwnika fluorescencyjnego według wzorów ogólnych 7 lub 8, a następnie dodaje się pochodną 1-*H*-tetrazolu, korzystnie 5-benzyl-mercaptotetrazol (BMT) w stosunku molowym nie większym niż 1 : 1, korzystnie 0,8 : 1 stosunku molowego względem barwnika fluorescencyjnego, w temperaturze od 15–30°C, korzystnie 20°C. Po zakończeniu reakcji rozpuszczalnik jest usuwany, a produkt w postaci amidofosforynu według wzoru 3 izolowany standardowymi metodami, stosując podczas oczyszczania produktu końcowego dodatek trzeciorzędowej aminy alifatycznej, korzystnie trójetiloaminy.

Etap II: znakowanie nukleozydu, nukleotydu lub oligomerów

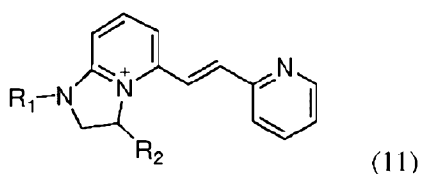
Otrzymany i oczyszczony amidofosforyn według wzoru 3 rozpuszcza się w bezwodnym aprotycznym rozpuszczalniku organicznym, korzystnie acetonitrylu, chlorku metylenu lub toluenie i miesza się z pochodną 1-*H*-tetrazolu, korzystnie BMT w stosunku molowym nie mniejszym niż 1 : 1 do zastosowanego amidofosforynu. Następnie mieszaninę dodaje się do nukleozydu lub nukleotydu, lub oligonukleotydu posiadającego wolną grupę hydroksylową lub aminową. Proporcje równomolowej mieszaniny amidofosforynu, według wzoru 3, z pochodną 1-*H*-tetrazolu, korzystnie BMT, w stosunku do nukleozydu lub nukleotydu, lub oligonukleotydu dla reakcji w fazie ciekłej stanowią 2 : 1 stosunku molowego, natomiast dla reakcji prowadzonych na fazie stałej (porowate szkło) 20 : 1 stosunku molowego. Czas reakcji zależy również od zastosowanej metodologii prowadzenia reakcji i wynosi dla reakcji w fazie ciekłej od 0,5 do 3 godzin, korzystnie 1 godzinę, na fazie stałej od 0,5 do 6 minut, korzystnie 3 minuty. Po przyłączeniu amidofosforynu do nukleozydu lub nukleotydu, lub oligonukleotydu, przeprowadza się reakcję utleniania atomów fosforu z III do V stopnia utlenienia za pomocą czynnika utleniającego, korzystnie roztworu jodu w uwodnionej pirydynie. Po zakończeniu ww. reakcji otrzymuje się znakowany nukleozyd lub nukleotyd, lub oligonukleotyd. Następnie rozpuszczalnik jest usuwany metodami standardowymi dla odpowiedniej metodologii reakcji (faza stała lub ciekła), a produkt izolowany standardowymi metodami.

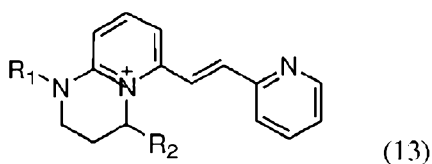
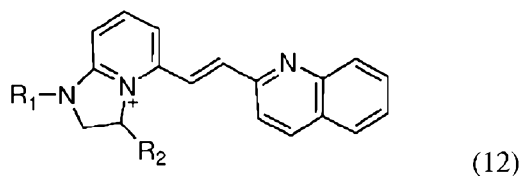
Przykładem nukleozydu znakowanego aktywną pochodną amidofosforynową według wzoru 2 lub 3 jest związek o wzorze 10



gdzie B oznacza zasadę heterocykliczną, np. tyminę.

Przedmiotem wynalazku jest również sposób termicznego usuwania znaczników fluorescencyjnych ze znakowanego nukleozydu, nukleotydu lub oligonukleotydu, w wyniku czego oprócz nieznakowanego nukleozydu, nukleotydu lub oligonukleotydu powstaje związek cykliczny o wzorze ogólnym 11, 12 lub 13.

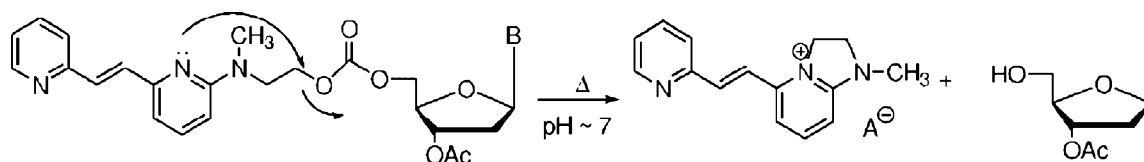




Usuwanie przeprowadza się w następujący sposób: znakowany nukleozyd, nukleotyd lub oligonukleotyd rozpuszcza się w buforze fosforanowym (pH 6,86 lub 7,2) i jeżeli nie nastąpiło całkowite rozpuszczenie dodaje się acetonitrylu w takiej ilości, aby otrzymać klarowny roztwór. Następnie roztwór ogrzewa się w zamkniętym naczyniu w przedziale temperatur 30–90°C.

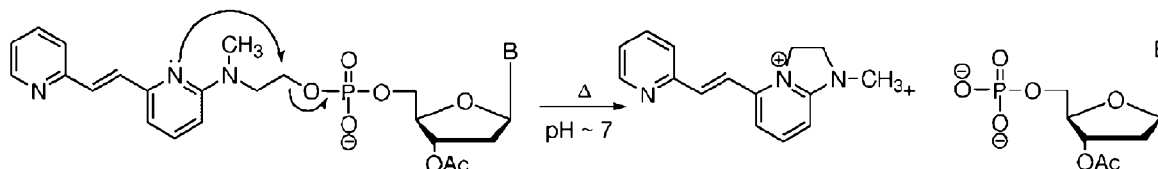
Na schemacie 1 przedstawiono przykład termicznego usuwania znacznika fluorescencyjnego z nukleozydu po znakowaniu pochodną imidazolową, zaś na schemacie 2 przykład termicznego usuwania znacznika fluorescencyjnego z nukleotydu po znakowaniu pochodną amidofosforanową wraz z mechanizmem tworzenia się pięciocząłowej bicyklicznej formy barwnika.

Schemat 1



Gdzie B oznacza zasadę heterocykliczną, np. tyminę, a A dowolny anion występujący w roztworze, korzystnie fosforan.

Schemat 2



Gdzie B oznacza zasadę heterocykliczną, np. tyminę,

Warunki, w jakich poszczególne znaczniki ulegają odłączeniu, są charakterystyczne dla danego znacznika i różnią się pomiędzy sobą, z tego względu przed użyciem danego znacznika należy określić parametry potrzebne do całkowitego jego usunięcia poprzez wykreślenie krzywej wzorcowej obejmującej zależność usuwania danego znacznika od temperatury lub/i czasu, która umożliwi odpowiedni dobór zarówno temperatury procesu usuwania znacznika, jak i jego czas.

Krzywa wzorcową jest charakterystyczna dla danego znacznika. Nie zależy natomiast od sposobu przyłączania (metoda amidofosforanowa lub metoda imidazolowa) i rodzaju związku do którego barwnik jest przyłączony.

Poniżej przedstawiono przykładową procedurę wykonania krzywej wzorcowej. W pierwszej kolejności należy określić temperaturę korzystną do usunięcia znacznika. W tym celu znakowaną biocząsteczkę, np. nukleozyd, nukleotyd lub oligonukleotyd znakowany danym barwnikiem dzieli się na 7 oddzielnych porcji, każda po 1 miligramie, rozpuszcza się w buforze fosforanowym (pH 6,86 lub 7,2) lub mieszaninie: bufor fosforanowy (pH 6,86 lub 7,2)/acetonitryl(ACN) (2/1; v/v) w zamykanym naczyniu. Następnie, wytrząsając prowadzi się ogrzewanie każdej z nich przez 2 h w różnych temperaturach: 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C. Próbkę poddaje się kolejno analizie RP-HPLC (ang. reversed phase high-performance liquid chromatography [wysokosprawna chromatografia cieczowa na fazie

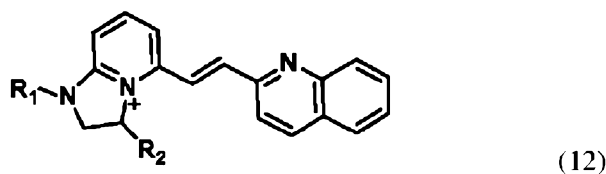
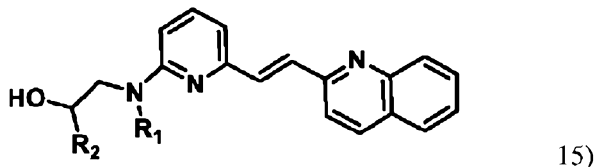
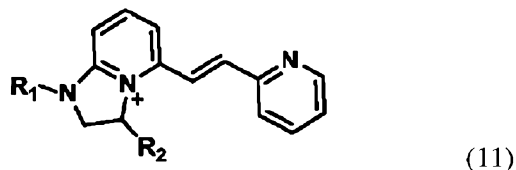
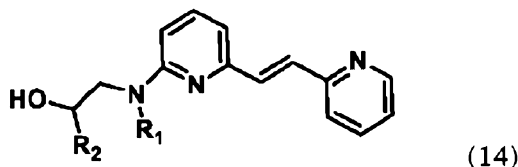
odwróconej]] z detektorem fluorescencyjnym i na podstawie chromatogramów przedstawiających stopień usunięcia znacznika z nukleozydu, nukleotydu lub oligonukleotydu wykreśla się krzywą zależności od temperatury. Na podstawie krzywej wybieramy temperaturę, dla której chcemy oznaczyć czas całkowitego usunięcia znacznika.

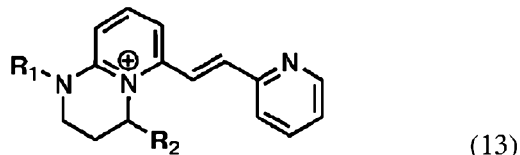
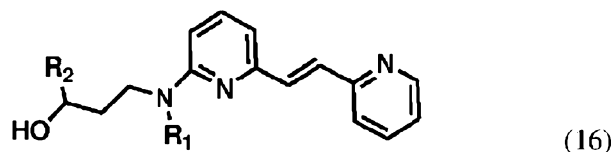
W celu określenia czasu całkowitego usunięcia znacznika w oznaczonej wcześniej temperaturze postępujemy następująco: znakowaną biocząsteczkę, np. nukleozyd, nukleotyd lub oligonukleotyd znakowany danym barwnikiem w ilości 1 miligrama rozpuszcza się w buforze fosforanowym (pH 6,86 lub 7,2) lub mieszaninie: bufor fosforanowy (pH 6,86 lub 7,2)/acetonitryl (2/1; v/v) w zamykanym naczyniu. Następnie wytrząsając, prowadzi się ogrzewanie w oznaczonej wcześniej temperaturze. Próbkę podaje się analizie RP-HPLC z detektorem fluorescencyjnym, pobierając analit z tej samej próbki po czasie 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90 minut. Na podstawie chromatogramów przedstawiających stopień zaniku znacznika wykreśla się krzywą zależności całkowitego zaniku znacznika od czasu. Na podstawie krzywej określamy czas potrzebny do całkowitego usunięcia znacznika z nukleozydu, nukleotydu lub oligonukleotydu w zadanej temperaturze.

Postęp reakcji usuwania znacznika i tworzenia formy cyklicznej barwnika można obserwować z krzywej wzorcowej otrzymanej metodami spektrofotometrycznymi, korzystnie RP-HPLC z detektorem fluorescencyjnym, który identyfikuje powstawanie cyklicznej formy barwnika. Na schemacie 1 przedstawiono przykład usuwania znacznika z nukleozydu i tworzenia się formy cyklicznej barwnika w trakcie usuwania znacznika ze znakowanej cząsteczki nukleozydu, nukleotydu lub oligonukleotydu.

Przykładowo, jeżeli do znakowania użyto barwnik o wzorze ogólnym 14, to po cyklu „tworzenie prekursora – przyłączenie znacznika do nukleozydu, nukleotydu lub oligonukleotydu – usunięcie znacznika” powstanie pięcioczłonowa bicykliczna forma o wzorze ogólnym 11. Podobnie, jeżeli do znakowania użyto barwnik o wzorze 15, to po cyklu „tworzenie prekursora – przyłączenie znacznika do nukleozydu, nukleotydu lub oligonukleotydu – usunięcie znacznika” powstanie pięcioczłonowa bicykliczna forma o wzorze 12.

Natomiast, jeżeli do znakowania użyto barwnik o wzorze 16, to po cyklu „tworzenie prekursora – przyłączenie znacznika do nukleozydu, nukleotydu lub oligonukleotydu – usunięcie znacznika” powstanie sześcioczłonowa bicykliczna forma o wzorze 13.





W trzecim aspekcie przedmiotem wynalazku jest sposób oceny stopnia usunięcia znacznika fluorescencyjnego ze znakowanej biocząsteczki, polegający na pomiarze różnicy intensywności fluorescencji cząsteczki znakowanej, a intensywności fluorescencji znacznika odłączanego od znakowanej biocząsteczki podczas podwyższania temperatury (figura 4). Sposób polega na pomiarze intensywności fluorescencji cząsteczek znakowanych przy długości fali wzbudzenia i emisji oznaczonych jako maksima dla cząsteczki znakowanej i zmierzonych po zakończeniu procesu przyłączania znacznika, a następnie w określonych przedziałach czasowych przy stałej podwyższonej temperaturze lub po określonej czynności wykonanej z użyciem znakowanej cząsteczki wykonuje się pomiar przy tej samej długości fali wzbudzenia i emisji, mierząc fluorescencję w mieszaninie po usunięciu barwnika. Po uzyskaniu danych poddaje się je analizie matematycznej i na jej podstawie ustala dynamikę rozkładu, stopień rozkładu, a także ocenę wpływu czynników zewnętrznych na stabilność połączenia znacznika z biocząsteczką.

W celu pomiaru poziomu usunięcia znacznika z biocząsteczki, a tym samym poziomu jej znakowania przeprowadza się pomiar intensywności fluorescencji dla znakowanej biocząsteczki oraz po usunięciu znacznika za pomocą detektora fluorescencyjnego dla 1 molowego roztworu znakowanej biocząsteczki rozpuszczonej w takim rozpuszczalniku lub mieszaninie rozpuszczalników (np. ACN, dimetyloformamid (DMF), bufor fosforanowy, bufor cytrynianowy) oraz takiej podwyższonej temperaturze, dla jakiej chcemy określić czas całkowitego usunięcia znacznika. Pomiaru dokonuje się przy długości fali maksimum fluorescencji znakowanej biocząsteczki lub maksimum fluorescencji formy cyklicznej powstałej po usunięciu znacznika. Pomiaru dokonuje się w przedziałach czasowych (korzystnie w 6 punktach) i wykreśla się krzywą zależności intensywności fluorescencji dla znakowanej biocząsteczki lub cyklicznej formy po usunięciu znacznika od czasu. Proces odłączania znacznika od biocząsteczki, w podwyższonej temperaturze możemy monitorować za pomocą detektora fluorescencyjnego, ponieważ właściwości absorpcyjno-emisyjne znakowanej biocząsteczki różnią się od formy cyklicznej (powstałej po usunięciu znacznika) zarówno intensywnością fluorescencji, jak i maksimum długością fali emisji. Dzięki temu, możemy wykreślić krzywą zależności zmian intensywności fluorescencji/długości fali emisji znakowanej biocząsteczki i usuniętego znacznika (forma cykliczna) od czasu w danej temperaturze. Na podstawie wyznaczonej krzywej zmiany intensywności/długości fali emisji możemy ilościowo wyznaczyć stopień usuwania znacznika. Co jest wynikiem zmiany profilu intensywności fluorescencji emitowanej przez barwnik, a emisją jego formy cyklicznej (figura 4).

Sposób ten umożliwia badanie stopnia rozkładu znakowanej biocząsteczki poza układem, w którym w danej chwili znajduje się ta biocząsteczka, gdyż cykliczny produkt rozkładu można wyizolować np. ze środowiska reakcji i dokonywać pomiarów niezależnie od prowadzonego procesu chemicznego.

Sposób jest przydatny m.in. do oceny warunków przechowywania dowolnych towarów, gdzie znakowana biocząsteczką jest wykorzystywana do oceny wpływu tych warunków na dany towar, na podstawie stopnia odłączenia znacznika, zachodzącego pod wpływem zmian termicznych. Również, stopień odłączenia znacznika może być przydatny do weryfikacji przydatności dowolnych produktów, które ulegają rozkładowi w warunkach, w których znacznik odłącza się od cząsteczki. Ocena taka jest przeprowadzana na podstawie pomiaru fluorescencji.

W przykładach przedstawiono przykładowe opisy procedur znakowania biocząsteczek, procedur usuwania znaczników oraz przykłady ustalania warunków usuwania znaczników. Na rysunkach przedstawiono wybrane wyniki przedstawiające krzywe zależności usuwania znacznika od czasu i temperatury, różnicę intensywności fluorescencji pomiędzy formą znakowaną a cykliczną powstałą po usunięciu barwnika oraz analizę HPLC ilustrującą ten proces.

Przykład 1

Przekształcenie 2-(pirydyno-2-yl)winylo]pirydynowych aminoalkoholi w formę karbaminianową. (*E*)-2-(metylo{6-[2-(pirydyn-2-yl)winylo]pirydyn-2-yl}amino)etan-1-ol (0,1 mmol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu (2 ml) i umieszczono w kolbie z mieszadłem magnetycznym. Do roztworu dodano 1',1'-karbonylodiimidazol (0,24 mmol) i reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej, a jej przebieg kontrolowano za pomocą TLC (ang. Thin Layer Chromatography [cienkowarstwowa chromatografia cieczowa]) (octan etylu/ n-heksan 9/1). Po upływie 30 minut otrzymano aktywną formę karbaminianową aminoalkoholu, którą wykorzystano w następnym przykładzie bez jakiegokolwiek izolacji.

Przykład 2

Znakowanie 3'-O-Acetylotymidyny za pomocą karbaminianowej formy barwnika fluorescencyjnego. Do otrzymanego w poprzednim przykładzie roztworu karbaminianowej formy aminoalkoholu dodano 3'-O-Acetylotymidynę (0,1 mmol) i 1,1,3,3-tetrametyloguanidynę (0,16 mmol). Reakcję mieszano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą analizy TLC (dichlorometan/metanol 95/5 v/v). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a uzyskaną pozostałość oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (dichlorometan (DCM)/metanol (MeOH); 0–5% metanol (MeOH)), otrzymując czysty produkt, który scharakteryzowano metodami spektroskopowymi.

^1H NMR (400 MHz; Chloroform-*d*) δ 8,66–8,55 (m; 1H); 7,70–7,65 (m; 1H); 7,63 (d; J = 5,3 Hz; 1H); 7,48 (d; J = 8,6 Hz; 1H); 7,44 (d; J = 8,0 Hz; 2H); 7,35 (d; J = 2,2 Hz; 2H); 7,14 (dd; J = 7,5; 4,9 Hz; 1H); 6,71 (d; J = 7,3 Hz; 1H); 6,45 (d; J = 8,5 Hz; 1H); 6,35 (dd; J = 8,8; 5,7 Hz; 1H); 5,16 (dd; J = 5,2; 3,2 Hz; 1H); 4,52 (dt; J = 11,5; 5,9 Hz; 1H); 4,42 (q; J = 4,6; 3,7 Hz; 1H); 4,39 (d; J = 2,9 Hz; 1H); 4,33 (dd; J = 11,8; 2,8 Hz; 1H); 4,17 (q; J = 2,7 Hz; 1H); 4,02 (tq; J = 14,7; 8,8; 7,4 Hz; 2H); 3,10 (s; 3H); 2,40–2,29 (m; 1H); 2,22–2,10 (m; 2H); 2,09 (s; 3H); 1,88 (s; 3H).

^{13}C NMR (101 MHz; Chloroform-*d*) δ 169,89; 163,00; 157,25; 155,08; 154,11; 152,11; 149,93; 149,18; 137,44; 136,01; 134,34; 132,11; 130,24; 127,82; 122,10; 121,78; 112,34; 111,15; 104,99; 84,04; 81,62; 74,07; 66,76; 65,86; 47,87; 36,73; 36,64; 20,39; 12,13.

Przykład 3

Usuwanie znacznika z 3'-O-Acetylo-5'-(2-{metylo-[6-(2-pirydin-2-yl-winylo)-pirydin-2-yl]-amino-etiloksykarbonylotymidyny

Otrzymany w przykładzie 2 znakowany nukleozyd rozpuszczono w buforze fosforanowym pH 6,86 w 5 porcjach po 1 mg i umieszczono w zamkniętych fiolkach. Następnie, wytrząsając prowadzono ogrzewanie każdej z nich w następujących temperaturach: 30, 40, 50, 60 i 70°C i stałym czasie 2 godzin. Po zakończeniu ogrzewania i szybkim schłodzeniu (w suchym lodzie) pobierano próbki każdej z porcji i poddano je analizie za pomocą zestawu HPLC wyposażonego w detektor diodowy (DAD) w zakresie 220–700 nm) oraz detektor fluorescencyjny (FLD) w zakresie $\lambda_{\text{abs.}}$ = 370 nm, λ_{em} = 476 nm, stosując kolumnę Synergy Fusion – RP 80 Å (wraz z prekolumną firmy Phenomenex), o wymiarach 150 × 4,6 mm, stosując metodę gradientową: bufor A (0,01 M octan trietyloamoniowy)/ bufor B (0,01 M octan trietyloamoniowy w 40% acetonitrylu), szybkość przepływu 1 ml/min, czas trwania analizy 30 min. Wyniki kinetyki usuwania barwnika przedstawiono na wykresie: szybkość zaniku formy znakowanej w zależności od temperatury – figura 1. Całkowite usunięcie znacznika zachodzi w 70°C.

Przykład 4

(*E*)-2-(metylo{6-[2-(pirydyn-2-yl)winylo]pirydyn-2-yl}amino)propan-1-ol (0,13 mmol, 35 mg) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu (2 ml) i umieszczono w kolbie z mieszadłem magnetycznym z 1',1'-karbonylodiimidazol (0,13 mmol, 38,09 mg). Reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej, a jej przebieg kontrolowano za pomocą TLC (octan etylu/n-heksan 9/1). Po upływie 30 minut otrzymano aktywną formę karbaminianową (*E*)-2-(metylo{6-[2-(pirydyn-2-yl)winylo]pirydyn-2-yl}amino)propan-1-olu, którą wykorzystano w następnym przykładzie bez jakiegokolwiek izolacji.

Przykład 5

Do otrzymanego w poprzednim przykładzie 4 roztworu karbaminianowej formy (*E*)-2-(metylo{6-[2-(pirydyn-2-yl)winylo]pirydyn-2-yl}amino)propan-1-olu dodano 3'-O-Acetylowaną tymidynę (0,13 mmol, 38,09 mg) oraz 1,1,3,3-tetrametyloguanidynę (0,21 mmol, 20 μL). Reakcję mieszano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą analizy TLC (dichlorometan/metanol 95/5 v/v). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a uzyskaną pozostałość oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (DCM/MeOH; 0–5% MeOH), otrzymując czysty produkt (19 mg), który scharakteryzowano metodami spektroskopowymi.

^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 8,67–8,57 (d, J = 4,01 1H); 7,70–7,65 (m, 1H); 7,63 (d, J = 5,3 Hz, 1H); 7,48 (d, J = 8,6 Hz, 1H); 7,44 (d, J = 8,0 Hz, 2H); 7,35 (d, J = 2,2 Hz, 2H); 7,14 (dd, J = 7,5, 4,9 Hz, 1H); 6,71 (d, J = 7,3 Hz, 1H); 6,35 (d, J = 8,5 Hz, 1H); 6,35 (dd, J = 8,8, 5,7 Hz, 1H); 5,16 (dd, J = 5,2, 3,2 Hz, 1H); 4,52 (dt, J = 11,5, 5,9 Hz, 1H); 4,42 (q, J = 4,6, 3,7 Hz, 1H); 4,39 (d, J = 2,9 Hz, 1H); 4,33 (dd, J = 11,8, 2,8 Hz, 1H); 4,17 (q, J = 2,7 Hz, 1H); 4,02 (tq, J = 14,7, 8,8, 7,4 Hz, 2H); 3,10 (s, 3H); 2,43–2,39 (m, 1H); 2,24–2,19 (m, 2H); 2,15–2,08 (m, 2H); 2,04 (s, 3H); 1,82 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 170,40; 163,22; 157,86; 155,44; 154,64; 152,11; 149,93; 149,21; 137,78; 136,82; 134,87; 132,11; 130,24; 128,30; 122,10; 121,78; 112,57; 111,63; 105,60; 84,52; 81,62; 74,07; 66,76; 65,86; 47,87; 36,73; 36,64; 25,16; 20,39; 12,58.

Przykład 6

Usuwanie znacznika z 3'-O-Acetylo-5'-(2-{metylo-[6-(2-pirydin-2-yl-winylo)-pirydin-2-yl]-amino}pyloksykarbonylotymidyny

Otrzymany w przykładzie 5 znakowany nukleozyd (1 mg) rozpuszczono w buforze fosforanowym pH 6,86 w (0,5 mL, Ph = 7). Próbkę ogrzewano (90°C), a następnie pobierano co godzinę 50 μm (0,2 OD) i szybko schłodzono do temp 0°C. Po pobraniu 4 próbek wykonano analizę TLC obrazującą rozkład. Ogrzewanie prowadzono 24 godziny i stwierdzono całkowity rozpad substratu. Z płytki TLC wyizolowano produkt rokady i wykonano analizę masową, która potwierdziła masę bicyklicznego sześcioczłonowego produktu 15.

MS-ESI: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3^+$ obliczone 252,1495 [M] $^+$, obserwowane 252 [M] $^+$.

Przykład 7

Usuwanie znacznika z 3'-O-Acetylo-5'-(2-{metylo-[6-(2-pirydin-2-yl-winylo)-pirydin-2-yl]-amino}etyloksykarbonylotymidyny

Otrzymany w przykładzie 2 znakowany nukleozyd rozpuszczono w buforze fosforanowym pH 6,86 w szklanej fiole z zakrętką gwintowaną. Następnie, wytrząsając prowadzono ogrzewanie przy stałej temperaturze 90°C w przeciągu 45 minut, pobierając próbkę w 5, 15, 30 i 45 minucie i po schłodzeniu wykonując jej analizę za pomocą zestawu HPLC wyposażonego w detektor DAD (diodowy w zakresie 220–700 nm) oraz detektor FLD ($\lambda_{\text{abs.}}$ = 370 nm, λ_{em} = 476 nm), stosując kolumnę Synergy Fusion – RP 80 Å (wraz z prekolumną firmy Phenomenex), o wymiarach 150 $\times$ 4,6 mm, stosując metodę gradientową: bufor A (0,01 M octan trietyloamoniowy)/ bufor B (0,01 M octan trietyloamoniowy w 40% acetonitrylu), szybkość przepływu 1 ml/min, czas trwania analizy 30 min. Wyniki kinetyki usuwania barwnika przedstawiono na wykresie: szybkość zaniku formy znakowanej w zależności od czasu – figura 2. Całkowite usunięcie znacznika zachodzi po 45 minutach.

Przykład 8

Powstawanie cyklicznej formy barwnika w wyniku opracowanego sposobu usunięcia znacznika z 3'-O-Acetylo-5'-(2-{metylo-[6-(2-pirydin-2-yl-winylo)-pirydin-2-yl]-amino}etyloksykarbonylotymidyny

Otrzymany w przykładzie 2 znakowany nukleozyd rozpuszczono w buforze fosforanowym pH 6,86 w szklanej fiole z zakrętką gwintowaną. Następnie, wytrząsając prowadzono ogrzewanie w temperaturze 90°C przez 45 minut, do całkowitego zaniku znakowanej biocząsteczki, co stwierdzono za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a uzyskaną pozostałość oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej wypełnionej silikażelem.

^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8,68 (dd, J = 5,1, 1,7 Hz, 1H), 8,04 (dd, J = 8,8, 7,6 Hz, 1H), 7,91 (td, J = 7,7, 1,8 Hz, 1H), 7,82 (d, J = 15,7 Hz, 1H), 7,72 (dt, J = 7,9, 1,1 Hz, 1H), 7,59 (d, J = 15,7 Hz, 1H), 7,48–7,44 (m, 1H), 7,43–7,39 (m, 1H), 7,12 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 4,80 (dd, J = 10,6, 9,0 Hz, 2H), 3,95 (dd, J = 10,6, 9,1 Hz, 2H), 3,10 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 172,75; 171,48; 154,94; 152,61; 150,02; 145,44; 144,12; 138,44; 137,39; 124,78; 120,41; 109,65; 106,01; 49,21; 48,09.

HRMS-ESI: $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3$ obliczone 238,1344 [M+H] $^+$, obserwowane 238,1343 [M+H] $^+$.

Przykład 9

Przekształcenie (E)-2-(metylo{6-[2-(pirydyn-2-yl)winylo]pirydyn-2-yl}amino)etan-1-olu w formę karbaminianową

(E)-2-(metylo{6-[2-(pirydyn-2-yl)winylo]pirydyn-2-yl}amino)etan-1-ol (25 mg, 0,098 mmol) rozpuszczono w bezwodnym acetonitrylu (2 ml) i umieszczono w kolbie z mieszadłem magnetycznym. Do roztworu trzykrotnie dodano 1'-karbonylodiimidazol, w równych ilościach w 15 minutowych odstępach (57,10 mg; 0,36 mmol) i reakcję prowadzono w sumie przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej, a jej przebieg kontrolowano za pomocą TLC (octan etylu/ n-heksan 9/1). Po upływie 1,5 godziny

otrzymano formę karbaminianową aminoalkoholu, którą zastosowano w kolejnym przykładzie, bez jakiegokolwiek izolacji.

Przykład 10

Znakowanie 3'-O-acetylo-N2-isobutyrylodeoksyguanozyny za pomocą karbaminianowej formy barwnika fluorescencyjnego

Do otrzymanego w przykładzie 6 roztworu karbaminianowej formy aminoalkoholu dodano 3'-O-acetylo-N2-isobutyrylodeoksyguanozynę (0,1 mmol) i 1,1,3,3-tetrametyloguanidynę (0,78 mmol). Reakcję mieszano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji kontrolowano za pomocą analizy TLC (dichlorometan/metanol 95/5 v/v). Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, a uzyskaną pozostałość oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym (DCM/MeOH; 0–5% MeOH), otrzymując czysty produkt z wydajnością 30%.

Przykład 11

Usuwanie znacznika z 5'-[6-(2-pirydyn-2-yl-winylo)-pirydyn-2-yl]-aminoetyloksykarbonylo-N2-isobutyryloguanozyny

Otrzymaną według metody opisanej w przykładzie 7 znakowaną N2-isobutyryloguanozynę rozpuszczono w buforze fosforanowym pH 6,86, w 5 porcjach po 1 mg i umieszczono w zamkniętych fiolkach. Następnie, wytrząsając prowadzono ogrzewanie każdej z nich w następujących temperaturach 30, 40, 50, 60 i 70°C i stałym czasie 2 godzin. Po zakończeniu ogrzewania i szybkim schłodzeniu (w suchym lodzie) pobrano próbki i poddano je analizie za pomocą zestawu HPLC wyposażonego w detektor DAD (diodowy w zakresie 220–700 nm) oraz detektor FLD ($\lambda_{\text{abs.}} = 370$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 476$ nm), stosując kolumnę Synergy Fusion – RP 80 Å (wraz z prekolumną firmy Phenomenex), o wymiarach 150 × 4,6 mm, stosując metodę gradientową: bufor A (0,01 M octan trietyloamoniowy)/ bufor B (0,01 M octan trietyloamoniowy w 40% acetonitrylu), szybkość przepływu 1 ml/min, czas trwania analizy 30 min. Kinetykę usuwania barwnika przedstawiono na wykresie: szybkość zaniku formy znakowanej w zależności od temperatury – figura 3. Całkowite usunięcie znacznika obserwuje się w temperaturze 70°C.

Przykład 12

Przekształcenie 2-(pirydyno-2-yl)winylo]pirydynowych aminoalkoholi w formę amidofosforanową

Związek 3(*E*)-2-(metylo{6-[2-(pirydyn-2-yl)winylo]pirydyn-2-yl}amino)etan-1-ol (80 mg; 0,313 mmola) zliofilizowano z benzenu, a następnie suszono pod próżnią wytworzoną przez pompę olejową przez okres 12 h. Następnie związek umieszczono w niewielkiej kolbie okrągłodennej przedmuchanej argonem i zabezpieczonej septą. Do kolby dodano 1 ml bezwodnego dichlorometanu, otrzymując klarowny roztwór barwy żółtej. Dodano w jednej porcji 40,9 μ l (0,235 mmola) *N,N*-diizopropylaoetyloaminy (DIPEA), a następnie roztwór schłodzono do temp. ok. -5°C. Do klarownego roztworu dodano 41,75 mg (0,156 mmola) *N,N,N',N'*-tetraizopropylodiamidochlorofosforynu. W momencie gdy analiza TLC w układzie rozwijającym: heksan/dichlorometan/trójetiloamina; v/v/v; 6/3/1; wykazała połowiczny zanik substratu dodano 15 mg (0,078 mmola) 5-benzylmerkaptotetrazolu (BMT) do całkowitego zaniku substratu. Roztwór odparowano na wyparce obrotowej, a produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy); stosując elucję gradientową w układzie dichlorometan/heksan/trójetiloamina; v/v/v; od 1/8/1 do 2/7/1. Połączone frakcje produktu odparowano na wyparce obrotowej i zliofilizowano z benzenu. Otrzymano w ten sposób 30 mg bis[2-(metylo{6-[2-(pirydyno-2-yl)winylo]pirydyn-2-yl}amino)etylo]*N,N*-diizopropylaoamidofosforynu w postaci żółtego oleju; z wydajnością 30%.

Produkt scharakteryzowano przy użyciu spektroskopii ^{31}P NMR:

^{31}P NMR (400 MHz; benzen): 146,46 (s).

Przykład 13

Przekształcenie 2-(pirydyno-2-yl)winylo]pirydynowych aminoalkoholi w formę amidofosforanową (*E*)-2-(metylo{6-[2-(pirydyn-2-yl)winylo]pirydyn-2-yl}amino)etan-1-ol (80 mg; 0,313 mmola) zliofilizowano z benzenu, a następnie suszono pod próżnią wytworzoną przez pompę olejową przez okres 12 h. Następnie związek ten umieszczono w niewielkiej kolbie okrągłodennej przedmuchanej argonem i zabezpieczonej gumowym kapslem. Do kolby dodano 1 ml bezwodnego dichlorometanu, otrzymując klarowny bezbarwny roztwór. Następnie dodano w jednej porcji 58,56 μ l (0,177 mmola) (2-cyjanoetylo-*N,N,N',N'*-bis(diizopropylodiamido)-fosforynu i pozostawiono otrzymany roztwór na okres 5 minut. Do klarownego roztworu przez okres 1 h dodawano porcjami po około 4,8 mg 5-benzylmerkaptotetrazolu (BMT) (0,128 mmola, 23,7 mg). Otrzymany roztwór pozostawiono w temperaturze pokojowej na okres 1 h. Następnie do roztworu dodano w jednej porcji 70 μ l *N,N*-diizopropylaoaminy (DIPA), a całość odpa-

rowano na wyparce obrotowej. Produkt oczyszczono metodą chromatografii kolumnowej (żel krzemionkowy); stosując elucję gradientową w układzie dichlorometan : heksan : trójetiloamina; v : v : v; 1 : 8 : 1 do 4 : 5 : 1. Połączone frakcje produktu odparowano na wyparce obrotowej, a pozostałość bezzwłocznie zliofilizowano z benzenu. Otrzymano w ten sposób ok. 25 mg 2-metylo{6-[2-(pirydyno-2-ylo)winylo-pirydyn-2-ylo]aminoetylo}-2-cyanoetylo-N,N-diizopropylamido fosforu w postaci sypkiego proszku.

Produkt scharakteryzowano przy użyciu analizy ^{31}P NMR:

^{31}P NMR (400 MHz; benzen- d_6): 146,46 (s).

Przykład 14

Znakowanie oligomeru

Przeprowadzono syntezę 12-merowego oligomeru o sekwencji 5'-TTT TTT TTT TTT-3' na fazie stałej, stosując podłoże krzemianowe Q-dT (Glen Research) oraz komercyjny amido fosforu tymidyny. Syntezę prowadzono wykorzystując automatyczny syntetyzer DNA, powtarzając cyklicznie dla każdego przyłączanego nukleotydu 4 etapy (detrytylacja, kondensacja, kappowanie, utlenianie). W tym celu kolumnkę ze stałym złożem Q-dT napełniano roztworami, dla każdego etapu stosując następujące warunki:

1. detrytylacja: 3% roztwór kwasu dichlorooctowego w chlorku metylenu, czas reakcji 2 minuty;
2. kondensacja: 0,1 molowy roztwór amido fosforu dT w acetonitrylu zmieszany w równych proporcjach z 0,1 molowym roztworem 5-benzyl-merkaptotetrazolu (BMT), czas reakcji 3 minuty;
3. kappowanie: mieszanina dwóch roztworów (A i B) o równych proporcjach, czas reakcji 1 minuta. Roztwór A – 10% roztwór 1-N-metyloimidazolu w tetrahydrofuranie. Roztwór B – 10% roztwór bezwodnika octowego w bezwodnym tetrahydrofuranie;
4. utlenienie: 0,05 molowy roztwór jodu w uwodnionej pirydynie, czas reakcji 1 minuta.

Po każdym takim etapie kolumnkę przepłukuje się bezwodnym acetonitrylem i przedmuchuje suchym argonem. Po przyłączeniu ostatniego oligonukleotydu usunięto ostatnią grupę dimetoksytrylową (etap detrytylacji) i przeprowadzono etap kondensacji, stosując mieszaninę roztworu amido fosforu barwnika (amido fosforu barwnika (12 mg) rozpuszczony w 200 μl suchego ACN) oraz 0,1 molowego roztworu BMT w równych proporcjach. Czas reakcji to 10 minut. Następnie przeprowadzono etap utleniania jw.

Po jego zakończeniu i przepłukaniu kolumny acetonitrylem i przedmuchaniu suchym argonem podłoże umieszczono na 2 minuty w stężonym roztworze amoniaku w temperaturze 22°C. Następnie z roztworu usunięto podłoże krzemianowe przez dekantację, a znakowany oligomer rozpuszczony w amoniaku naniesiono na górę kolumnki LGC MicroPure II. Następnie przeprowadzono przemycanie kolumnki następującymi mieszaninami, każdorazowo zbierając wymyte frakcje do osobnych probówek:

1. 97% 1 M TEAA + 3% MeCN v/v,
2. ultraczysta woda o przewodności równej 18,2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ w 25°C (tzw. H₂O MiliQ),
3. 20% roztwór acetonitrylu w wodzie MiliQ.

Spektrofotometrycznie stwierdzono obecność znakowanego oligonukleotydu we frakcji wymytej za pomocą H₂O MiliQ (w ilości 14 jednostek optycznych OD). Oligonukleotyd odparowano nie stosując grzania i poddano dalszej analizie.

Przykład 15

Oczyszczanie znakowanego oligomeru na HPLC

Przygotowanie analitu: znakowany oligonukleotyd (0,4 OD) rozpuszczono w 500 μl wody MiliQ, wymieszano na Vortexie i odwirowano. Wykonano kolejno pomiar OD przy długości fali 260 nm, na podstawie którego wyznaczono objętość nastrzyku na kolumnę chromatograficzną.

(OD₂₆₀ – 0,528, Objętość analitu – 100 μl).

Warunki analizy:

kolumna Synergy Fusion – RP 80 Å Phenomenex, 150 × 4,6 mm z prekolumną
metoda gradientowa czas trwania 30 min:

- szybkość przepływu 1 ml/min,
- analiza w gradiencie bufor A (0,01 M octan trietyloamoniowy)/ bufor B (0,01 M octan trietyloamoniowy w 40% acetonitrylu),
- Detektor DAD diodowy 220–700 nm,
- Detektor FLD ($\lambda_{\text{abs.}}$ = 370 nm, λ_{em} = 476 nm).

Znakowany oligomer 1, oczyszczony za pomocą chromatografii wysokociśnieniowej HPLC w wyżej wymienionych warunkach, odparowano, a następnie odparowano jeszcze 3-krotnie z wody MiliQ (by pozbyć się resztek buforu TEAA) i zliofilizowano. Otrzymany analit poddano analizie MALDI.

Wartość masy obliczona teoretycznie: 3904,6258 g/mol.

Obserwowana masa znakowanego oligonukleotydu: m/z 3905, 561 Da.

Przykład 16

Usuwanie barwnika z oligomeru

W celu usunięcia znacznika z oligonukleotydu, znakowany oligonukleotyd (w ilości 10 OD) rozpuszczono w 1000 μ l wody MiliQ, wymieszano na Vortexie i odwirowano. Wykonano kolejny pomiar OD przy długości fali 260 nm i na tej podstawie którego wyznaczono objętość roztworu zawierającego 6 OD oligomeru. Roztwór umieszczono w naczyniu z gwintowaną nakrętką i ogrzewano przez 4 godziny w temperaturze 90°C. Co godzinę pobierano z mieszaniny próbkę, która zawierała około 1 OD oligomeru, po ochłodzeniu (suchy lód) każdą z nich poddano analizie za pomocą zestawu HPLC wyposażonego w detektor DAD (diodowy w zakresie 220–700 nm) oraz detektor FLD ($\lambda_{abs.} = 370$ nm, $\lambda_{em} = 476$ nm), stosując kolumnę Synergy Fusion – RP 80 Å (wraz z prekolumną firmy Phenomenex), o wymiarach 150 $\times$ 4,6 mm, stosując metodę gradientową: bufor A (0,01 M octan trietyloamoniowy)/ bufor B (0,01 M octan trietyloamoniowy w 40% acetonitrylu), szybkość przepływu 1 ml/min, czas trwania analizy 30 min. Wyniki analiz usuwania barwnika przedstawiono na chromatogramach RPHPLC.

I tak:

- na figurze 5 przedstawiono chromatogramy oligomeru nieogrzewanego oraz ogrzewanego przez 2 i 4 godziny, zarejestrowane z wykorzystaniem detektora DAD,
- na figurze 6 przedstawiono chromatogramy oligomeru nieogrzewanego oraz ogrzewanego przez 2 i 4 godziny, zarejestrowane z wykorzystaniem detektora fluorescencyjnego przy wzbudzeniu 370 i emisji 480.

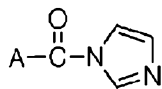
Tabela 1

Czas retencji poszczególnych związków na kolumnie Synergy Fusion – RP 80 Å podczas analizy z użyciem zestawu HPLC wykonanej w powyżej opisanych warunkach dla analizowanych związków

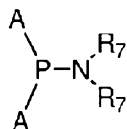
rodzaj substancji	Czas retencji [min]
Znakowany oligonukleotyd	14,49
Oligonukleotyd bez barwnika	12,57
Cykliczna forma barwnika	22,64-24,52

Zastrzeżenia patentowe

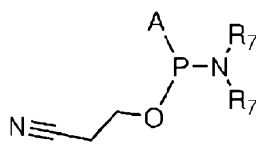
1. Znaczniki fluorescencyjne na bazie prekursorów o wzorach ogólnych 1, 2 lub 3



1)

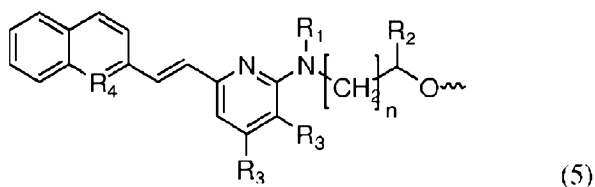
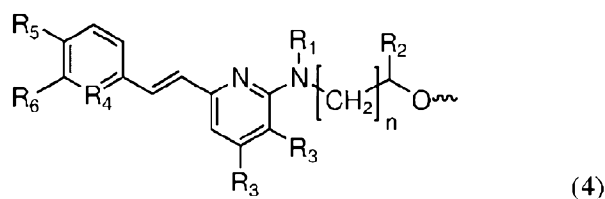


2)



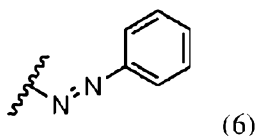
(3)

w których A oznacza grupę o wzorze ogólnym 4 lub 5

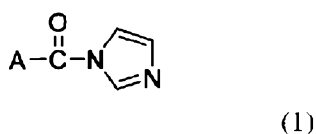


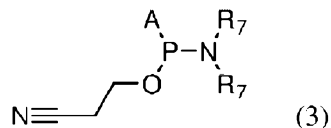
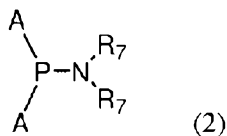
w których:

- n przyjmuje wartość 1 lub 2,
- „~” oznacza wiązanie pomiędzy tlenem grupy A a atomem węgla prekursora o wzorze ogólnym 1 lub tlenem grupy A a atomem fosforu prekursora o wzorze ogólnym 2 lub 3,
- R₁ oznacza:
 - o wodór, metyl, grupę aminową, grupę karbonylową, naftyl, naftylometyl, fenyl, benzyl, chinolinometyl,
 - o benzyl podstawiony jednym lub kilkoma takimi samymi lub różnymi podstawnikami: chlorem, fluorem, metylem,
 - o nasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla, nienasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla oraz jedno wiązanie podwójne, nasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla podstawiony fenylem, grupą aminową, grupą hydroksylową lub równocześnie fenylem i grupą hydroksylową lub fenylem i grupą aminową,
- R₂ oznacza: wodór, metyl, benzyl, fenyl, naftyl, nasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla, nienasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla oraz jedno wiązanie podwójne,
- R₃ są takie same lub różne i oznaczają wodór, metyl, nasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla, nienasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla oraz jedno wiązanie podwójne, grupę aminową, grupę nitrową, grupę azydkową, grupę o wzorze ogólnym 6

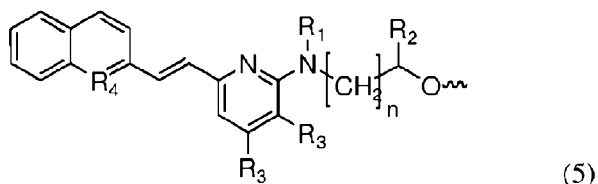
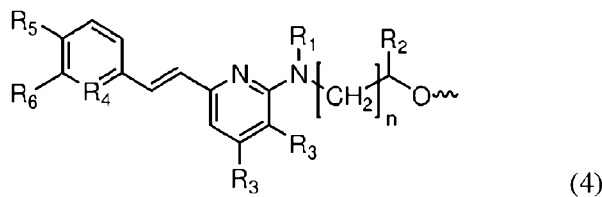


- R₄ oznacza azot,
 - R₅ i R₆ są takie same lub różne i oznaczają wodór, metyl, benzyl, fenyl, naftyl, halogen (F, Cl, Br, I), hydroksyl, grupę aminową, grupę nitrową, grupę karboksylową, nasycony alkil zawierający 2 do 8 atomów węgla, nienasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla oraz jedno wiązanie podwójne, nienasycony alkil zawierający 2 do 8 atomów węgla oraz jedno wiązanie podwójne podstawiony fenylem,
 - R₇ oznacza izo-propyl.
2. Sposób znakowania nukleozydów, nukleotydów lub oligonukleotydów barwnikami fluorescencyjnymi **znamienny tym**, że do nukleozydów, nukleotydów lub oligonukleotydów przyłącza się prekursor o wzorach ogólnych 1, 2 lub 3



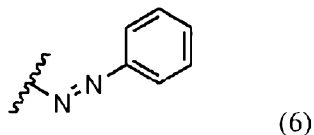


w których A oznacza grupę o wzorze 4 lub 5



w których:

- n przyjmuje wartość 1 lub 2,
- „~” oznacza wiązanie pomiędzy tlenem grupy A a atomem węgla prekursora o wzorze ogólnym 1 lub tlenem grupy A a atomem fosforem prekursora o wzorze ogólnym 2 lub 3,
- R₁ oznacza:
 - o wodór, metyl, grupę aminową, grupę karbonylową, naftyl, naftylometyl, fenyl, benzyl, chinolinometyl,
 - o benzyl podstawiony jednym lub kilkoma takimi samymi lub różnymi podstawnikami: chlorem, fluorem, metylem,
 - o nasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla, nienasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla oraz jedno wiązanie podwójne, nasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla podstawiony fenylem, grupą aminową, grupą hydroksylową lub równocześnie fenylem i grupą hydroksylową lub fenylem i grupą aminową,
- R₂ oznacza: wodór, metyl, benzyl, fenyl, naftyl, nasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla, nienasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla oraz jedno wiązanie podwójne,
- R₃ są takie same lub różne i oznaczają wodór, metyl, nasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla, nienasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla oraz jedno wiązanie podwójne, grupę aminową, grupę nitrową, grupę azydkową, grupę o wzorze ogólnym 6

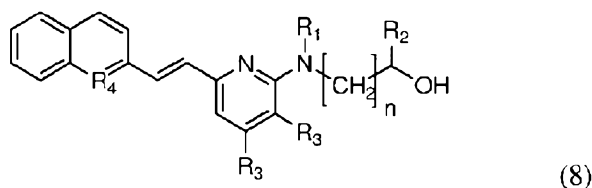
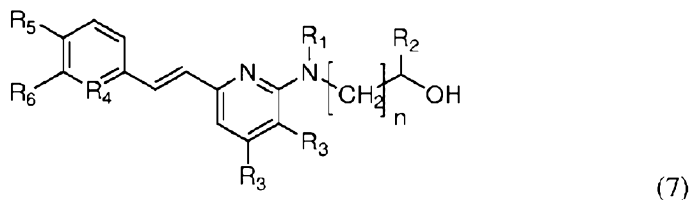


- R₄ oznacza azot,
- R₅ i R₆ są takie same lub różne i oznaczają wodór, metyl, benzyl, fenyl, naftyl, halogen (F, Cl, Br, I), hydroksyl, grupę aminową, grupę nitrową, grupę karboksylową, nasycony alkil zawierający 2 do 8 atomów węgla, nienasycony alkil zawierający od 2 do 8 atomów węgla

oraz jedno wiązanie podwójne, nienasycony alkil zawierający 2 do 8 atomów węgla oraz jedno wiązanie podwójne podstawiony fenylem,

– R_7 oznacza izo-propyl,

przy czym w celu przyłączenia tych znaczników w pierwszy etapie związku o wzorach ogólnych 7 lub 8



w których n , R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 i R_6 mają wyżej podane znaczenie, poddaje się reakcji chemicznej z karbodiimidazolem lub z (2-cyanoctylo)- N,N,N',N' -bis(diizopropylamido)fosforem lub z N,N,N',N' -tetraizopropylodiamidochlorofosforem, a następnie uzyskany prekursor poddaje się reakcji z wolną pierwszorzędową grupą hydroksylową lub aminową nukleozydu, nukleotydu lub oligonukleotydu.

3. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że w pierwszym etapie przeprowadza się reakcję pomiędzy związkiem 7 lub 8 a karbodiimidazolem w bezwodnym polarnym aprotycznym rozpuszczalniku organicznym, korzystnie acetonitrylu lub tetrahydrofuranie w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie argonu, przy czym reakcję prowadzi się w temperaturze nie wyższej niż 30°C.
4. Sposób według zastrz. 3 **znamienny tym**, że stosunek molowy związku o wzorze ogólnym 7 lub 8 do karbodiimidazolu wynosi w przedziale od 1 : 1 do 1 : 1,5, korzystnie w stosunku molowym 1 : 1,3.
5. Sposób według zastrz. 2 albo 3, albo 4 **znamienny tym**, że po zakończeniu pierwszego etapu do mieszaniny reakcyjnej dodaje się nukleozyd, nukleotyd lub oligonukleotyd w stosunku molowym w przedziale od 1 : 1 do 1 : 2, korzystnie w stosunku 1 : 1,5 molowym do związku o wzorze ogólnym 1, przy czym reakcję prowadzi się z dodatkiem nienukleofilowej zasady organicznej z grupy imin, pochodnych guanidyny, korzystnie tetrametyloguanidyny w stosunku molowym do nukleozydu, nukleotydu lub oligonukleotydu w przedziale od 0,3 : 1 do 7,8 : 1 mola, korzystnie 3,5 : 1 mola, w temperaturze nie wyższej niż 30°C.
6. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że w przypadku prekursorów o wzorze ogólnym 2, w pierwszym etapie przeprowadza się reakcję pomiędzy związkiem 7 lub 8 a N,N,N',N' -tetraizopropylodiamidochlorofosforem w bezwodnym aprotycznym rozpuszczalniku organicznym, korzystnie acetonitrylu lub chlorku metylenu, w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie argonu w obecności bezwodnej trzeciorzędowej aminy alifatycznej, korzystnie diizopropyleotylaminy, przy czym reakcję prowadzi się w temperaturze nie wyższej niż 30°C.
7. Sposób według zastrz. 6 **znamienny tym**, że N,N,N',N' -tetraizopropylodiamidochlorofosforem stosuje się w stosunku molowym od 0,8 : 1 do 1,1 : 1, korzystnie w stosunku molowym 1 : 1 do związku o wzorze ogólnym 7 lub 8.
8. Sposób według zastrz. 6 lub 7 **znamienny tym**, że po zaniku substratu, w drugim etapie dodaje się taką samą ilość barwnika fluorescencyjnego według wzoru 7 lub 8, jaką dodano w pierwszym etapie, oraz pochodną 1-*H*-tetrazolu, korzystnie 5-benzylmercaptotetrazol w stosunku molowym do barwnika fluorescencyjnego o wzorze ogólnym 7 lub 8 dodanego w drugim etapie reakcji od 0,2 : 1 do 0,8 : 1, korzystnie w stosunku molowym 0,5 : 1.
9. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że w przypadku prekursorów o wzorze ogólnym 3, w pierwszym etapie przeprowadza się reakcję pomiędzy związkiem o wzorze ogólnym 7 lub 8

a (2-cyjanoetylo)-*N,N,N',N'*-bis(diizopropylodiamido)fosforynem w bezwodnym aprotycznym rozpuszczalniku organicznym, korzystnie acetonitrylu lub chlorku metylenu, w atmosferze gazu obojętnego, korzystnie argonu, przy czym reakcję prowadzi się w temperaturze nie wyższej niż 30°C.

10. Sposób według zastrz. 8 **znamienny tym**, że (2-cyjanoetylo)-*N,N,N',N'*-bis(diizopropylodiamido)fosforynu stosuje się w stosunku molowym do zastosowanego barwnika fluorescencyjnego o wzorze ogólnym 7 lub 8 w przedziale od 0,8 : 1 do 1,1 : 1, korzystnie 1 : 1.
11. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że przeprowadza się reakcję pomiędzy prekursorem o wzorze ogólnym 2 a nukleozydem lub nukleotydem, lub oligonukleotydem posiadającym wolną grupę hydroksylową lub aminową, w bezwodnym aprotycznym rozpuszczalniku organicznym, korzystnie acetonitrylu, chlorku metylenu lub toluenie w obecności pochodnej 1-*H*-tetrazolu, korzystnie 5-benzyl-merkaptotetrazolu w stosunku molowym nie mniejszym niż 1 : 1 do prekursora o wzorze ogólnym 2, a następnie po zakończeniu reakcji przyłączenia prekursora o wzorze ogólnym 2 do grupy hydroksylowej nukleozydu, nukleotydu lub oligonukleotydu przeprowadza się reakcję utleniania atomów fosforu z III do V stopnia utlenienia za pomocą czynnika utleniającego, korzystnie roztworu jodu w uwodnionej pirydynie.
12. Sposób według zastrz. 2 **znamienny tym**, że proporcja molowa mieszaniny amidofosforynu z pochodną 1-*H*-tetrazolu, korzystnie 5-benzyl-merkaptotetrazolu, w stosunku do nukleozydu, nukleotydu lub oligonukleotydu dla reakcji prowadzonych w fazie ciekłej wynosi odpowiednio 2 : 1.

Rysunki

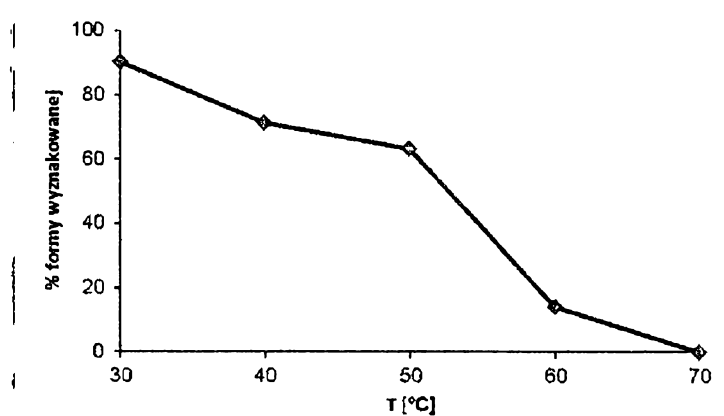


Fig. 1

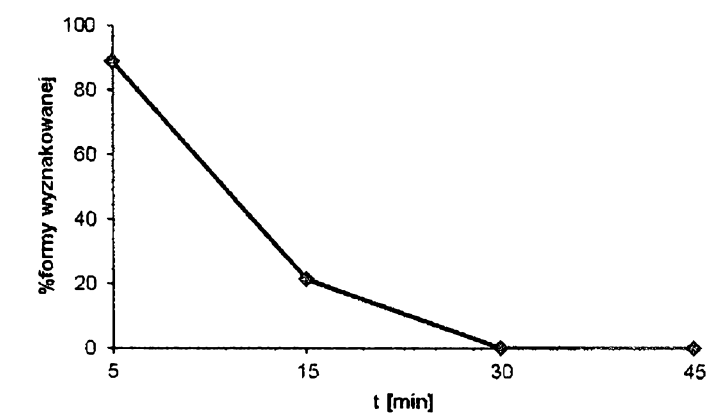


Fig. 2

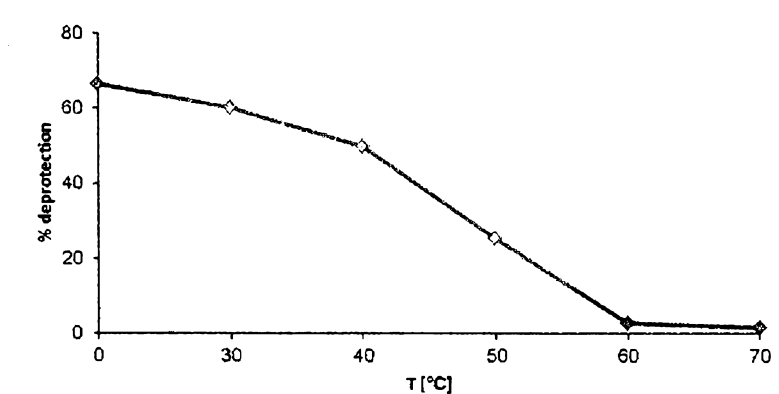


Fig. 3

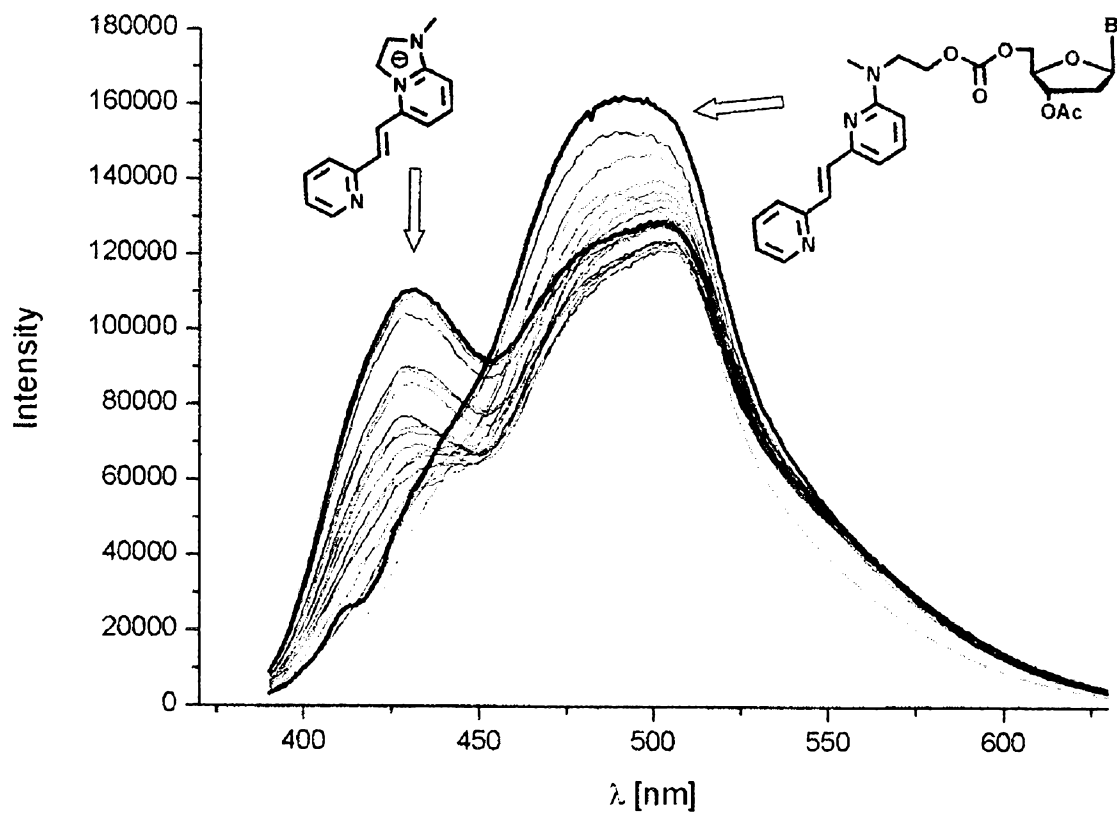


Fig. 4

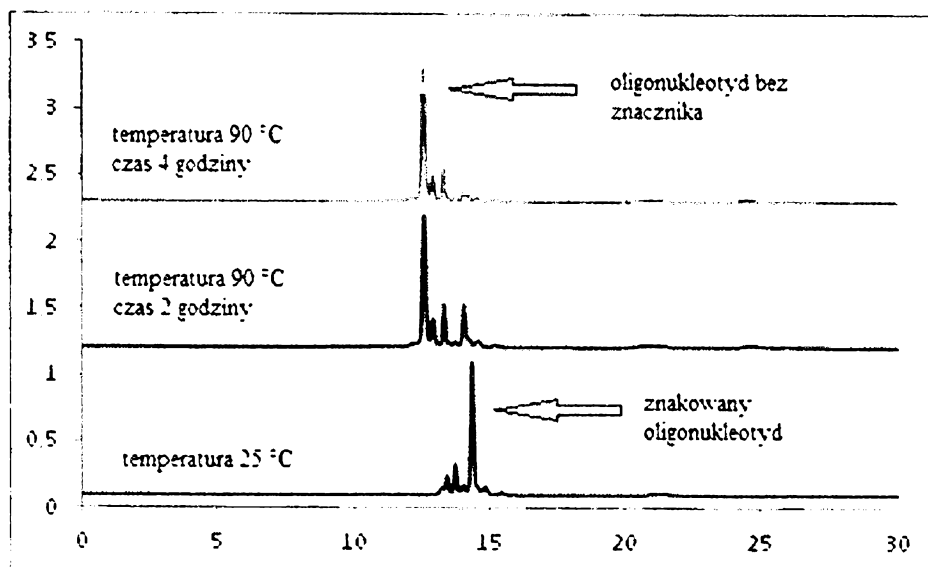
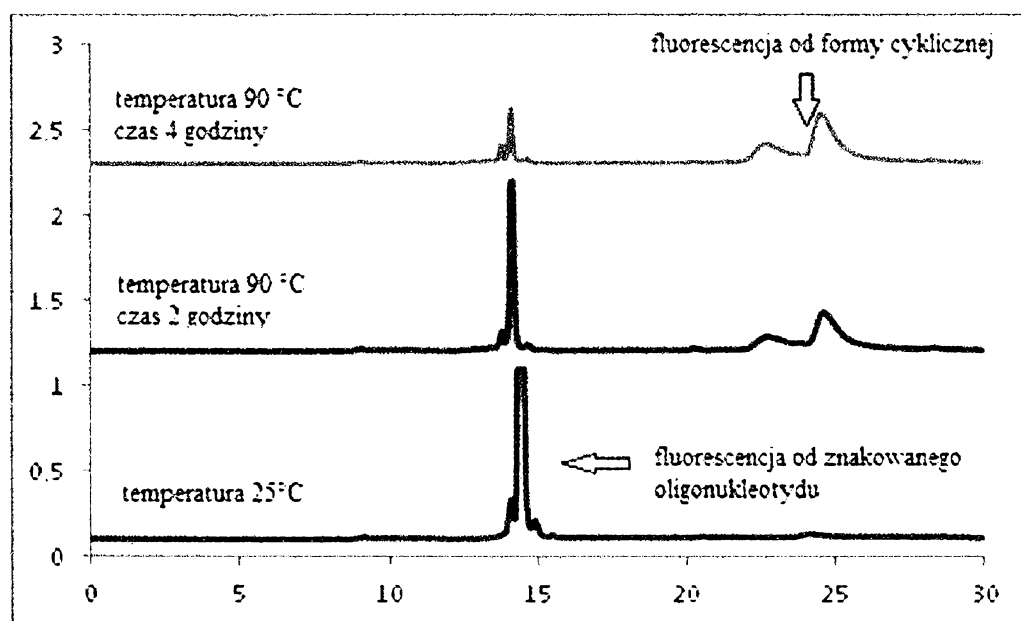


Fig. 5

**Fig. 6**