

W 1978 roku Zamecnik i Stephenson rozpoczęli nową erę w biologii molekularnej poprzez zastosowanie syntetycznego oligonukleotydu DNA do zahamowania translacji RNA obecnego w retrowirusie *Rous sarcoma*. Było to możliwe ponieważ zdefiniowane przez Watsona i Cricka reguły oddziaływania pomiędzy zasadami nukleinowymi pozwalają na zaprojektowanie sekwencji oligonukleotydu rozpoznającej wybrany fragment stanowiącej cel terapeutyczny cząsteczki kwasu nukleinowego. Badania prowadzone przez kolejne lata pokazały istnienie kilku mechanizmów wewnątrzkomórkowych, dzięki którym ta docelowa cząsteczka po utworzeniu możliwie trwałego kompleksu z podaną sondą przestaje wykonywać swoją pierwotną funkcję. Stosując takie podejście można hamować ekspresję genów (na przykład onkogenów) poprzez blokowanie procesu transkrypcji (DNA→mRNA) lub translacji (mRNA→białko). Jednak aby takie oligonukleotydy znalazły zastosowanie terapeutyczne powinny być odporne na działanie egzo- i endonukleaz, które w komórce jak i w przestrzeni międzykomórkowej hydrolizują oligonukleotydy DNA i RNA, o których organizm „wie”, że są obce i mogą stanowić zagrożenie. Zwiększenie odporności na działanie nukleaz może zostać osiągnięte poprzez wprowadzenie modyfikacji chemicznych w obrębie zasady heterocyklicznej, reszty cukrowej lub wiązania internukleotydu, ale nie powinno się to wiązać ze zmniejszeniem trwałości termodynamicznej mających powstać kompleksów sonda/DNA lub sonda/mRNA. Jedną z pierwszych wprowadzonych modyfikacji, która okazała się być ogromnie użyteczną, było zastąpienie niemoistkowego atomu tlenu grupy fosforanowej atomem siarki, a powstałe w ten sposób oligomery tiofosforanowe pozostają izoelektronowe z naturalnymi i zachowują dobre właściwości hybrydazyjne. Jednak atomy fosforu w tak zmienionym wiązaniu internukleotydu stają się centrami stereogenicznymi i przez długi czas chemicznie syntezowane związki były mieszaniną setek lub nawet tysięcy możliwych P-diastereoizomerów. Dopiero tzw. metoda oksatiafosfolanowa (opracowana w naszym Zakładzie) pozwoliła na syntezę P-stereozydefiniowanych oligonukleotydów, które w doświadczeniach biologicznych pokazały istotne różnice zależne od konfiguracji absolutnej atomów fosforu.

Celem niniejszego projektu jest synteza **P-stereozydefiniowanych tiofosforanowych analogów kwasów nukleinowych** zawierających jeszcze jedną modyfikację, którą jest zastąpienie naturalnej reszty deoksyrybozy sześcioczłonowym **pierścieniem morfoliny**, w wyniku czego grupy tiofosforanowe stają się amidotiofosforanowymi (tutaj jak i w opisie szczegółowym projektu stosowany jest skrót sTMO, P-stereodefinied Thiophosphoramidate Morpholino Oligonucleotides). Inspiracją do podjęcia tej tematyki były dla mnie wyniki prac prowadzonych w zespole profesora Marvina Caruthersa (Uniwersytet Kolorado, Boulder), gdzie metodą amidofosforynową zsyntezowano TMO w postaci mieszaniny wszystkich P-diastereoizomerów. Ponieważ nawet w tej formie TMO wykazują interesujące właściwości biologiczne i znaczny potencjał terapeutyczny, dostrzegłam możliwość, iż pożądane aktywności TMO mogą być uzyskane stosując jedynie pewną frakcję próbki - tę o sprzyjającej stereochemii atomów fosforu. W ten sposób mogą ulec ograniczeniu efekty niepożądane wywołane przez nieaktywne cząsteczki podanej sondy. Aby móc badać te zjawiska planowana jest synteza 4-6 sTMO oraz oligonukleotydów typu *gapmer*  $R_P$ - i  $S_P$ -[sTMO/DNA/sTMO] o długości 10-12 nukleotydów z wykorzystaniem metody oksatiafosfolanowej. Pierwsza część projektu obejmuje syntezę morfolinowych analogów nukleotydów, opracowanie metody ich przekształcenia w odpowiednie monomery oksatiafosfolanowe i znalezienie warunków rozdzielania monomerów na P-diastereoizomery. Ważnym elementem będzie określenie metodą rentgenostrukturalną konfiguracji absolutnej atomów fosforu w rozdzielonych P-diastereoizomerach. Czyste P-diastereoizomery będą następnie wykorzystane do syntezy  $R_P$ - i  $S_P$ -sTMO oraz w/w *gapmerów*. W drugim etapie projektu zostanie określony wpływ czynnika stereochemicznego na ich zdolności hybrydazyjne z komplementarnymi oligonukleotydami typu DNA i RNA (wyznaczenie wartości temperatur mięknięcia  $T_m$ ) oraz na konformację tworzonych struktur (z użyciem techniki CD, *Circular Dichroism*). Właściwości biologiczne wybranych  $R_P$ - i  $S_P$ -sTMO będą porównane z właściwościami TMO otrzymanymi metodą amidofosforynową. Uzupełnieniem tej części projektu będzie badanie trwałości wybranych oligonukleotydów w ludzkim osoczu.

Koncepcja zastosowania  $R_P$ - i  $S_P$ -sTMO oraz *gapmerów*  $R_P$ - i  $S_P$ -[sTMO/DNA/sTMO] jako sekwencyjnie specyficznych sond trwale kompleksujących oligonukleotydy docelowe wpisuje się w nurt poszukiwań narzędzi molekularnych służących modulowaniu właściwości fizykochemicznych i biologicznych oligonukleotydów. W dalszej perspektywie być może będzie ich wykorzystanie w terapii bądź diagnostyce. Jest to nurt badań intensywnie rozwijany i powoli przynoszący wymierne korzyści w postaci rejestracji i wprowadzania na rynek farmaceutyczny leków opartych na kwasach nukleinowych zawierających internukleotydu wiązania tiofosforanowe (*Vitravene*) czy reszty morfolinowe (*Eteplirsen*, *Golodirsen*).