



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **409328**

(22) Data zgłoszenia: **29.08.2014**

(51) Int.Cl.
C07D 409/14 (2006.01)
C08F 34/04 (2006.01)
C08F 234/04 (2006.01)
C08F 2/58 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)

(54) **1-Tyminooctan 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenylu i sposób jego wytwarzania, warstwa przewodzącego polimeru w drukowany molekularnie z zastosowaniem pochodnych tiofenu i sposób jej wytworzenia oraz jej zastosowanie do selektywnego wykrywania i oznaczenia**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
14.03.2016 BUP 06/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
28.09.2018 WUP 09/18

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT CHEMII FIZYCZNEJ POLSKIEJ
AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**KATARZYNA BARTOŁD, Maków Mazowiecki, PL
AGNIESZKA PIETRZYK-LE, Warszawa, PL
HUYNH TAN-PHAT, Warszawa, PL
ZOFIA ISKIERKO, Warszawa, PL
KRZYSZTOF NOWORYTA, Warszawa, PL
MARTA SOSNOWSKA, Warszawa, PL
WOJCIECH LISOWSKI, Warszawa, PL
WŁODZIMIERZ KUTNER, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Renata Piekarz

Opis wynalazku

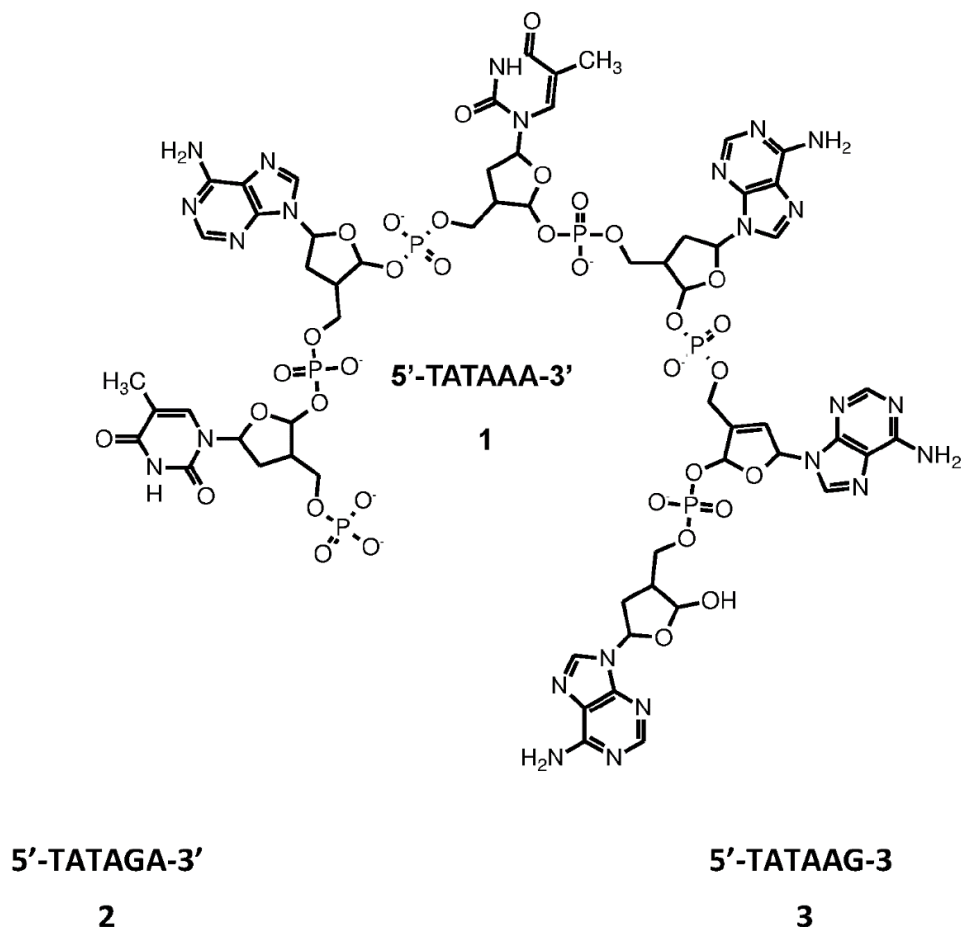
Przedmiotem wynalazku jest 1-tyminoocetan 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenylu i sposób jego wytwarzania, warstwa przewodzącego polimeru wdrukowywanego molekularnie z zastosowaniem pochodnych tiofenu i sposób jej wytworzenia oraz jej zastosowanie do selektywnego wykrywania i oznaczania oligonukleotydu TATAAA (T – tymina, A – adenina).

Stan techniki

Genomika zawdzięcza oligonukleotydowi TATAAA **1** (Schemat 1) rozpoczęcie transkrypcji. Ten heksanukleotyd, zawierający cztery cząsteczki adeniny (A) i dwie cząsteczki tyminy (T), charakteryzuje się sekwencją promotorową tych zasad, bez której niemożliwe jest rozpoczęcie transkrypcji. Co więcej, transkrypcja nie może się rozpocząć w przypadkowym miejscu matrycy DNA {S. Grünberg et al., Trends Biochem. Sci. **2013**, 38, 603; L. Stryer et al., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa **2009**}. Miejscem rozpoczęcia transkrypcji musi być początek genu. Sygnały rozpoczęcia transkrypcji są zawarte w promotorowej sekwencji zasad nukleinowych, położonej bezpośrednio przed sekwencją genu, który ulega transkrypcji. Promotorowe sekwencje nukleotydów to miejsca specyficznego przyłączenia polimerazy RNA II.

Miejsca promotorowe eukariotycznych genów kodujących białka zawierają nukleotydy o sekwencji zgodnej z sekwencją oligonukleotydu TATAAA w rejonie ~25 nukleotydów od miejsca rozpoczęcia transkrypcji. Kaseta TATA (ang. TATA box) {Y. Kim et al., *Nature* **1993**, 365, 512} w tych genach, zwana też kasetą Hognessa, jest podobna do kasety Pribnowa (o sekwencji zgodnej TATAAT) w genach prokariotycznych, z tym że jest ona zlokalizowana w większej odległości od miejsca transkrypcji pierwszego nukleotydu niż w genach prokariotycznych (tj. w odległości 10 nukleotydów przed pierwszym nukleotydem ulegającym transkrypcji).

DNA może pochłaniać energię promienistą (co umożliwi rejestrwanie widm absorpcyjnych UV-vis, IR, NMR i CD), emitować ją po wzbudzeniu (co umożliwi rejestrwanie widm fluorescencyjnych), jak i ją rozpraszać (co umożliwi rejestrwanie widm Ramana). Dlatego wszystkie te techniki spektroskopowe są powszechnie stosowane do oznaczania DNA.



Schemat 1. Wzór strukturalny szablonu i analitu, tj. oligonukleotydu TATAAA **1**, skrócony zapis substancji przeszkadzających w oznaczaniu TATAAA, tj. oligonukleotydu TATAGA **2** i TATA AG **3**.

Do oznaczania DNA coraz częściej stosuje się również biocujniki elektrochemiczne {E. G. Hvastkovs et al., *Analyst* **2010**, 135, 1817}. Przyczyną tej rosnącej popularności są ich zalety, które wykazują w porównaniu do innych metod oznaczania DNA. Mianowicie, oznaczenia wykonywane z ich zastosowaniem są w miarę proste, szybkie i stosunkowo czułe. Wynik tych oznaczeń jest dostępny natychmiast po pomiarze, przeciwnie do różnego rodzaju testów genetycznych czy biologicznych. Przeważnie biocujniki są niewielkich rozmiarów, co pozwala ograniczyć wymaganą objętość roztworu próbki i odczynników {G. Bidan et al., *Synth. Met.* **1999**, 102, 1363}. Za pomocą biocujników można oznaczać DNA zarówno w roztworach wodnych jak i aprotycznych. Co więcej, koszty produkcji elektrochemicznych biocujników do oznaczania DNA i pomiarów wykonanych z ich pomocą są o wiele niższe niż koszty oznaczeń wykonanych za pomocą innych metod analitycznych {E. G. Hvastkovs and D. A. Buttry, *Analyst* **2010**, 135, 1817; A. Sassolas et al., *Chem. Rev.* **2008**, 108, 109; E. Paleček et al., *Chem. Rev.* **2012**, 112, 3427}.

Opracowane i wykonane przez nas czujniki do selektywnego oznaczania wybranych oligonukleotydów to czujniki chemiczne a nie biochemiczne, ponieważ elementem rozpoznającym jest w nich syntetyczny polimer. Nasze czujniki będzie można zastosować, m.in. w inżynierii genetycznej, jako „chipy” (układy scalone) DNA, tj. odpowiedniki tzw. sond molekularnych do testów genetycznych. W biologii molekularnej, sondy molekularne to związki chemiczne zdolne do specyficznego przyłączenia wykrywanych substancji. Związki te mają właściwości umożliwiające wykrycie tych substancji. Sondy DNA wykrywają zamiany pojedynczych nukleotydów w łańcuchu DNA prowadzące do punktowych mutacji. Do takich należy np. mutacja w łańcuchu DNA, który koduje łańcuch beta hemoglobiny. Mutacja ta jest przyczyną anemii sierpowatej. Dzięki testom genetycznym za pomocą niniejszego wynalazku możliwe będzie wczesne wykrycie wielu dziedzicznych chorób genetycznych. Choroby genetyczne stanowią problem kliniczny w każdej specjalności medycznej. Na przykład w zakresie diagnostyki prenatalnej zalecane jest wykonanie szeregu diagnostycznych badań genetycznych. Następnie, w pierwszych dniach życia noworodka, wykonywane są testy przesiewowe w kierunku fenyloketonurii i wrodzonej niedoczynności tarczycy.

Nasze badania stworzą nowe możliwości diagnostyczne i terapeutyczne, w szczególności w odniesieniu do chorób nowotworowych, za które odpowiedzialne są zmutowane geny. Do nich zwłaszcza należą badania obejmujące blokowanie ekspresji wybranego genu za pomocą oligonukleotydów antysensowych. Próby terapeutyczne wyłączające ekspresję genów odpowiedzialnych za przebieg różnych chorób genetycznych za pomocą oligonukleotydów antysensowych są również obiecujące w angioplastyce naczyń wieńcowych, w leczeniu chorób neurologicznych oraz niektórych chorób wirusowych i chorób wywołanych przez pasożyty.

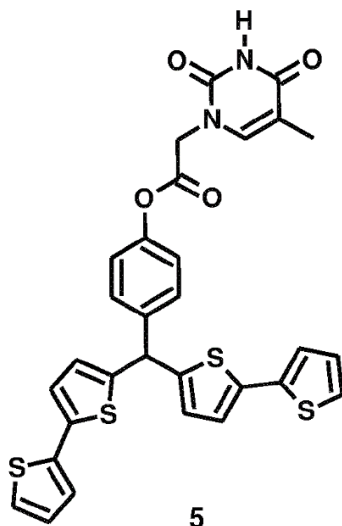
Ponadto nasze badania mogą przyczynić się do rozwoju nowych technik wykorzystujących mutagenezę sterowaną oligonukleotydami, a ta może znacznie usprawnić i przyspieszyć, np. produkcję roślinną.

Naprzeciw powyższym wyzwaniom diagnostycznym, terapeutycznym czy rolniczym wychodzą chemocujniki z warstwą zdolną do selektywnego przyłączania oligonukleotydu o sekwencji TATAAA w celu jego rozpoznawania. Obiecującą metodą przygotowania tych warstw jest synteza tak zwanych polimerów wdrukowanych molekularnie (ang. molecularly imprinted polymers, MIPów). W ostatnich latach ich zastosowanie do biomimetycznego rozpoznawania różnych analitów w celu ich selektywnego oznaczania wzrasta {K. Haupt et al., *Chem. Rev.* **2000**, 100, 2495; C. Malitesta et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402, 1827; P. S. Sharma et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402, 3177}. Jednakże dotychczas nie zastosowano takiej warstwy do budowy selektywnego chemocujnika rozpoznającego oligonukleotydową sekwencję TATAAA {H. Peng et al., *Biomaterials* **2009**, 30, 2132; S. J. Li et al., *Prog. Polym. Sci.* **2013**, 39, 145}. Polimery przewodzące były stosowane do oznaczania DNA, jednakże nie do oznaczania sekwencji TATAAA {N. K. Guimard et al., *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 32, 876; M. Ates, *Mater. Sci. Eng., C* **2013**, 33, 1853; L. A. Thompson et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 324; K. Sreenivasan, *React. Funct. Polym.* **2007**, 67, 859}. Tak więc celowa jest budowa chemocujnika do wykrywania i selektywnego oznaczania TATAAA, poprzez opracowanie i wykonanie dedykowanej warstwy MIPu i zastosowanie jej jako elementu rozpoznającego chemocujnika.

Dlatego celem niniejszego wynalazku jest zastosowanie znanego 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-yl)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-yl)metanu] **4** (Fig. 1a i Schemat 7) oraz opracowanie i zsyntety-

zowanie 1-tyminooctanu 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenylu **5** (Fig. 1a i Schemat 3). Związki te jako monomery funkcyjne wykorzystuje się, po spolimeryzowaniu, do budowy chemicznego czujnika do oznaczania oligonukleotydu o sekwencji TATAAA. Kolejnym celem wynalazku jest opracowanie warstwy polimeru wdrukowanego za pomocą oligonukleotydu TATAAA (MIP-TATAAA) i metody jej przygotowania oraz jej zastosowanie jako warstwy selektywnie rozpoznającej TATAAA **1**, a nie różniące się jednym nukleotydem oligonukleotydy takie jak TATAGA **2** lub TATAAG **3**. Ponadto cel wynalazku polega na zintegrowaniu warstwy tego polimeru z przetwornikiem sygnału rozpoznawania chemicznego na sygnał analityczny.

Obecny wynalazek obejmuje związek, 1-tyminooctan 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo) fenylu, o wzorze 5:



Schemat 3. Wzór strukturalny monomeru funkcyjnego, 1-tyminooctanu 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenylu **5**.

Wynalazek również obejmuje sposób wytwarzania 1-tyminooctanu 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenylu **5**, charakteryzujący się tym, że składa się z następujących etapów:

(1) wyjściowy roztwór 2,2'-bisbitiofenu w glikolu etylenowym poddaje się reakcji z 4-karboksybenzaldehydem i kwasem chlorowym(VII) z wytworzeniem *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylometylo)benzooesanu glikolu, a następnie

(2) ten *p*-bis(2,2'-bitien-5-ylometylo)benzooesan glikolu poddaje się reakcji z eterem dietylowym i otrzymuje się 4-[di-2,2'-bitien-5-ylometylo]fenol, po czym

(3) mieszaninę 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenolu i kwasu 1-tyminooctowego w rozpuszczalniku organicznym, korzystnie dichlorometanie, poddaje się reakcji z *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidem (DCC), w wyniku czego otrzymuje się 1-tyminooctan 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenylu **5**.

Korzystnie, Etap 1 tego sposobu prowadzi się z zastosowaniem glikolu etylenowego, w atmosferze gazu obojętnego, w temperaturze w zakresie od 50 do 70°C, korzystnie w 60°C, przez 22 do 26 godz., korzystnie 24 godz., przy stosunku molowym reagentów względem 4-karboksybenzaldehydu w zakresie od 2 do 4, korzystnie 3, dla 2,2'-bisbitiofenu i od 20 do 60, korzystnie 45, dla kwasu chlorowego(VII).

Korzystnie, Etap 2 tego sposobu prowadzi się w atmosferze gazu obojętnego, w temperaturze w zakresie od 20 do 35°C, korzystnie w temperaturze 25°C, a następnie dodaje się eter dietylowy, korzystnie dwa razy większą objętość eteru dietylowego niż kwasu chlorowego(VII).

Korzystnie, Etap 3 tego sposobu prowadzi się w atmosferze gazu obojętnego, w temperaturze w zakresie od 20 do 30°C, korzystnie w 25°C, przez 15 do 21 godz., korzystnie 18 godz., przy stosunku molowym reagentów względem kwasu 1-tyminooctowego w zakresie od 0,5 do 3, korzystnie 1,73, dla 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenolu i od 0,5 do 3, korzystnie 1,64 dla *N,N'*-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC).

Ponadto wynalazek obejmuje polimer rozpoznający, korzystnie w postaci warstwy, wytworzony metodą wdrukowywania molekularnego, charakteryzujący się tym, że stanowi ją polimer zawierający jako monomery funkcyjne 4-[2-(6-amino-9*H*-puryn-9-yl)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylometylo)metan] **4**

(Fig. 1a) i 1-tyminooctan 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenylu **5** (Fig. 1a) oraz jako monomer sieciujący (2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofen **6** (Schemat 4).

Wynalazek obejmuje również sposób wytworzenia warstwy rozpoznającego polimeru, metodą molekularnego wdrukowania, za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej w warunkach potencjodynamicznych, charakteryzującej się tym, że do elektropolimeryzacji stosuje się jako monomery funkcyjne 4-[2-(6-amino-9*H*-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan] **4** i 1-tyminooctan 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenylu **5**, oraz monomer sieciujący (2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofen **6**.

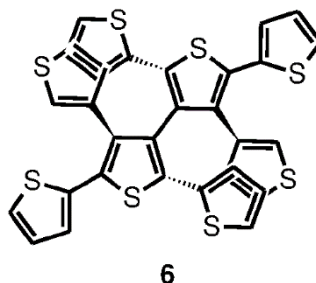
Korzystnie, jako szablon/analit stosuje się oligonukleotyd, korzystnie oligonukleotyd TATAAA.

Korzystnie, do polimeryzacji stosuje się roztwór mieszanych rozpuszczalników, korzystnie acetonitrylu, wody, toluenu i izopropanolu o stosunku objętościowym jak, odpowiednio, 7,5 : 1 : 1 : 0,5, zawierający oligonukleotyd TATAAA **1**, 4-[2-(6-amino-9*H*-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan] **4**, 1-tyminooctan 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenylu **5**, (2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofen **6**, korzystnie w stosunku molowym jak, odpowiednio, 1 : 2,5 : 1,25 : 25, oraz 0,1 M elektrolit podstawowy, korzystnie chloran(VII) tetrabutylamoniowy, (TBA)ClO₄.

Korzystnie, w sposobie tym stosuje się potencjał liniowo zmieniany cyklicznie w zakresie od 0 do 1,50 V, korzystnie w zakresie od 0,50 do 1,25 V, ze stałą szybkością zawierającą się w przedziale od 5 do 1000 mV/s, korzystnie 50 mV/s.

Wynalazek również obejmuje zastosowanie warstwy rozpoznającego polimeru według wynalazku, jako elementu rozpoznającego czujnika chemicznego do wykrywania i/lub selektywnego oznaczania oligonukleotydu TATAAA **1**, korzystnie w płynach ustrojowych pacjenta, z wykorzystaniem piezomikrogravimetrycznego przetwarzania sygnału chemicznego rozpoznawania TATAAA **1** na sygnał analityczny, lub do tego przetwarzania wykorzystujący tranzystory polowe z zewnętrzną bramką (ang. extended-gate field-effect transistors, EG-FETy).

Ponadto wynalazek ten ma zastosowanie w inżynierii genetycznej, zwłaszcza do testów genetycznych, przy wczesnym wykrywaniu dziedzicznych chorób genetycznych, jak również do testów przesiewowych u noworodków w kierunku fenylketonurii i wrodzonej niedoczynności tarczycy, lub do testów diagnostycznych i terapeutycznych w odniesieniu do chorób nowotworowych związanych ze zmutowanymi genami, albo do przyspieszania produkcji roślinnej poprzez mutagenезę sterowaną oligonukleotydami.



6

Schemat 4. Wzór strukturalny monomeru sieciującego, (2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofenu **6**.

Do wytworzenia MIPu wykorzystano związki przedstawione na Figurze 1a. Jest to 4-[2-(6-amino-9*H*-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan] **4** i nowo zaprojektowany i zsyntetyzowany na potrzeby niniejszego wynalazku 1-tyminooctan 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenylu **5**. Oba te związki posłużyły jako monomery funkcyjne przyłączające, za pomocą wiązań wodorowych typu par Watsona-Cricka, zasady nukleinowe oligonukleotydu TATAAA **1** (Fig. 1). Pary Watsona-Cricka tworzą się pomiędzy fragmentem tyminowym związku **5** i fragmentem adeninowym oligonukleotydu TATAAA **1** oraz pomiędzy fragmentem adeninowym monomeru funkcyjnego **4** i fragmentem tyminowym TATAAA **1**. Jako monomer sieciujący zastosowano 2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofen **6** w celu nadania strukturze polimeru odpowiedniej sztywności. Wszystkie zastosowane związki, tj. **4**, **5** i **6**, zawierają w swojej strukturze fragmenty tiofenowe zdolne do elektrochemicznej polimeryzacji. Te fragmenty pozwoliły na wytworzenie, w kontrolowany sposób, cienkich warstw polimeru z przyłączonym oligonukleotydem, MIP-TATAAA.

Zastosowane monomery funkcyjne i sieciujące umożliwiają przygotowanie kompleksu TATAAA **1** z odpowiednimi monomerami funkcyjnymi w roztworze do polimeryzacji, a następnie wytworzenie warstwy polimeru MIP-TATAAA. Struktura i skład kompleksu prepolimeryzacyjnego były modelowane za

pomocą obliczeń kwantowo-chemicznych. W dalszej kolejności przygotowanie roztworu do polimeryzacji elektrochemicznej wymagało rozpuszczenia wszystkich jego składników o różnej polarności w tym samym roztworze i zapewnienia warunków elektropolimeryzacji takich, aby wytworzone w jej trakcie kationorodniki tiofenu nie ulegały rekombinacji. Do tego celu przygotowano roztwór rozpuszczalników, acetonitrylu, wody, toluenu i izopropanolu, zmieszanych w stosunku objętościowym jak, odpowiednio, 7,5 : 1 : 1 : 0,5. Następnie przeprowadzono elektrochemiczną polimeryzację w warunkach potencjodynamicznych z zastosowaniem powyższego roztworu. Pozwoliło to na efektywne osadzenie warstw MIP-TATAAA lub polimeru niewdrukowanego (ang. non-imprinted polymer, NIPu) dobrze przylegających do przewodzącego podłoża. Warstwy te osadzono na powierzchni dwóch różnych przetworników sygnału chemicznego. Następnie z osadzonych warstw MIP-TATAAA usunięto szablon **1**. W ten sposób przygotowano elementy rozpoznające tych chemoczuJNIKÓW. W jednym z nich przetwornikiem był kwarcowy rezonator krystaliczny (ang. quartz crystal resonator, Au-QCR) o częstotliwości rezonansowej 10 MHz, z dyskową elektrodą złotą o średnicy 5 mm na podłożu tytanowym, elektrochemicznej mikrowagi kwarcowej (ang. electrochemical quartz crystal microbalance, EQCM). W pomiarach mikrograwimetrii piezoelektrycznej (ang. piezoelectric microgravimetry, PM) przeprowadzonych za pomocą tej mikrowagi, jako analityczny sygnał detekcji wykorzystuje się zmianę częstotliwości rezonansowej Au-QCR. Przetwornikiem drugiego chemoczuJNIKA był tranzystor połowy z zewnętrzną bramką (EG-FET). Sygnał detekcji oligonukleotydu TATAAA **1** w roztworze badanym związany jest z wypełnieniem a następnie opróżnieniem luk molekularnych MIPu przez cząsteczki analitu TATAAA **1**. W pierwszym chemoczuJNIKU jako sygnał detekcji służyła zmiana częstotliwości rezonansowej Au-QCR, proporcjonalna do zmian masy polimeru. W drugim natomiast jako sygnał detekcji wykorzystano zmianę prądu źródło-dren przy stałym napięciu bramki EG-FETA. Zmiana ta była wywołana przez sorpcję analitu TATAAA **1** w warstwie MIP-TATAAA osadzonej na tej bramce.

Opracowane i wykonane chemosensory wykazują wysoką selektywność oznaczania TATAAA **1** względem związków przeszkadzających, takich jak oligonukleotydy z zamienionym przynajmniej jednym nukleotydem. Przykładowo, czułość oznaczania TATAAA **1** jest znacznie wyższa niż oligonukleotydu TATAGA.

Wynalazek jest bliżej przedstawiony poniżej, w korzystnych przykładach wykonania, z odniesieniem do załączonego rysunku, na którym

Fig. 1 przedstawia (a) proponowany wzór strukturalny kompleksu **1** z monomerami funkcyjnymi **4** i **5** oraz (b) model szkieletowy zoptymalizowanego za pomocą teorii funkcjonału gęstości (ang. density functional theory, DFT) na poziomie B3LYP/3-21G(*) fragmentu TA sekwencji TATAAA skompleksowanego dwoma monomerami funkcyjnymi, **4** i **5**,

Fig. 2 przedstawia krzywe potencjałowej zależności (a) prądu jak również zmian (b) częstotliwości rezonansowej i (c) rezystancji dynamicznej równocześnie zarejestrowanych w trakcie osadzania warstwy MIP-TATAAA, za pomocą elektropolimeryzacji w warunkach potencjodynamicznych, na elektrodzie złotej na podłożu tytanowym rezonatora kwarcowego o podstawowej częstotliwości rezonansowej 10 MHz, przy czym polimeryzacja ta prowadzona była w 0,04 mM **1**, 0,1 mM **4**, 0,05 mM **5**, 1 mM **6**, w 0,1 M (TBA)ClO₄, w roztworze rozpuszczalników, acetonitrylu, wody, toluenu i izopropanolu, zmieszanych w stosunku objętościowym jak, odpowiednio, 7,5 : 1 : 1 : 0,5, w zakresie potencjałów od 0,50 do 1,25 V vs Ag|AgCl, przy szybkości zmian potencjału 50 mV/s,

Fig. 3 przedstawia wysokiej rozdzielczości widma rentgenowskiej spektroskopii fotoelektronowej (ang. X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) w zakresie energii wiązania elektronu P 2p dla warstwy MIP-TATAAA osadzonej na płytce szklanej z napyłonym złotem na podłożu tytanowym (a) przed (krzywa **1**) i po (krzywa **2**) ekstrakcji oligonukleotydu TATAAA **1** za pomocą 0,1 M NaOH przez 3 godz. w temperaturze 25°C; dla porównania, (b) przedstawia widmo XPS (krzywa **3**) dla warstwy TATAAA **1** przygotowanej przez nakroplenie na taką płytkę a następnie odparowanie roztworu 40 μM TATAAA w mieszaninie rozpuszczalników, acetonitrylu, wody, toluenu i izopropanolu, przy czym warunki osadzania podane są w opisie do Fig. 2,

Fig. 4 przedstawia dwuwymiarowe zdjęcie mikroskopii sił atomowych (ang. atomic force microscopy, AFMu) warstwy polimeru MIP-TATAAA osadzonej na płytce szklanej z napyłonym złotem na podłożu tytanowym w warunkach osadzania podanych w opisie do Fig. 2, przy czym pole widzenia obejmowało (0,5 x 0,5) μm²,

Fig. 5 przedstawia zmiany prądu źródło-dren w czasie po kolejnych dodatkach próbek wodnych roztworów oligonukleotydu TATAAA o różnych objętościach, zarejestrowane za pomocą czujnika EG-FET z bramką pokrytą (1) warstwą MIP-TATAAA z następnie wyekstrahowanym oligonukleotydem TATAAA **1**

lub (2) warstwą NIPu, przy czym napięcie źródło-dren i bramki wynosiło, odpowiednio, 1,7 i 1,50 V a zmiany te rejestrowano w warunkach stacjonarnych,

Fig. 6 przedstawia krzywe kalibracyjne oznaczania oligonukleotydu TATAAA 1 skonstruowane z wykorzystaniem pomiarów wykonanych za pomocą czujnika EG-FET z bramką pokrytą (1) warstwą MIP-TATAAA z następnie wyekstrahowanym oligonukleotydem TATAAA 1 oraz (2) warstwą NIPu, przy czym parametry pomiaru były identyczne jak te podane w opisie do Fig. 5,

Fig. 7 przedstawia krzywe kalibracyjne oznaczania (1) oligonukleotydu TATAAA 1 i (2) oligonukleotydu TATAGA skonstruowane z wykorzystaniem pomiarów wykonanych za pomocą czujnika EG-FET z bramką pokrytą warstwą MIP-TATAAA z następnie wyekstrahowanym oligonukleotydem TATAAA 1 i (3) warstwą NIPu, przy czym parametry pomiaru były identyczne jak te przedstawione w opisie do Fig. 5,

Fig. 8 przedstawia zmianę częstotliwości rezonansowej w czasie dla zastrzykiwanych próbek roztworów o objętości 250 μ l i o różnych stężeniach oligonukleotydu TATAAA, przy czym zmiana ta była mierzona w warunkach analizy przepływo-wstrzykowej (ang. flow-injection analysis, FIA) dla warstwy MIP-TATAAA z wyekstrahowanym oligonukleotydem TATAAA pokrywającej elektrodę złotą rezonatora kwarcowego o podstawowej częstotliwości rezonansowej 10 MHz a 0,1 M bufor fosforanowy (pH = 7,5), pompowany z szybkością 35 μ L/min, służył jako roztwór nośny,

Fig. 9 przedstawia krzywą kalibracyjną oznaczania oligonukleotydu TATAAA skonstruowaną za pomocą czujnika piezomikrograwimetrycznego z Au-QCR pokrytym warstwą MIP-TATAAA z następnie wyekstrahowanym oligonukleotydem TATAAA 1, przy czym parametry pomiaru były identyczne jak te przedstawione w opisie do Fig. 8.

Korzystne przykłady wykonania wynalazku

Wykonanie wynalazku jest zilustrowane za pomocą przedstawionych poniżej sześciu korzystnych przykładów.

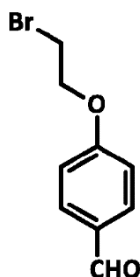
Przykład 1

Wytwarzanie monomeru funkcyjnego 4, tj. 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu]

Metoda trójetapowej syntezy monomeru funkcyjnego (4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu]) 4 została opracowana w ramach niniejszych badań, na ich potrzeby, w następujący sposób, z tym, że związek z Etapu 1 jest znany i można go również nabyć w handlu.

Etap 1. Synteza 4-(2-bromoetoksy)benzaldehydu (Schemat 5)

4-Hydroksybenzaldehyd (1,30 g, 10,64 mmoli) i 1,2-dibromoetan (8,00 g, 42,58 mmoli) rozpuszczono w acetonie (100 mL). Następnie dodano K_2CO_3 (8,80 g, 63,67 mmoli) i mieszano przez 16 godz. w temperaturze 70°C. Po odparowaniu rozpuszczalnika, surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym. Jako eluent zastosowano roztwór heksanu i chloroformu w stosunku objętościowym jak 4 : 1. Otrzymano 1,20 g czystego produktu (wydajność 32%). 1H NMR ($CDCl_3$) δ 9,70 (s, 1H), 7,65 (d, 2H), 6,83 (d, 2H), 4,20 (t, 2H), 3,50 (t, 2H).

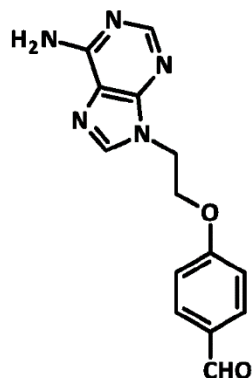


Schemat 5. Wzór strukturalny 4-(2-bromoetoksy)benzaldehydu.

Etap 2. Synteza 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]benzaldehydu (Schemat 6)

Adeninę (300 mg, 2,22 mmoli) i K_2CO_3 (3,00 g, 21,7 mmoli) dodano do DMF (100 mL) i mieszano przez 1 godz. w temperaturze 130°C. Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodano 4-(2-bromoetoksy)benzaldehyd (500 mg, 2,2 mmole) i mieszano przez 40 godz. w temperaturze 130°C. Po odparowaniu rozpuszczalnika, surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym. Jako eluent zastosowano roztwór chloroformu i metanolu w stosunku objętościowym jak 4 : 1. Otrzymano 350 mg czystego produktu (wydajność 44%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8,18 (s, 1H), 8,10 (s, 1H), 9,75 (s, 1H), 7,70 (d, 2H), 6,95 (d, 2H), 4,30 (t, 2H), 3,88 (t, 2H).

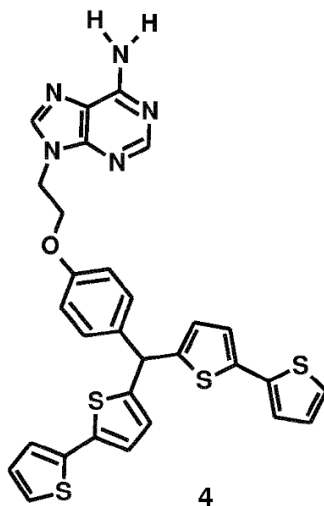


Schemat 6. Wzór strukturalny 4-[2-(6-amino-9H-purin-9-yl)etoksy]benzaldehydu.

Etap 3. Synteza 4-[2-(6-amino-9H-purin-9-yl)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-yl)metanu] (Schemat 7)

Przygotowano zawiesinę 2,2'-bitiofenu (220 mg, 1,32 mmola) i 4-[2-(6-amino-9H-purin-9-yl)etoksy]benzaldehydu (100 mg, 371,33 μmola) w glikolu etylenowym (50 mL). Do zawiesiny tej dodano 70% kwas chlorowy(VII) (8,2 mL), po czym mieszano ją przez 16 godz. w temperaturze 60°C. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, do mieszaniny reakcyjnej dodano nadmiar dichlorometanu. Następnie mieszaninę przemyto nasyconym roztworem Na_2CO_3 , po czym wodą. Wreszcie wysuszono ją siarczanem sodu i odparowano do sucha. Surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie wypełnionej żelazem krzemionkowym. Jako eluent zastosowano dichlorometan. Otrzymano 20 mg czystego produktu (wydajność 6%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 8,17 (s, 1H), 8,02 (s, 1H), 7,22 (d, 2H), 7,15 (d, 2H), 7,06 (dd, 2H), 6,97 (dd, 2H), 6,94 (d, 2H), 6,78 (d, 2H), 6,70 (d, 2H), 5,76 (s, 1H), 4,78 (t, 2H), 4,42 (t, 2H). ESI-MS, M. cz. obliczona dla $\text{C}_{30}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{S}_4$: 597,80, wyznaczona: 598,08.



Schemat 7. Wzór strukturalny 4-[2-(6-amino-9H-purin-9-yl)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-yl)metanu] 4.

Przykład 2

Otrzymywanie monomeru funkcyjnego 5, 1-tyminooctanu 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenylu

Dwuetałowa synteza monomeru funkcyjnego, 1-tyminooctanu 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenylu **5** została opracowana w ramach niniejszych badań, na ich potrzeby, w sposób następujący.

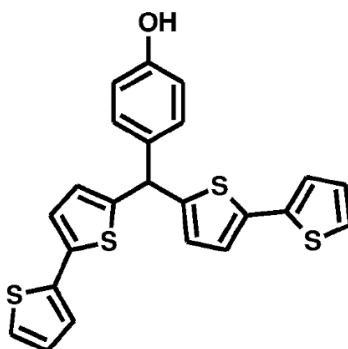
Etap 1. Synteza 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenolu (Schemat 8)

Przygotowano zawiesinę 2,2'-bitiofenu (4,00 g, 24,06 mmoli) i 4-hydroksybenzaldehydu (1,47 g, 12,07 mmoli) w glikolu etylenowym (200 mL). Do zawiesiny tej dodano 60% kwas chlorowy(VII) (25 mL)

i mieszano ją przez 24 godz. w temperaturze 60°C. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodano do niej eter dietylowy (50 mL) i otrzymany roztwór przemyto dwa razy wodą (po 100 mL), a następnie solanką (50 mL). Po wysuszeniu siarczanem magnezu, rozpuszczalnik odparowano pod obniżonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono za pomocą chromatografii cieczowej na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym. Jako eluent zastosowano roztwór heksanu i octanu etylu o stosunku objętościowym zmienianym w kolejności jak 9:1 → 8:1 → 7:1 → 6:1. Otrzymano 2,00 g jasnofioletowego produktu (wydajność 38%) o t.t. 71°C z rozkładem.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7,26-7,20 (m, 1H), 7,16 (dd, $J = 5,1, 1,0$ Hz, 1H), 7,08 (dd, $J = 3,6, 1,0$ Hz, 1H), 7,00 (d, $J = 3,6$ Hz, 1H), 6,96 (dd, $J = 5,1, 3,6$ Hz, 1H), 6,83-6,77 (m, 1H), 6,74 (dd, $J = 3,6, 0,8$ Hz, 1H), 5,70 (s, 1H), 4,86 (s, 1H), 1,61 (s, 1H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 154,9, 146,8, 137,6, 137,0, 135,5, 129,8, 127,9, 126,8, 124,3, 123,6, 123,3, 115,6, 47,2.



Schemat 8. Wzór strukturalny 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenolu.

Etap 2. Synteza 1-tyminooctanu 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenylu 5 (Schemat 3)

4-(Di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenol (610,1 mg, 1,4 mmoli) i kwas 1-tyminooctowy (352,4 mg, 1,93 nmoli) rozpuszczono w dichlorometanie (14 mL). Do otrzymanego roztworu dodano roztwór N,N'-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) w dichlorometanie (2,8 mL, 1,0 M), po czym mieszaninę reakcyjną mieszano przez 18 godz. Następnie dichlorometan odparowano. Ze stałej pozostałości przygotowano zawiesinę w metanolu (30 mL), po czym gotowano ją pod chłodnicą zwrotną przez 1 godz. Wytrącony osad odsączono na gorąco a następnie przemyto metanolem. Otrzymano 724,4 mg białego produktu o t.t. 191°C z rozkładem (wydajność 86%).

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11,45 (s, 1H), 7,70-7,34 (m, 5H), 7,34-6,96 (m, 8H), 6,87 (s, 2H), 6,11 (s, 1H), 4,77 (s, 2H), 1,78 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 167,1, 164,2, 151,0, 149,0, 145,8, 141,4, 140,8, 136,3, 136,0, 129,3, 128,2, 127,2, 125,3, 123,9, 123,5, 121,7, 108,8, 48,6, 45,7, 11,9.

Przykład 3

Obliczenia kwantowo-chemiczne dla kompleksu TATAAA 1 z monomerami funkcyjnymi 4 i 5

Strukturę kompleksu oligonukleotydu TATAAA 1 z monomerami funkcyjnymi 4 i 5 o różnych stosunkach molowych zoptymalizowano (Fig. 1b) a wartości funkcji termodynamicznych jego tworzenia obliczono za pomocą teorii funkcjonału gęstości (ang. density functional theory, DFT) w przybliżeniu B3LYP/3-21g* przy zastosowaniu oprogramowania Gaussian 09 {M. J. Frisch, et al., Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA 2009}. Przeprowadzone obliczenia wskazały, że kompleks o stosunku molowym oligonukleotydu TATAAA: 4 : 5 jak, odpowiednio, 1 : 2,5 : 1,25, jest trwały. Zmiana całkowitej swobodnej entalpii tworzenia kompleksu fragmentu TA sekwencji TATAAA z dwoma monomerami funkcyjnymi, tj. 4 i 5, wynosi, $\Delta G = -256,64$ kJ mol $^{-1}$.

Przykład 4

Osadzanie warstw MIP-TATAAA na różnych elektrodach badanych

Warstwy MIP-TATAAA wytworzono za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej w warunkach potencjodynamicznych w zakresie potencjałów od 0,50 do 1,25 V vs Ag|AgCl przy szybkości zmian potencjału 50 mV/s. Do polimeryzacji zastosowano roztwór mieszaniny rozpuszczalników, acetonitrylu, wody, toluenu i izopropanolu, o stosunku objętościowym jak, odpowiednio, 7,5 : 1 : 1 : 0,5, zawierający oligonukleotyd TATAAA 1, 1-tyminooctan 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometylo)fenolu 5, 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-yl)etoksy]fenylu-4-[bis(2,2-bitien-5-yl)metan] 4 o stosunku molowym jak, odpowiednio, 1 : 2,5 : 1,25. Stosunek ten przyjęto na podstawie przeprowadzonych obliczeń kwantowo-chemicznych opisanych

w Przykładzie 3, powyżej. Stężenie oligonukleotydu TATAAA **1** w roztworze mieszaniny rozpuszczalników, acetonitrylu, wody, toluenu i izopropanolu, o stosunku objętościowym jak, odpowiednio, 7,5 : 1 : 1 : 0,5, wynosiło 0,04 mM. Aby wdrukowane w polimerze luki molekularne były trwałe, do roztworu do polimeryzacji dodano monomer sieciujący **6** o stosunku molowym oligonukleotydu TATAAA **1** do monomeru sieciującego jak 1 : 25. Przewodność roztworu do polimeryzacji zapewnił elektrolit podstawowy, 0,1 M chloran(VII) tetrabutylamonowy, (TBA)ClO₄. W tak przygotowanym roztworze umieszczono odpowiednią elektrodę badaną, na której osadzono warstwę polimeru MIP-TATAAA kontrolując jej grubość za pomocą liczby cykli zmian potencjału. Warstwę MIP-TATAAA osadzono na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm, na elektrodzie złotej Au-QCR, o podstawowej częstotliwości rezonansowej 10 MHz, lub na płytce szklanej z naporowaną warstwą złota na podkładzie tytanowym. Przygotowane w celach porównawczych warstwy polimeru niewdrukowanego, NIPu, osadzono z roztworu do elektropolimeryzacji nie zawierającego szablonu oligonukleotydu TATAAA stosując taką samą procedurę jak procedura zastosowana do osadzania warstw MIP-TATAAA.

W celu osadzenia warstwy MIP-TATAAA na elektrodzie złotej Au-QCR zastosowano elektropolimeryzację w warunkach potencjodynamicznych za pomocą sześciu cykli zmian potencjału w zakresie od 0,50 do 1,25 V vs Ag|AgCl przy szybkości zmian potencjału 50 mV/s (Fig. 2). W trakcie osadzania, na krzywej zależności prądu od potencjału widoczny był prąd anodowy związany z utlenianiem monomerów przy potencjale powyżej 0,90 V i pik anodowy przy potencjale 1,0 V (Fig. 2a). W kolejnych cyklach zmian potencjału natężenie prądu w zakresie od 0,90 do 1,10 V spadło w związku z osadzeniem warstwy polimeru o coraz wyższej oporności. Na krzywych zależności prądu od potencjału nie zaobserwowano prądów katodowych, które odpowiadałyby redukcji powstającego polimeru. Oligonukleotyd TATAAA **1** jest elektrochemicznie nieaktywny w zastosowanym zakresie potencjałów.

Rejestrowane równocześnie ze zmianami prądu zmiany częstotliwości rezonansowej Au-QCR (Fig. 2b) wskazały, że utlenianiu monomerów towarzyszył spadek częstotliwości rezonansowej. Ten spadek wywołany był wzrostem masy Au-QCR w wyniku osadzania na nim polimeru. Częstotliwość malała w każdym cyklu po osiągnięciu potencjału prądu pikowego. Spadek częstotliwości w kolejnych cyklach towarzyszył spadkowi prądu utleniania. Wskazuje to na wzrost oporności warstwy polimeru wraz ze wzrostem jej grubości.

W celu przeprowadzenia pomiarów elektrochemicznych, warstwę MIP-TATAAA osadzono również na platynowej elektrodzie dyskowej o średnicy 1 mm. Natomiast w celu scharakteryzowania warstwy i przygotowania chemoczuJNIKA EG-FET, warstwę tę osadzono na płytce szklanej z warstwą złota na podkładzie tytanowym. W tych badaniach zastosowano taką samą procedurę osadzania MIP-TATAAA jak opisana powyżej procedura osadzania warstwy na elektrodzie złotej Au-QCR.

Zarówno na Au-QCR, na elektrodzie platynowej jak i na złożonych płytkach szklanych, w wyniku polimeryzacji powstawała brązowa warstwa polimeru o dobrej przyczepności do podłoża. Tak naniezione warstwy przemyto acetonitrylem w celu usunięcia z nich śladów elektrolitu podstawowego i niepolimeryzowanych monomerów.

Ekstrakcja szablonu, oligonukleotydu TATAAA, z warstw MIP-TATAAA

W celu opróżnienia luk molekularnych wdrukowanych w polimerze, z osadzonych warstw MIP-TATAAA wyekstrahowano szablon oligonukleotydu **1** za pomocą 0,1 M NaOH w ciągu 3 godz. w temperaturze 25°C. Do ekstrakcji zastosowano roztwór o tej właśnie kwasowości z uwagi na dysocjację podwójnych łańcuchów DNA na pojedyncze w roztworach silnie alkalicznych. Postęp ekstrakcji szablonu monitorowano za pomocą XPS w zakresie energii wiązania elektronów atomu fosforu. W tym zakresie, dla warstwy przed ekstrakcją w widmie XPS występowały dwa piki o energii wiązania 133,6 i 134,5 eV (odpowiednio, krzywa 1a i 1b, Fig. 3a) odpowiadające elektronom, odpowiednio, P 2p_{3/2} i P 2p_{1/2} atomu fosforu {A. Jaramillo et al., *Analyst* **1999**, 124, 1215}. Potwierdzają one obecność TATAAA **1** w warstwie MIP-TATAAA, jako że w badanym układzie tylko TATAAA **1** zawiera fosfor. Pików fosforu nie było w widmie XPS po ekstrakcji **1** (krzywa 2, Fig. 3a), co potwierdza całkowite usunięcie oligonukleotydu **1** z warstwy polimeru. Uzyskane wyniki wskazują na skuteczność usuwania szablonu oligonukleotydu **1** z polimeru i umożliwiają oszacowanie czasu niezbędnego do całkowitego usunięcia **1** z MIPu.

Morfologia warstwy MIP-TATAAA

W celu określenia grubości i szorstkości, warstwę MIP-TATAAA osadzono na złożonych płytkach szklanych za pomocą procedury opisanej w Przykładzie 4, powyżej. Warstwę tę osadzono w warunkach potencjodynamicznych za pomocą sześciu cykli zmian potencjału a następnie szablon **1** wyekstrahowano.

wano według procedury opisanej w Przykładzie 4, powyżej. Następnie zarejestrowano zdjęcia mikroskopii sił atomowych AFM powierzchni warstw polimerów i na ich podstawie określono ich grubość i szorstkość. Dwuwymiarowe zdjęcie obszaru warstwy MIP-TATAAA o powierzchni $(0,5 \times 0,5) \mu\text{m}^2$ (Fig. 4) pokazuje, że warstwa zbudowana jest z nieregularnych agregatów o wielkości sięgającej kilkadziesiąt nanometrów. Osadzona warstwa MIP-TATAAA ma grubość 230 nm a jej szorstkość, wyrażona za pomocą parametru R_a , wynosi 2,6 nm.

Przykład 5

Oznaczenie oligonukleotydu TATAAA 1 za pomocą czujnika chemicznego w postaci tranzystora polowego z zewnętrzną bramką (EG-FET) pokrytą warstwą MIP-TATAAA rozpoznającą oligonukleotyd TATAAA 1

W celu przygotowania czujnika EG-FET do oznaczania oligonukleotydu TATAAA 1 w roztworze badanym, warstwę MIP-TATAAA osadzono na płycie szklanej pokrytej warstwą złota na podłożu tytanowym stosując procedurę opisaną w Przykładzie 4, powyżej. Powierzchnia i grubość osadzonej warstwy wynosiła, odpowiednio, $\sim 0,7 \text{ cm}^2$ i $\sim 230 \text{ nm}$. Z tak osadzonej warstwy wyekstrahowano szablony oligonukleotydu TATAAA 1 według procedury opisanej w Przykładzie 4, powyżej. Następnie płytkę z tą warstwą podłączono do bramki komercyjnego tranzystora polowego tak, aby tworzyła tzw. zewnętrzną bramkę (extended gate) {C.-P. Chen et al., *Anal. Chem.* **2011**, 83, 1938}. Płytkę tę umieszczono w naczynku elektrochemicznym, w którym umieszczano również elektrodę odniesienia w postaci drutu platynowego. Do naczynka wiano wodę dejonizowaną. Elektrodę odniesienia podłączono do dwukanałowego źródła wymuszająco-pomiarowego. Natomiast źródło i dren tranzystora polowego oraz zewnętrzną bramkę podłączono do drugiego kanału tego źródła. Następnie w tak przygotowanym układzie pomiarowym zarejestrowano charakterystyki tranzystora, tj. zależności prądu źródło-dren (I_{sd}) od napięcia źródło-dren (U_{sd}) w zakresie od 0 do 5,0 V przy zadanym napięciu bramki, $U_g = 1,50 \text{ V}$.

Po każdym dodaniu roztworu oligonukleotydu TATAAA 1 zarejestrowano krzywą I_{sd} vs U_{sd} i zmierzono wzrost granicznego prądu źródło-dren $i_{sd,lim}$. Wzrost ten wywołany był zwiększaniem liczby nośników ładunku w obszarze bramkowym tranzystora wskutek zmiany ładunku warstwy polimeru MIP-TATAAA wywołanej selektywną sorpcją oligonukleotydu TATAAA 1 w tej warstwie. Na podstawie tych pomiarów skonstruowano krzywą zależności prądu granicznego, $i_{sd,lim}$, od czasu przy $U_{sd} = 1,70 \text{ V}$ i $U_g = 1,50 \text{ V}$ (Fig. 6). Zgodnie z oczekiwaniem, po dodaniu każdej kolejnej porcji roztworu oligonukleotydu TATAAA 1, $i_{sd,lim}$ wzrastał w miarę jak oligonukleotyd TATAAA wiązany był w warstwie MIP-TATAAA. Dla porównania, pomiary takie przeprowadzono z zastosowaniem płytki szklanej z napylnym złotem na podłożu tytanowym pokrytej warstwą NIPu (krzywa 2, Fig. 6). Dla tego polimeru, $i_{sd,lim}$ malał proporcjonalnie do stężenia oligonukleotydu TATAAA w roztworze. Poza tym bezwzględne zmiany $i_{sd,lim}$ były znacznie mniejsze niż w przypadku zastosowania zewnętrznej bramki pokrytej polimerem MIP-TATAAA. Liniowy zakres stężeniowy rozciągał się przynajmniej od 0,10 do 7,5 μM (Fig. 7). Wyznaczona czułość tego chemoczuownika wynosiła $3,57 \times 10^{-4} \text{ nA } \mu\text{M}^{-1}$ ze współczynnikiem korelacji 0,92 a jego wykrywalność, przy stosunku sygnału do szumu, $S/N = 3$, wynosiła 330 nM TATAAA 1. Ponadto z nachylenia krzywych kalibracyjnych wyznaczono wartość pozornego współczynnika wdrukowania oligonukleotydu TATAAA 1 mierzonego stosunkiem czułości chemoczuownika z warstwą MIP-TATAAA do czułości czujnika z warstwą NIPu. Współczynnik ten był bardzo wysoki, wynosił bowiem 33.

W celu wyznaczenia selektywności chemoczuownika EG-FET przeprowadzono serię pomiarów z zastosowaniem pokrytej złotem na podłożu tytanowym szklanej płytki z osadzoną warstwą MIP-TATAAA, po wyekstrahowaniu szablonu, oligonukleotydu TATAAA. W pomiarach tych do roztworu badanego dodawano porcjami wodny roztwór oligonukleotydu TATAGA 2 jako substancji przeszkadzającej. Krzywą kalibracyjną skonstruowaną na podstawie tych pomiarów przedstawia Fig. 7. Po dodaniu kolejnej porcji roztworu TATAGA, $i_{sd,lim}$ nieznacznie spadała. Jest to efekt przeciwny do obserwowanego w przypadku oligonukleotydu TATAAA. Wskazuje on na niewielkie zmniejszenie liczby nośników ładunku w obszarze bramkowym tranzystora w wyniku tylko nieznacznej sorpcji oligonukleotydu TATAGA w warstwie polimeru MIP-TATAAA.

Wyznaczone parametry analityczne przemawiają za tym, że wytworzony czujnik chemiczny EG-FET nadaje się do oznaczania oligonukleotydu TATAAA w układach biologicznych.

Przykład 6

Oznaczenie oligonukleotydu TATAAA 1 w warunkach FIA za pomocą chemoczuownika PM z warstwą rozpoznającą MIP-TATAAA

Do oznaczania oligonukleotydu TATAAA **1** w warunkach FIA za pomocą chemosensora PM zastosowano przetwornik Au-QCR z elektrodą pokrytą warstwą MIP-TATAAA o grubości ~230 nm, zgodnie z procedurą opisaną w Przykładzie 4, powyżej. Objętość każdej próbki zastrzykiwanego roztworu wynosiła 250 μL . Zastrzykiwane substancje rozpuszczono w roztworze o takim samym składzie jak roztwór nośny, tj. w 0,1 M buforze fosforanowym (pH = 7,0). Szybkość przepływu roztworu nośnego wynosiła 35 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Wyniki pomiarów pokazane są na Fig. 8. Dla dostatecznie sztywnych warstw MIP-TATAAA zmiana częstotliwości rezonansowej, Δf , jest przeciwna do zmian masy, Δm , zgodnie z zależnością Sauerbrey'a, Równanie 1 [D. A. Buttry et al., *Chem. Rev.* **1992**, 92,1355].

$$\Delta f = - \frac{2 f_0^2 \Delta m}{A_{ac} (\mu_q \rho_q)^{1/2}} \quad (1)$$

W równaniu tym f_0 oznacza podstawową częstotliwość rezonansową rezonatora kwarcowego. Dla zastosowanych w naszych badaniach rezonatorów Au-QCR, $f_0 = 10$ MHz. Akustycznie czynna powierzchnia stosowanych rezonatorów Au-QCR, A_{ac} , wynosiła 0,1963 cm^2 . Pozostałe wielkości w Równaniu 1 to μ_q - moduł ścinający monokryształu kwarcu o cięciu AT ($2,95 \times 10^{11} \text{ g s}^{-2} \text{ cm}^{-1}$) i ρ_q - gęstość kwarcu ($2,65 \text{ g cm}^{-3}$). Zmiany lepkości i gęstości warstw MIP-TATAAA w trakcie pomiaru można zaniedbać [A. Pietrzyk et al., *Anal. Chem.* **2009**, 81, 10061].

Zarejestrowane krzywe zmian $R \Delta f$ w czasie dla Au-QCR pokrytego warstwą MIP-TATAAA (krzywa 1, Fig. 8) i NIPu (krzywa 2, Fig. 8) wykazywały spadek częstotliwości rezonansowej po zastrzyknięciu kolejnej porcji roztworu oligonukleotydu **1**. Za ten spadek odpowiedzialny był wzrost masy polimeru wynikający z wnikania **1** do opróżnionych luk molekularnych MIP-TATAAA. Ponieważ pomiar prowadzony był w warunkach FIA, nadmiar roztworu nośnego następnie wypłukiwał oligonukleotyd **1** z warstwy prowadząc do wzrostu częstotliwości Au-QCR do poziomu sygnału tła (tj. do całkowitego spadku jego masy). Pomiaru te wskazują na odwracalne wiązanie analitu w warstwie MIP-TATAAA. Wysokość pików zmian częstotliwości była zależna do stężenia TATAAA w roztworze badanym przynajmniej w zakresie od 2 do 25 μM (Fig. 9). Wykrywalność i czułość chemoczuJNIKA PM z warstwą MIP-TATAAA, wyznaczona dla $S/N = 3$, wynosiła, odpowiednio, 18 nM TATAAA **1** i 5,09 $\text{Hz cm}^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ ze współczynnikiem korelacji 0,98.

Tak więc wykrywalność chemoczuJNIKA PM jest wyższa niż chemoczuJNIKA EG-FET, niemniej oba czujniki nadają się do oznaczania oligonukleotydu **1** w układach biologicznych.

Wnioski

Obliczenia kwantowo-chemiczne wykazały możliwość tworzenia kompleksu oligonukleotydu TATAAA zarówno z każdym z monomerów funkcyjnych z osobna, jak też z obydwoma monomerami równocześnie. Wyniki obliczeń dają wgląd w strukturę i stechiometrię tworzonego kompleksu pre-polimeryzacyjnego.

Zsyntetyzowano nową pochodną bis(2,2'-bitien-5-ylo)metanu zawierającą fragment tyminowy, zdolną do wdrukowania molekularnego nie tylko oligonukleotydu TATAAA ale i innych oligonukleotydów zawierających fragment adeninowy.

Elektropolimeryzacja potencjodynamiczna w zakresie dodatnich potencjałów jest przydatna do wytwarzania warstw polimerów tiofenowych molekularnie wdrukowanych za pomocą oligonukleotydu TATAAA. Opracowana procedura polimeryzacji pozwala na szybkie przygotowanie warstw MIPów o znacznej grubości (200 do 300 nm) trwale przylegających do przewodzącego podłoża zarówno o znacznej (Au-QCR) jak i nieznacznej szorstkości (szkło/Au, elektrody platynowe). Procedura ta także umożliwia dogodną kontrolę grubości i porowatości otrzymanych warstw za pomocą liczby cykli zmian potencjału oraz doboru odpowiednich składników porogenicznych roztworu do elektropolimeryzacji (np. rodzaju elektrolitu podstawowego).

Opracowana i wykorzystana metoda osadzania warstw polimeru molekularnie wdrukowanego oligonukleotydem TATAAA umożliwia łatwą ich integrację z przetwornikami sygnału chemicznego, takimi jak chemoczułe tranzystory połowę z zewnętrzną bramką (EG-FETy) i przetworniki piezomikrograwimetryczne.

Z pomiarów piezomikrograwimetrycznych w warunkach analizy przepływowo-wstrzykowej wynika, że wiązanie oligonukleotydu TATAAA w lukach molekularnych polimeru MIP-TATAAA jest odwracalne. Świadczy o tym pojawianie się pików na krzywej zmian częstotliwości rezonansowej Au-QCR

pokrytego warstwą MIP-TATAAA w funkcji czasu po zastrzyknięciu kolejnych porcji roztworu oligonukleotydu TATAAA. Oznacza to, że chemoczuJNIk ten może być urządzeniem wielokrotnego użycia. Ponadto pomiary za pomocą chemoczuJNIka EG-FET w obecności substancji przeszkadzających, takich jak oligonukleotydy TATAGA, wykazują, że oznaczanie TATAAA jest wysoce selektywne.

Spośród dwóch zbudowanych w ramach wynalazku chemoczuJNIków, chemoczuJNIk PM wykazał wyższą wykrywalność oligonukleotydu TATAAA. Wynosiła ona 18 nM TATAAA 1. Wykrywalność chemosensora EG-FET również była wysoka i wynosiła 330 nM TATAAA 1. Wykrywalności obu chemoczuJNIków są wystarczające do oznaczania oligonukleotydu TATAAA 1 w układach biologicznych. Dodatkowo czuJNIki te pracują w środowisku wodnym, co ułatwia ich zastosowanie do oznaczeń nukleotydów w płynach ustrojowych.

Podziękowania

Niniejsza praca była sfinansowana ze środków Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (grant POMOST/2012-6/10 dla A.P.-L), w ramach projektu „Kwantowe nanostruktury półprzewodnikowe do zastosowań w biologii i medycynie - Rozwój i komercjalizacja nowej generacji urządzeń diagnostyki molekularnej opartych o nowe polskie przyrządy półprzewodnikowe” (POIG.01.01.02-00-008/08 dla W.K.) oraz ze środków US National Science Foundation (Grant No. 1110942 dla F.D.).

Opłaty związane z ochroną wynalazku sfinansowano ze środków projektu Nanotechnology, Biomaterials and alternative Energy Source for ERA integration FP7- REGPOT-CT-2011-285949-NO-BLESSE.

Zastrzeżenia patentowe

1. Związek 1-tyminooctan 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometrylo)fenylu o Wzorzec 5.
2. Sposób wytwarzania 1-tyminooctanu 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometrylo)fenylu, **znamienny tym**, że obejmuje następujące etapy.
 - a) wyjściowy roztwór 2,2'-bisbitiofenu w glikolu etylenowym poddaje się reakcji z 4-karboksybenzaldehydem i kwasem chlorowym(VII) z wytworzeniem p-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoesanu glikolu, a następnie
 - b) ten p-bis(2,2'-bitien-5-ylo)metylobenzoesan glikolu poddaje się reakcji z eterem dietylowym i otrzymuje się 4-[di-2,2'-bitien-5-ylometrylo)fenol, po czym
 - c) mieszaninę 4-(di-2,2'-bitien-5-ylo)metylofenolu i kwasu 1-tyminooctowego w rozpuszczalniku organicznym, korzystnie dichlorometanie, poddaje się reakcji z N,N'-dicykloheksylokarbodiimidem (DCC), w wyniku czego otrzymuje się 1-tyminooctan 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometrylo)fenylu.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że Etap 1 tego sposobu prowadzi się z zastosowaniem glikolu etylenowego, w atmosferze gazu obojętnego, w temperaturze w zakresie od 50 do 70°C, korzystnie w 60°C, przez 22 do 26 godzin, korzystnie 24 godz., przy stosunku reagentów względem 4-karboksybenzaldehydu w zakresie od 2 do 4, korzystnie 3, dla 2,2'-bisbitiofenu i od 20 do 60, korzystnie 45, dla kwasu chlorowego(VII).
4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że Etap 2 tego sposobu prowadzi się w atmosferze gazu obojętnego, w temperaturze w zakresie od 20 do 35°C, korzystnie w temperaturze 25°C, a następnie dodaje się eter dietylowy, korzystnie, o objętości dwa razy większej niż objętość kwasu chlorowego(VII).
5. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że Etap 3 tego sposobu prowadzi się w atmosferze gazu obojętnego, w temperaturze w zakresie od 20 do 30°C, korzystnie w 25°C, przez 15 do 21 godz., korzystnie 18 godz., przy stosunku reagentów względem kwasu 1-tyminooctowego w zakresie od 0,5 do 3, korzystnie 1,73, dla 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometrylo)fenolu i od 0,5 do 3, korzystnie 1,64 dla N,N'-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC).
6. Warstwa rozpoznającego polimeru, wytworzona metodą wdrukowywania molekularnego, **znamienna tym**, że stanowi ją polimer zawierający jako monomery funkcyjne 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenyl-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan] oraz 1-tyminooctan 4-(di-2,2'-bitien-5-ylometrylo)fenylu oraz jako monomer sieciujący (2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofen).

7. Sposób wytwarzania warstwy rozpoznającego polimeru, metodą molekularnego wdrukowania, za pomocą polimeryzacji elektrochemicznej w warunkach potencjodynamicznych, **znamienny tym**, że jako monomery do elektropolimeryzacji stosuje się monomer funkcyjny, 4-[2-(6-amino-N,N'-puryn-9-ylo)-etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan], i monomer funkcyjny, 1-tyminoocetan 4-(di-2,2'-bitien-5-ylo)metan]fenylo oraz monomer sieciujący, (2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofen).
8. Sposób według zastrz. 7, **znamienny tym**, że jako szablon/analit stosuje się aminę biogeniczną lub oligonukleotyd, korzystnie oligonukleotyd TATAAA.
9. Sposób według zastrz. 7 albo 8, **znamienny tym**, że do polimeryzacji stosuje się roztwór zmieszanych rozpuszczalników, korzystnie acetonitrylu, wody, toluenu i izopropanolu o stosunku objętościowym jak, odpowiednio, 7,5 : 1 : 1 : 0,5, zawierający oligonukleotyd TATAAA, 4-[2-(6-amino-9H-puryn-9-ylo)etoksy]fenylo-4-[bis(2,2'-bitien-5-ylo)metan], 1-tyminoocetan 4-(di-2,2'-bitien-5-ylo)metan]fenylo, (2,4,5,2',4',5'-heksa(tiofen-2-ylo)-3,3'-bitiofen, korzystnie w stosunku molowym jak, odpowiednio, 1 : 2,5 : 1,25 : 25, oraz 0,1 M elektrolit podstawowy, korzystnie chloran(VII) tetrabutylamoniowy, (TBA) ClO₄.
10. Sposób według zastrz. 7, **znamienny tym**, że stosuje się potencjał liniowo zmieniany cyklicznie w zakresie od 0 do 1,50 V, korzystnie w zakresie od 0,50 do 1,25 V, ze stałą szybkością w przedziale od 5 do 1000 mV/s, korzystnie 50 mV/s.
11. Zastosowanie warstwy rozpoznającego polimeru określonego w zastrz. 6, jako elementu rozpoznającego czujnika chemicznego do wykrywania i/lub selektywnego oznaczania oligonukleotydu TATAAA, korzystnie w płynach ustrojowych pacjenta, z wykorzystaniem piezomikrogravimetrycznego przetwarzania sygnału chemicznego rozpoznawania TATAAA na sygnał analityczny, lub do tego przetwarzania wykorzystujący tranzystory połówę z zewnętrzną bramką (ang. extended-gate field-effect transistors, EG-FETy).
12. Zastosowanie według zastrz. 11, w inżynierii genetycznej, zwłaszcza do testów genetycznych, przy wczesnym wykrywaniu dziedzicznych chorób genetycznych, jak również do testów przesiewowych u noworodków w kierunku fenylketonurii i wrodzonej niedoczynności tarczycy, lub do testów diagnostycznych i terapeutycznych w odniesieniu do chorób nowotworowych związanych ze zmutowanymi genami, albo do przyspieszania produkcji roślinnej poprzez mutagenę sterowaną oligonukleotydami.

Rysunki

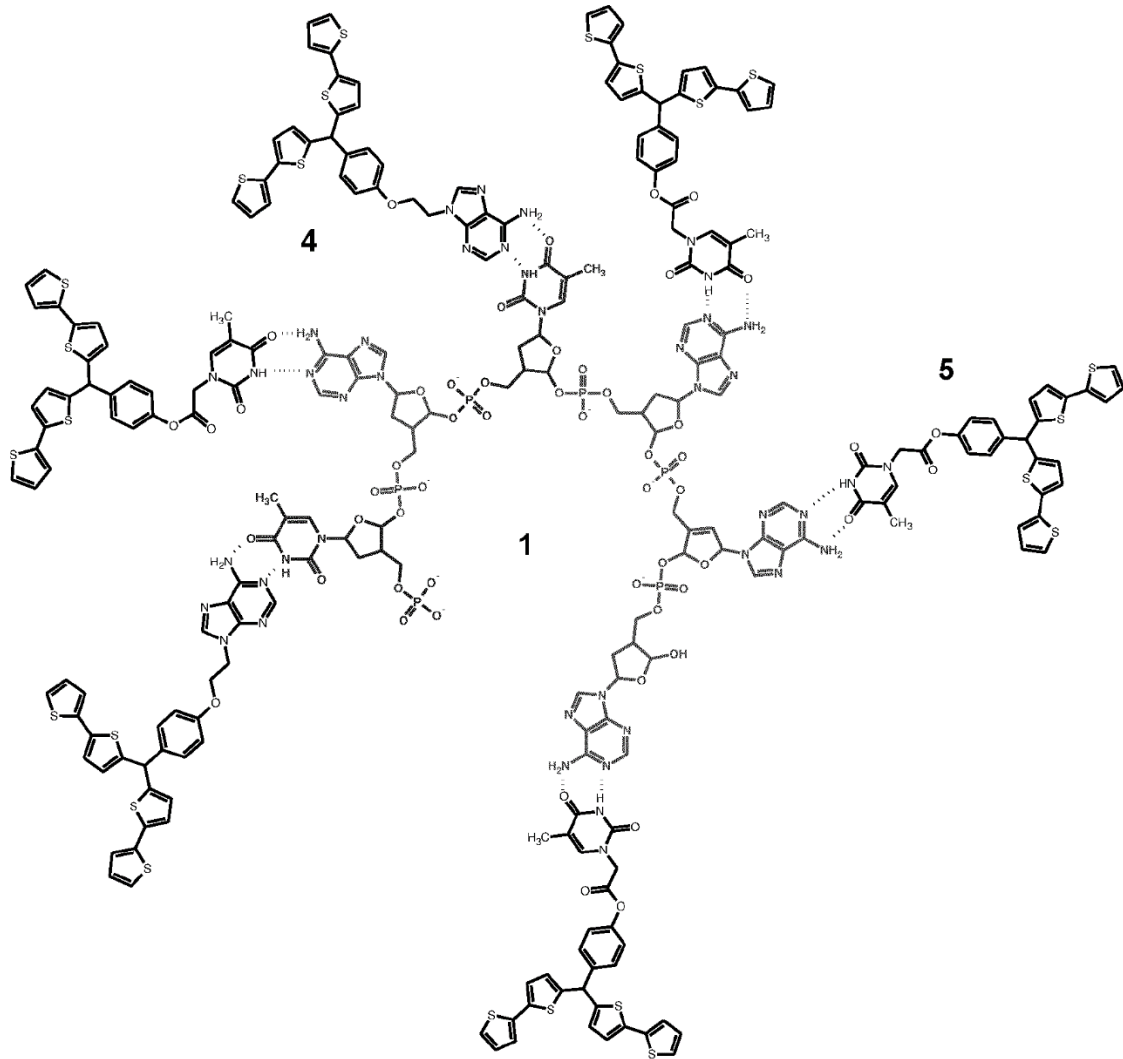


Fig. 1a

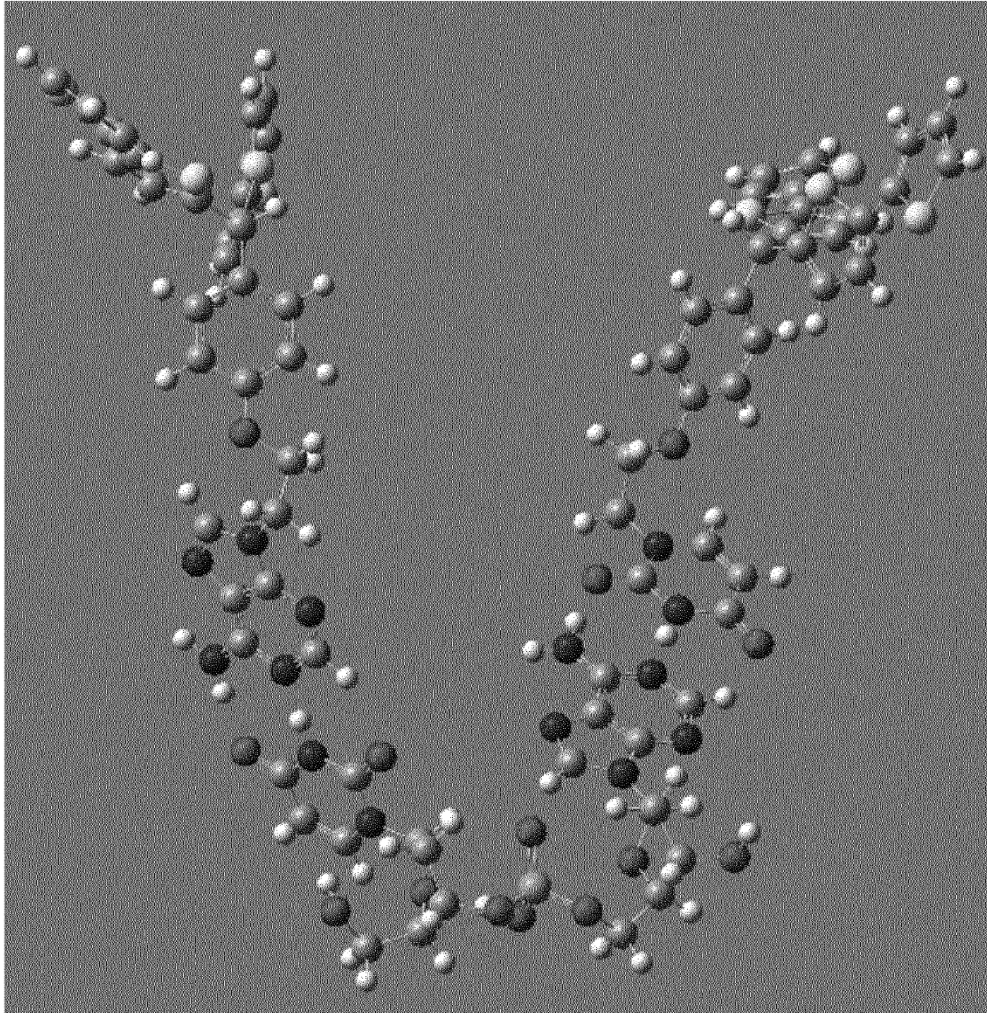


Fig. 1b

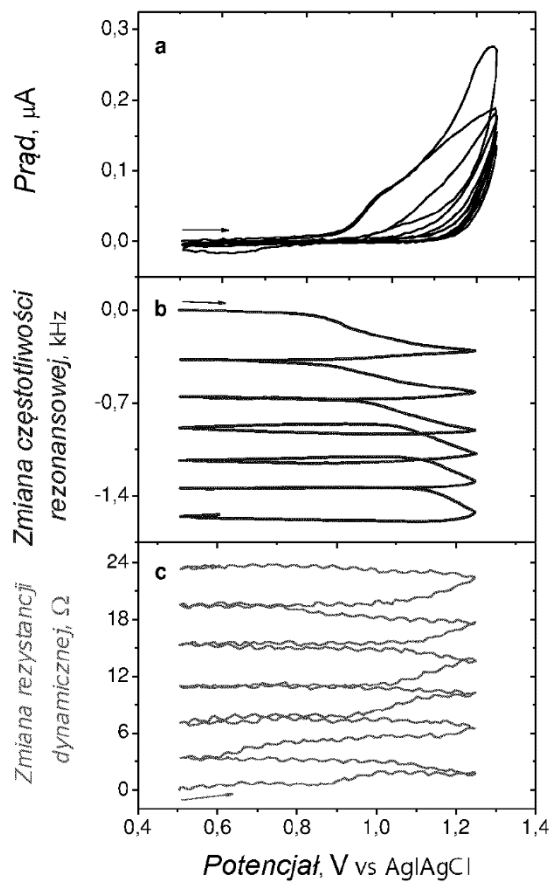


Fig. 2

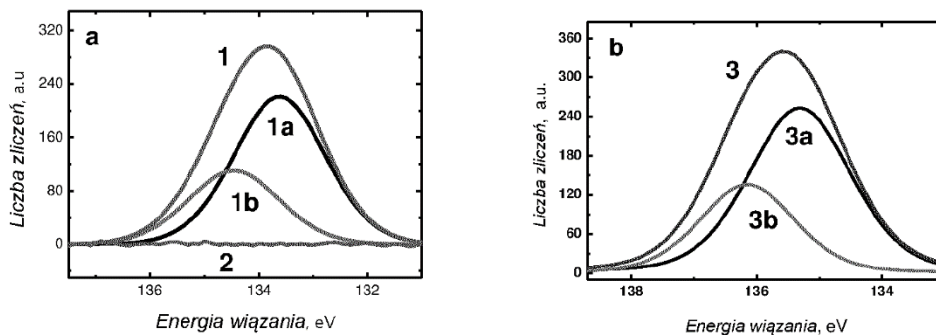


Fig. 3

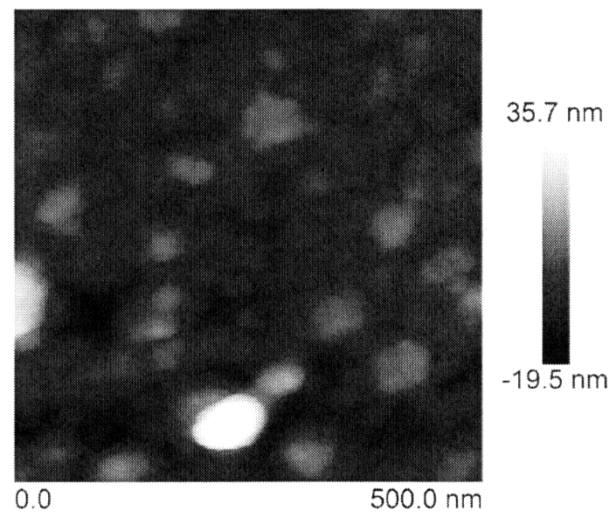


Fig. 4

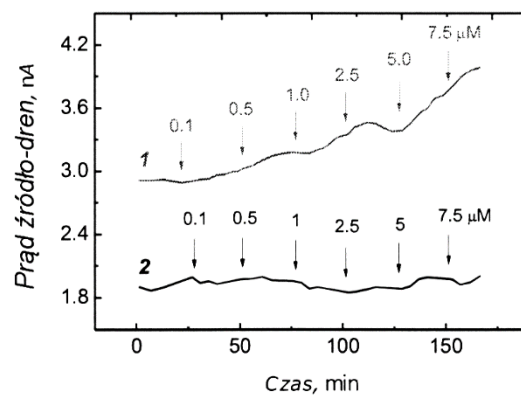


Fig. 5

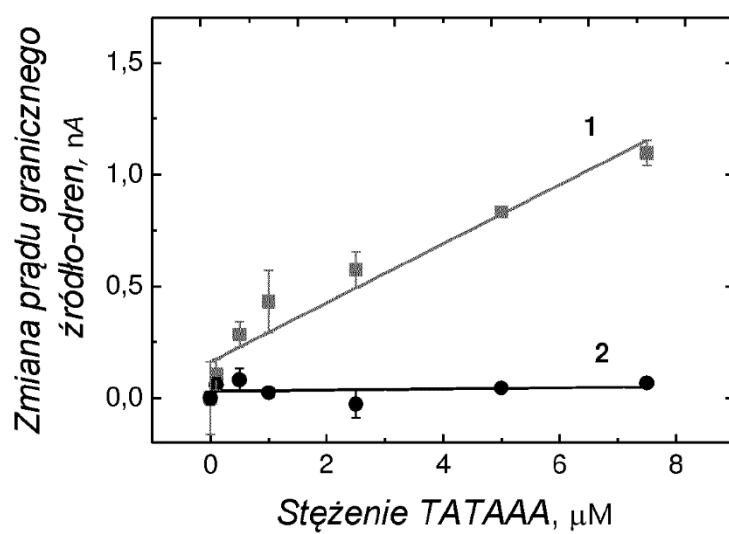


Fig. 6

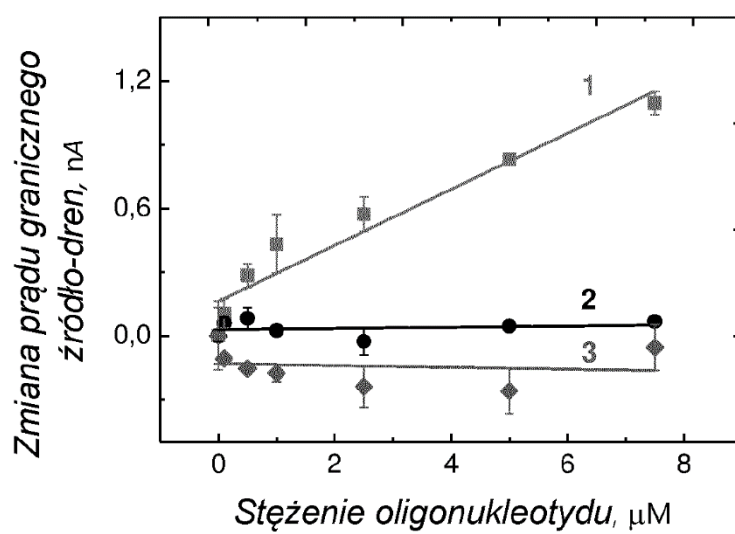


Fig. 7

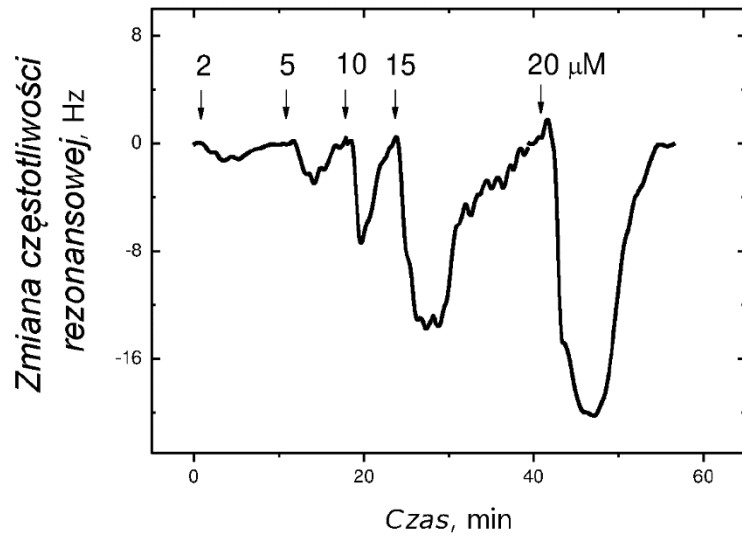


Fig. 8

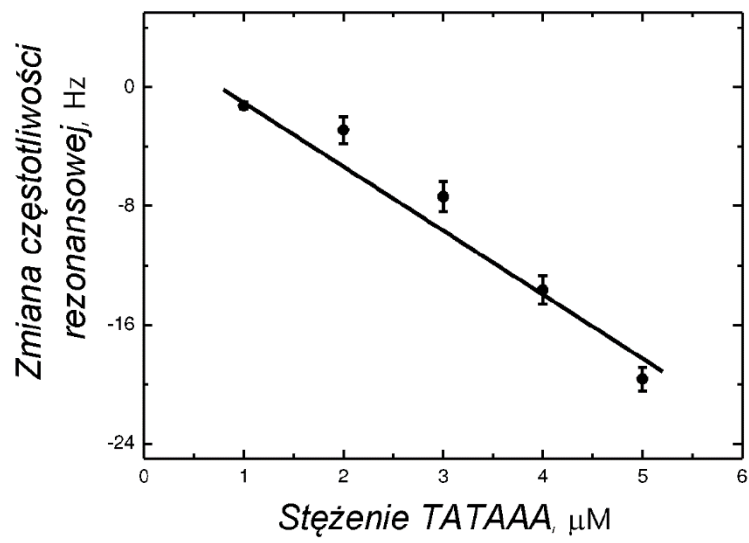


Fig. 9