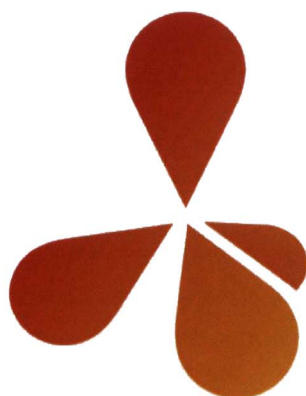


INSTYTUT CHEMII ORGANICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK



**Funkcjonalizacje witaminy B₁₂ w pozycji R₅
i ich wykorzystanie w syntezie biokoniugatów**

mgr Agnieszka Jackowska

*Monotematyczny cykl publikacji z komentarzem przedstawiony
Radzie Naukowej Instytutu Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk
w celu uzyskania stopnia doktora*

Promotor: prof. dr hab. Dorota Gryko

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej, PAN

Org.-B.430/21



80000000343509

WARSZAWA 2021

<https://rcin.org.pl>



A-21-6
K-c-127
K-c-130
K-d-134
K-f-137

B Org.
430/21

INSTITUT CHEMII ORGANICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK



3. org 430/21

**Chciałabym w tym miejscu podziękować wszystkim osobom,
które przyczyniły się do powstania niniejszej pracy, za okazaną pomoc i wsparcie podczas
tej niejednokrotnie trudnej wędrówki:**

Prof. Dorocie Gryko, za szansę rozwoju, wiarę we mnie i okazane wsparcie,
również te w słodkiej postaci. Dziękuję za przekazanie cennej wiedzy i nieocenioną pomoc
w badaniach naukowych.

Lolo, za wprowadzenie do chemii witaminy B₁₂, wskazówki, niezastąpioną pomoc naukową
i to, że zawsze mogłam na Ciebie liczyć. Dziękuję za wspólne chwile w 102,
wyjazdy oraz za przyjaźń na całe życie.

Dżoanie i Orłowi, za przyjaźń na całe życie, rozmowy na każdy temat,
wspólne spotkania i wsparcie w trudnych chwilach.

Oli W. i KRJ za wspólnie spędzony czas na ploteczkach o wszystkim i o niczym.

Maksowi, za alternatywną edukację, wspaniałą energię i zarażanie dobrym humorem.

Mikołajowi, za wdrożenie w tematykę witaminy B₁₂ i okazaną pomoc w chemii.

Maćkowi, za współpracę w projektach.

**Oli P., Sabinie, Kitti, Martynie CC, Sidrze, Joao, Krzysiowi G.,
Łukaszowi, Misiowi, Krzyškowi D., Rashidowi**
oraz wszystkim niewymienionym, obecnym i byłym członkom **Zespołu XV** za obecność każdego
z Was, wspaniałą atmosferę w pracy i wyjazdy integracyjne.

Laseczkom XV, za wspólne spotkania przy dobrym jedzonku i lampce wina.

Zespołowi IX, za przyjazną atmosferę i spędzony razem czas.

Madzi, Kini, Konradowi, Grześkowi i Kubie, za bycie najlepszym Rodzeństwem.

Julkowi, za każdy uśmiech, zabawy i możliwość sprawdzenia się w roli 'Cioci A'.

Babci M., za wszystkie modlitwy w mojej intencji.

Rodzicom, za wiarę we mnie, wsparcie i za to, że zawsze przy mnie jesteście.

Kamilowi, za wsparcie w sprawach małych i dużych, otuchę w gorsze dni i radość, którą mi dajesz.
Dziękuję za bycie najlepszym Przyjacielem i Narzeczonym – lepszego nie mogłam
sobie wymarzyć. Za to, że Cię mam!

Niniejszą pracę dedykuję **Babci i Dziadkowi**,
którzy zawsze we mnie wierzyli i mi kibicowali.

Praca doktorska wykonana w ramach projektu:



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Witamina B₁₂ jako transporter przeciwbakteryjnych modyfikowanych oligonukleotydów

realizowanego w ramach grantu **SYMFONIA**

Narodowego Centrum Nauki

Numer grantu: 2014/12/W/ST5/00589

Spis treści

1. Spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	6
2. Spis publikacji niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej	7
3. Spis wystąpień konferencyjnych	8
4. Wykaz stosowanych skrótów	9
5. Przewodnik po rozprawie doktorskiej	11
5.1 Założenia i cel pracy	11
5.2 Wstęp literaturowy	14
5.3 Badania własne	29
5.3.1 <i>Synteza pochodnej B₁₂-5'NH₂ (2) i jej koniugatów</i>	<i>30</i>
5.3.2 <i>Synteza połączeń typu B₁₂-2'OMeRNA</i>	<i>33</i>
5.3.3 <i>Fotolabilne koniugaty witaminy B₁₂</i>	<i>36</i>
5.3.4 <i>Synteza pochodnej kobinamidu (85) z zachowaną grupą fosforanową</i>	<i>42</i>
5.4 Podsumowanie	44
5.5 Literatura	47
6. Streszczenie w języku polskim	50
7. Streszczenie w języku angielskim/Abstract in English	51
8. Publikacje oryginalne	52
9. Oświadczenia autorów publikacji	245

1. Spis publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1. **Agnieszka Jackowska**, Mikołaj Chromiński, Maciej Giedyk, Dorota Gryko

Org. Biomol. Chem. **2018**, *16*, 936–943

5'-Vitamin B₁₂ derivatives suitable for bioconjugation via the amide bond

2. Maciej Giedyk, **Agnieszka Jackowska**, Marcin Równicki, Monika Kolanowska, Joanna Trylska, Dorota Gryko

Chem. Commun. **2019**, *55*, 763–766

Vitamin B₁₂ transports modified RNA into E. coli and S. Typhimurium cells

Praca wyróżniona okładką.



3. Sidra Hassan, **Agnieszka Jackowska**, Dorota Gryko

J. Porphyrins Phthalocyanines **2019**, *23*, 554–560

Truncated vitamin B₁₂ derivative with the phosphate group retained

4. **Agnieszka Jackowska**, Dorota Gryko

Org. Lett. **2021**, DOI: 10.1021/acs.orglett.1c00839

Vitamin B₁₂ Derivatives Suitably Tailored for the Synthesis of Photolabile Conjugates

Praca wyróżniona okładką.



2. Spis publikacji niewchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1. Keith ó Proinsias, **Agnieszka Jackowska**, Katarzyna Radzewicz, Maciej Giedyk, Dorota Gryko
Org. Lett. **2018**, *20*, 296–299

Vitamin B₁₂ Catalyzed Atom Transfer Radical Addition

3. Spis wystąpień konferencyjnych

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy zostały zaprezentowane na konferencjach:

1. XIV Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików – ChemSession'17, Warszawa, 2017
5'-Amine as a new tool in the vitamin B₁₂ bioconjugation
– **prezentacja posterowa**
2. 15th International Congress of Young Chemists – YoungChem2017, Lublin, 2017
The amine at 5'-position provides a site for a bioconjugation of vitamin B₁₂
– **prezentacja ustna**
3. XI Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Organicznej – XI OSCO, Warszawa, 2018
Witamina B₁₂ jako transporter modyfikowanych oligonukleotydów do komórek bakterii
– **prezentacja posterowa**
4. XV Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików – ChemSession'18, Warszawa, 2018
Witamina B₁₂ jako transporter modyfikowanych oligonukleotydów do komórek bakterii
– **prezentacja posterowa**
5. 10th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines – ICPP-10, Monachium, Niemcy, 2018
Vitamin B₁₂ as a transporter of modified RNAs into gram-negative bacteria
– **prezentacja ustna oraz prezentacja posterowa**
6. 16th International Congress of Young Chemists – YoungChem2018, Bydgoszcz, 2018
Vitamin B₁₂ as a transporter of modified RNAs into gram-negative bacteria
– **prezentacja ustna**
7. International Symposium on Synthesis and Catalysis – ISySyCat2019, Évora, Portugalia, 2019
Vitamin B₁₂: transporter of modified RNAs into bacteria and light-responsive tool for the release of bioactive molecules
– **prezentacja ustna oraz prezentacja posterowa**

4. Wykaz stosowanych skrótów

2'OMeRNA – *O*-metylowane RNA

AA – kwas askorbinowy

ALP – fosfataza alkaliczna

ATTO 590 – barwnik fluorescencyjny posiadający maksimum absorpcji przy długości fali 590 nm

CDI – 1,1'-karbonylo-diimidazol

CDT – 1,1'-karbonylo-di-(1,2,4-triazol)

Chi – chitozan

CuAAC – katalizowana jonami miedzi(I) 1,3-dipolarna cykloadycja azydków do alkinów

DBTC – węglan di(benzotriazolo-1-ilu)

DIPEA – *N,N*-diizopropylodetyloamina

DMA – *N,N*-dimetyloacetamid

DMAP – 4-dimetyloaminopirydyna

DMBI – 5,6-dimetylobenzimidazol

DTPA – kwas pentetynowy

EDC – chlorowodorek *N*-(3-dimetyloaminopropyl)-*N'*-etylokarbodiimidu

EDTA – kwas wersenowy

EPO – erytropoetyna

ESI-MS HR – spektrometria mas z jonizacją poprzez elektrorozpylanie o wysokiej rozdzielczości

Ex-4 – eksendyna-4

G-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów

GLP-1 – glukagonopodobny peptyd-1

GSH – glutation

HBTU – heksafluorofosforan *O*-(benzotriazol-1-ylo)-*N,N,N',N'*-tetrametylouroniowy

HC – haptokoryna

HEK 293 – ludzkie embrionalne komórki nerkowe

HMPA – heksametylofosforoamid

HOBt – hydroksybenzotriazol

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa

HYP – 2-hydroksypirydyna

IBA – kwas 2-jodozylobenzoowy

IBX – kwas 2-jodoksybenzoowy

IF – czynnik wewnętrzny

IFN-CON – białko stosowane w leczeniu zapalenia wątroby typu C

K562 – ludzkie komórki białaczki szpikowej

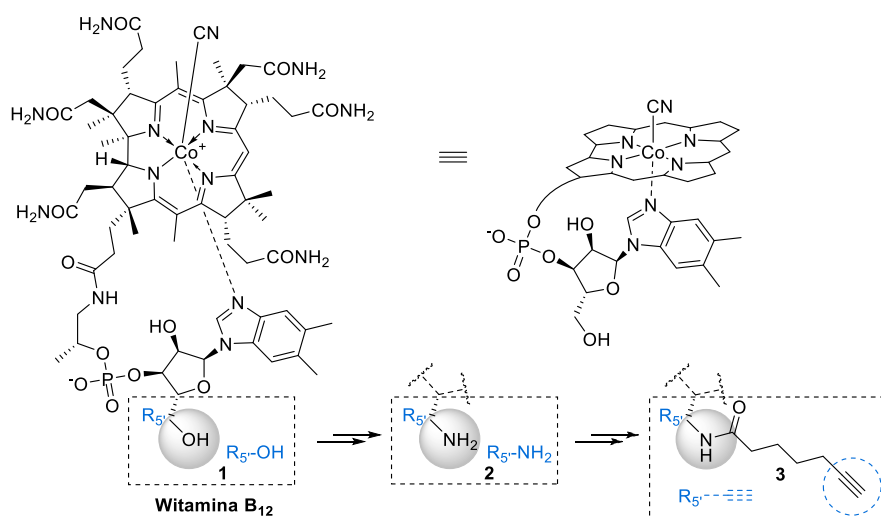
LC-MS – chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrem masowym

LED – dioda emitująca światło
mRNA – matrycowy RNA
MsCl – chlorek mesylu
NHS – *N*-hydroksysukcynoimid
NIR – promieniowanie w bliskiej podczerwieni
NMP – *N*-metylopirolidon
NMR – spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
PBS – buforowana fosforanem sól fizjologiczna
PEG – poli(tlenek etylenu)
PET – pozytonowa tomografia emisyjna
PIDA – (diacetoksy)jodobenzen
*p*NA – *para*-nitroanilid
PNA – peptydowy kwas nukleinowy
p-SCN-Bn-NOTA – 4-izotiocyjanianobenzyl-1,4,7-triazacyklononano-1,4,7-kwas trioctowy
PYY – peptyd tyrozyna tyrozyna
RFP – białko czerwonej fluorescencji
RNA – kwas rybonukleinowy
RP-HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych
SPAAC – wymuszona naprężeniem pierścienia 1,3-dipolarna cykloaddycja azydków do alkinów
(ang. *strain-promoted azide-alkyne cycladdition*)
SPDP – 3-(2-pirydyloditio)propionian *N*-sukcynoimidylu
TBTA – tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)metylo]amina
TC – transkobalamina
TSTU – tetrafluoroboran *N,N,N',N'*-tetrametylo-*O*-(*N*-sukcynoimidylu)uronowy
TTHA – kwas 3,6,9,12-tetrakis(karboksymetylo)-3,6,9,12-tetraazatetradekano-1,14-diowy
UV – promieniowanie ultrafioletowe

5. Przewodnik po rozprawie doktorskiej

5.1 Założenia i cel pracy

Projektowanie i synteza nowych środków terapeutycznych jest ciągłym wyzwaniem. Poszukiwane są leki przeciwnowotworowe o znikomym bądź zerowym działaniu niepożądanym, jak również leki na pojawiające się nowe choroby bakteryjne czy wirusowe. Światowa pandemia, spowodowana koronawirusem SARS-CoV-2 wywołującym chorobę COVID-19, pokazała nam jak wiele jest jeszcze do zrobienia. Jednak kluczową kwestią jest nie tylko tworzenie nowych środków terapeutycznych, ale również znalezienie sposobu ich dostarczenia do organizmu. Z uwagi na fakt, że transport substancji aktywnej do miejsca jej działania jest często problematyczny, poszukuje się nowych rozwiązań tego zagadnienia. Związki naturalne posiadające zdolność penetrowania komórek są atrakcyjnymi kandydatami do transportowania substancji biologicznie czynnych, np. potencjalnych leków, które w swej niezmodyfikowanej postaci nie mogą dostać się do wnętrza komórek. Ze względu na pełnione funkcje oraz występowanie, związkiem spełniającym powyższe kryteria jest witamina B₁₂ (kobalamina, **1**, Rysunek 1).^[1,2]



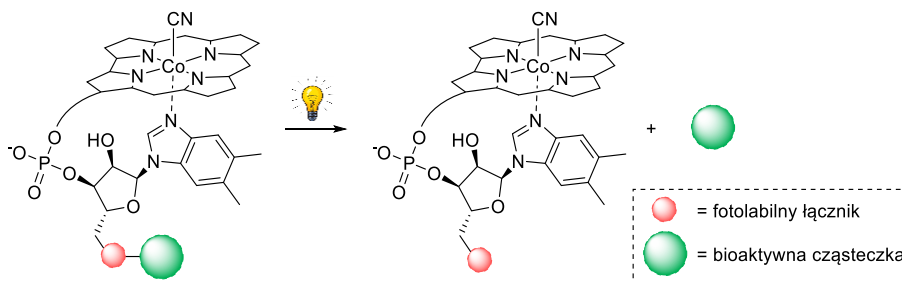
Rysunek 1. Struktura witaminy B₁₂ (**1**) oraz wybrane jej modyfikacje (zaznaczona pozycja R₅).

Wykorzystanie witaminy B₁₂ (**1**) jako nośnika wymaga odpowiedniej modyfikacji struktury tego związku, umożliwiającej selektywne przyłączenie bioaktywnej molekuly. Biorąc pod uwagę wysoki stopień złożoności budowy kobalaminy (**1**), zadanie to nie należy do łatwych. **Celem mojej pracy było opracowanie syntezy pochodnych witaminy B₁₂ (**1**), posiadających w pozycji R₅ grupy funkcyjne odpowiednie do syntezy koniugatów ze związkami o znaczeniu biologicznym** (Rysunek 1). Zaprojektowałam i otrzymałam pochodną **2** zawierającą w tej pozycji grupę -NH₂, która okazała się użyteczna w tworzeniu wiązań amidowych i pozwalała na bezpośrednie łączenie kobalaminy ze związkami zawierającymi ugrupowanie karboksylowe. Ponadto, związek ten był prekursorem w syntezie kolejnej pochodnej **3**, zawierającej terminalne wiązanie potrójne użyteczne w katalizowanej jonami miedzi(I) 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydów do alkinów

(ang. *copper-catalyzed azide-alkyne cycladdition*, CuAAC). Potencjał tej reakcji postanowiłam wykorzystać do **opracowania metodologii przyłączania modyfikowanych oligonukleotydów (2'OMeRNA), a następnie zbadania zdolności kobalaminy (1) do transportowania ich do komórek prokariotycznych.**

W leczeniu infekcji wywołanych zakażeniami bakteryjnymi stosuje się antybiotyki. Często jednak są one nadużywane lub podawane niewłaściwie, co prowadzi do pojawienia się wśród bakterii zjawiska oporności, powodującego obniżenie efektu terapeutycznego. Obiecującą alternatywą wydaje się być zastosowanie krótkich, modyfikowanych oligonukleotydów zaburzających ekspresję genów bakterii na poziomie translacji poprzez komplementarne łączenie się z bakteryjnym RNA. W rezultacie dochodzi do zablokowania produkcji kluczowych białek i hamowania wzrostu bakterii.^[3,4] Ograniczeniem tego rozwiązania jest fakt, że komórki prokariotyczne nie posiadają zdolności pobierania oligonukleotydów ze środowiska. **Wykazano jednak, że kobalamina transportuje syntetyczne, peptydowe analogi kwasów nukleinowych (ang. *peptide nucleic acid*, PNA),^[5,6] dlatego zastosowanie tej cząsteczki jako transportera modyfikowanego RNA wydaje się obiecującą strategią.**

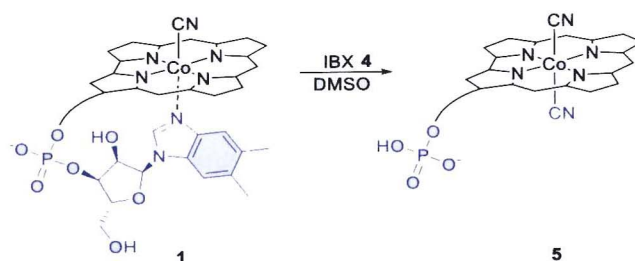
Interesującym aspektem dotyczącym transportu pożądaných terapeutyków w docelowe miejsce jest nie tylko ich dostarczanie, ale także uwalnianie w pożądanym miejscu. Osiągnięcie tego celu wiązało się z koniecznością wprowadzenia do struktury witaminy B₁₂ (1) ugrupowania, które pod wpływem czynnika zewnętrznego ulegałoby rozłączeniu, co w konsekwencji prowadziłoby do uwolnienia bioaktywnej molekuly w docelowym miejscu. Uznałam, że światło jest doskonałym sposobem aktywacji, ponieważ oferuje wysoką selektywność przeprowadzanych procesów. Jest na ogół nieinwazyjne (przy odpowiednim doborze długości fali), ortogonalne w stosunku do większości elementów żyjących systemów oraz nie powoduje zanieczyszczenia próbki.^[7] Co więcej, długość fali i jej natężenie mogą być precyzyjnie regulowane, poprzez dobór fotolabilnego łącznika o odpowiednich właściwościach fotofizycznych. Te wyjątkowe cechy światła doprowadziły m.in. do zastosowania go w badaniu fluorescencyjnie znakowanych małych cząsteczek^[8] i białek^[9] w komórkach. Dlatego też kolejnym, szczegółowym celem mojej pracy doktorskiej było **opracowanie syntezy pochodnej witaminy B₁₂ z fotolabilną grupą przyłączoną w pozycji R₅' (Schemat 1).**



Schemat 1. Proces uwolnienia bioaktywnej cząsteczki pod wpływem światła.

Projekt ten, w szczególności, obejmował syntezę fotolabilnego łącznika, jego wprowadzenie do cząsteczki kobalaminy (1), syntezę biokoniugatów oraz badanie procesu uwalniania związków o znaczeniu biologicznym pod wpływem światła.

Niektóre bakterie, w przeciwieństwie do ssaków, posiadają zdolność rozpoznawania tzw. niepełnych korynoidów (ang. *incomplete corrinoids*).^[10,11] Fakt ten był warty rozważenia w kontekście tworzenia narzędzi pozwalających na selektywne dostarczanie związków do komórek bakterii w obecności komórek eukariotycznych. W mojej pracy doktorskiej postanowiłam wykorzystać proces fosforolizy, prowadzący do rozszczepienia tylko jednego wiązania fosfodiesterowego, w celu syntezy skróconego (niepełnego) analogu kobalaminy 5 z zachowanym ugrupowaniem fosforanowym (Schemat 2). Pochodna 5 może być z sukcesem wykorzystana do syntezy pochodnych witaminy B₁₂ zmodyfikowanych w obrębie pętli nukleotydu w reakcji alkilowania grupy fosforanowej odpowiednimi halogenkami organicznymi.

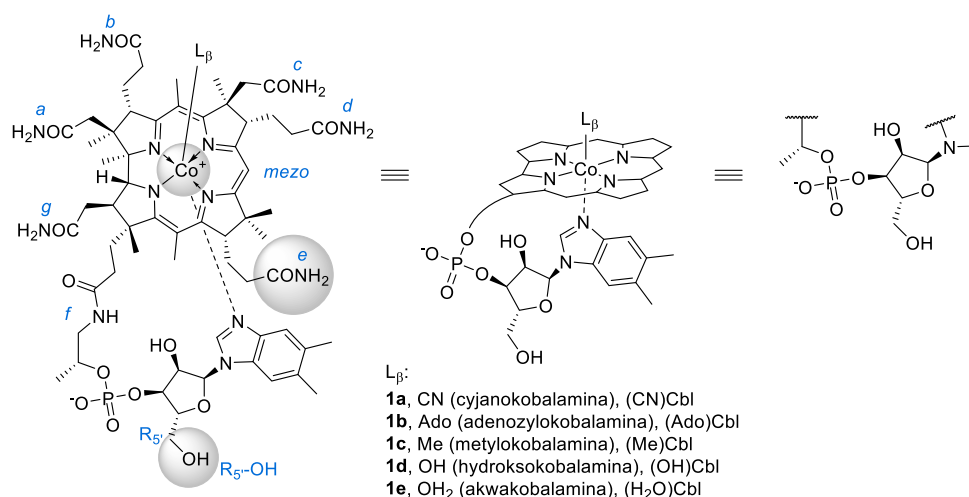


Schemat 2. Proces fosforolizy prowadzący do otrzymania pochodnej 5 z zachowaną grupą fosforanową.



5.2 Wstęp literaturowy

Witamina B₁₂ (kobalamina, **1**, Rysunek 2) należy do witamin grupy B i podobnie jak pozostałe, rozpuszcza się w wodzie (Rysunek 2). Jest ona niezbędna do prawidłowego funkcjonowania ssaków, jak również niektórych bakterii.^[12] Odgrywa kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego, pokarmowego oraz krwionośnego, biorąc udział, na przykład, w tworzeniu czerwonych krwinek. Z kolei adenozylokobalamina (**1b**) oraz metylokobalamina (**1c**), pełnią funkcję kofaktorów w reakcjach enzymatycznych zachodzących w komórkach.^[13] Procesy te związane są z syntezą nukleotydów i metabolizmem aminokwasów.^[14]



Rysunek 2. Struktura witaminy B₁₂ (**1**) z zaznaczonymi miejscami koniugacji (jon kobaltu, pozycje *e* oraz R₅), których modyfikacja nie wpływa negatywnie na rozpoznanie kobalaminy przez białka transportujące.

Kobalamina (**1**) jest związkiem o złożonej budowie. Otrzymuje się ją na drodze biologicznej syntezy wykorzystującej wyselekcjonowane i genetycznie zmodyfikowane mikroorganizmy – bakterie i archeobakterie jako jedyne posiadają odpowiedni system enzymatyczny katalizujący reakcje prowadzące do jej wytworzenia. Następnie jest ona izolowana metodami biotechnologicznymi. Biosynteza witaminy B₁₂ (**1**) może być przeprowadzona zarówno w warunkach tlenowych, jak i beztlenowych. Bakterie *Pseudomonas denitrificans* biorą udział w syntezie zachodzącej w warunkach beztlenowych, natomiast w obecności tlenu wykorzystywane są drobnoustroje *Bacillus megaterium*, *Salmonella Typhimurium* oraz *Propionibacterium shermanii*.^[15] Z tych ostatnich otrzymuje się kobalaminę (**1**) na skalę przemysłową, ponieważ wydajność tej biosyntezy jest najwyższa. Natomiast, jedyna opracowana dotąd synteza totalna witaminy B₁₂ (**1**) to proces składający się z ponad 70 etapów, nad którym zespoły Woodwarda^[16] i Eschenmosera^[17] pracowały przez około 10 lat. Dlatego też, wszystkie pochodne witaminy B₁₂ otrzymywane są poprzez modyfikacje naturalnej kobalaminy (**1**) lub w procesach biotechnologicznych opartych na genetycznie modyfikowanych bakteriach.

Z chemicznego punktu widzenia, witamina B₁₂ (**1**) jest wysoce sfunkcjonalizowanym związkiem tetrapirolowym zawierającym siedem grup amidowych: trzy acetamidowe (*a*, *c*, *g*) oraz

cztery propionamidowe (*b*, *d*, *e*, *f*) (Rysunek 2). Wszystkie grupy amidowe, oprócz tej znajdującej się w pozycji *f*, są grupami pierwszorzędowymi. W centrum pierścienia makrocyklicznego usytuowany jest jon kobaltu na trzecim stopniu utlenienia, który koordynowany jest przez atomy azotu obecne w czterech pierścieniach pirolowych oraz dwa ligandy aksjalne α i β . Ligand β różni się w zależności od formy kobalaminy (**1a-e**), natomiast ligandem α jest grupa 5,6-dimetylobenzimidazolowa (DMBI). DMBI będący częścią nukleotydu połączony jest z rybozą wiązaniem *N*-glikozydowym, z kolei aldopentoza łączy się z grupą fosforanową. Ta ostatnia związana jest z podstawnikiem propionamidowym obecnym w pozycji *f*, co zamyka tzw. pętlę nukleotydową kobalaminy (**1**). Ponadto, dla cząsteczki witaminy B₁₂ (**1**) ustala się równowaga, uzależniona od wartości pH, pomiędzy formą, w której jon kobaltu jest koordynowany przez atom azotu pochodzący od DMBI (forma *base-ON*), a kobalaminą (**1**), w której ten proces nie zachodzi (forma *base-OFF*).^[18]

Z uwagi na fakt, że witamina B₁₂ (**1**) jest substancją egzogenną, zarówno organizmy eukariotyczne, jak i prokariotyczne wykształciły zdolność transportowania jej do wnętrza komórek. Proces ten jest bardziej poznany dla ssaków – zachodzi poprzez złożony i selektywny system trzech białek transportujących: haptokoryny (ang. *haptocorrin*, HC), czynnika wewnętrznego (ang. *intrinsic factor*, IF) oraz transkobalaminy (ang. *transcobalamin*, TC).^[19] Właśnie ten fakt czyni witaminę B₁₂ (**1**) atrakcyjnym kandydatem do dostarczania związków do komórek. Znane są doniesienia literaturowe na temat wykorzystania kobalaminy (**1**) jako efektywnego nośnika leków przeciwnowotworowych,^[20,21] peptydowych,^[22,23] barwników fluorescencyjnych^[10,24,25] czy znaczników radioizotopowych^[26,27] do komórek eukariotycznych. Transport docelowych cząsteczek za pośrednictwem witaminy B₁₂ (**1**) wymaga uprzednich modyfikacji jej struktury, tak aby zawierała ona odpowiednie, reaktywne grupy funkcyjne zdolne do łączenia jej z pożądanym związkiem biologicznie czynnym. Dodatkowo, bardzo istotne jest, aby modyfikacja struktury nie wpływała negatywnie na proces rozpoznawania i wiązania przez wspomniane wcześniej białka transportujące. Wykazano, że witaminę B₁₂ (**1**) można modyfikować lub bezpośrednio funkcjonalizować w pozycjach *e*, R_{5'} oraz na jonie kobaltu bez negatywnego wpływu na rozpoznanie jej modyfikowanych wariantów przez białka transportujące, jednak nie wszystkie z nich są jednakowo dostępne syntetycznie (Rysunek 2).^[18,28] Złożona struktura witaminy B₁₂ (**1**) daje szerokie możliwości modyfikacji, niezbędne do tworzenia biokoniugatów, praca z nią nastęrcza jednak wielu trudności, co często wynika z braku selektywności prowadzonych reakcji.

W przypadku komórek eukariotycznych udowodniono, że przyłączanie związków w niektórych pozycjach negatywnie wpływa na proces rozpoznawania kobalaminy (**1**) przez białka transportujące.^[28] Pochodne sfunkcjonalizowane w pozycjach *c* oraz *d* nie są rozpoznawalne przez haptokorynę, czynnik wewnętrzny i transkobalaminę, natomiast modyfikacja w pozycji *b* tylko w nieznacznym stopniu zaburza transport kobalaminy (**1**) do komórek eukariotycznych. Nie opisano jak dotąd wpływu modyfikacji w pozycjach *a* i *g*. Najbardziej interesujące, z punktu widzenia tworzenia biokoniugatów, okazały się pozycja *e*, jon kobaltu w centrum koryny oraz pierwszorzędowa

grupa hydroksylowa rybozy (tzw. pozycja R_{5'}), gdyż właśnie pochodne sfunkcjonalizowane w tych pozycjach są równie dobrze rozpoznawane i wiązane przez wszystkie trzy białka transportujące, jak naturalna witamina B₁₂ (**1**). Oczywiście jest zatem, że to właśnie w tych miejscach najczęściej przyłączano bioaktywne molekuly.^[29]

Podobnie jak komórki eukariotyczne, również niektóre bakterie wykształciły drogę transportu kobalaminy angażującą serię białek transportujących, którymi w przypadku bakterii *Escherichia coli* są m. in. białka BtuB, TonB, BtuF oraz BtuCD.^[14] Przypuszczenia, dotyczące wykorzystania witaminy B₁₂ jako transportera związków również do komórek bakterii, potwierdziła grupa Gryko badając wpływ modyfikacji struktury witaminy B₁₂ (**1**) na rozpoznanie przez białka transportujące bakterii *E. coli*.^[5,6] Uzyskane wyniki wykazały, że modyfikacje w obrębie pierścienia korynowego (pozycje *c*, *e* i *mezo*) wpływają niekorzystnie na transport peptydowego kwasu nukleinowego (PNA). Podobnie jak w przypadku transportu do komórek eukariotycznych, pochodne modyfikowane na kobalcie są rozpoznawane i wiązane przez serię białek odpowiedzialnych za pobieranie kobalaminy i tym samym nie zaburzają transportu związków do komórek bakteryjnych. Ponadto, również niepełne korynoidy (kobinamid) efektywnie transportowały oligonukleotydy do bakterii.^[6] Spośród wszystkich zbadanych wariantów, koniugaty modyfikowane w pozycji R_{5'}, podobnie jak w przypadku komórek eukariotycznych, były najlepiej rozpoznawane przez białka transportujące, co po raz kolejny potwierdza, że modyfikacje w tej pozycji w najmniejszym stopniu zakłócają transport kobalaminy do wnętrza komórek.^[5]

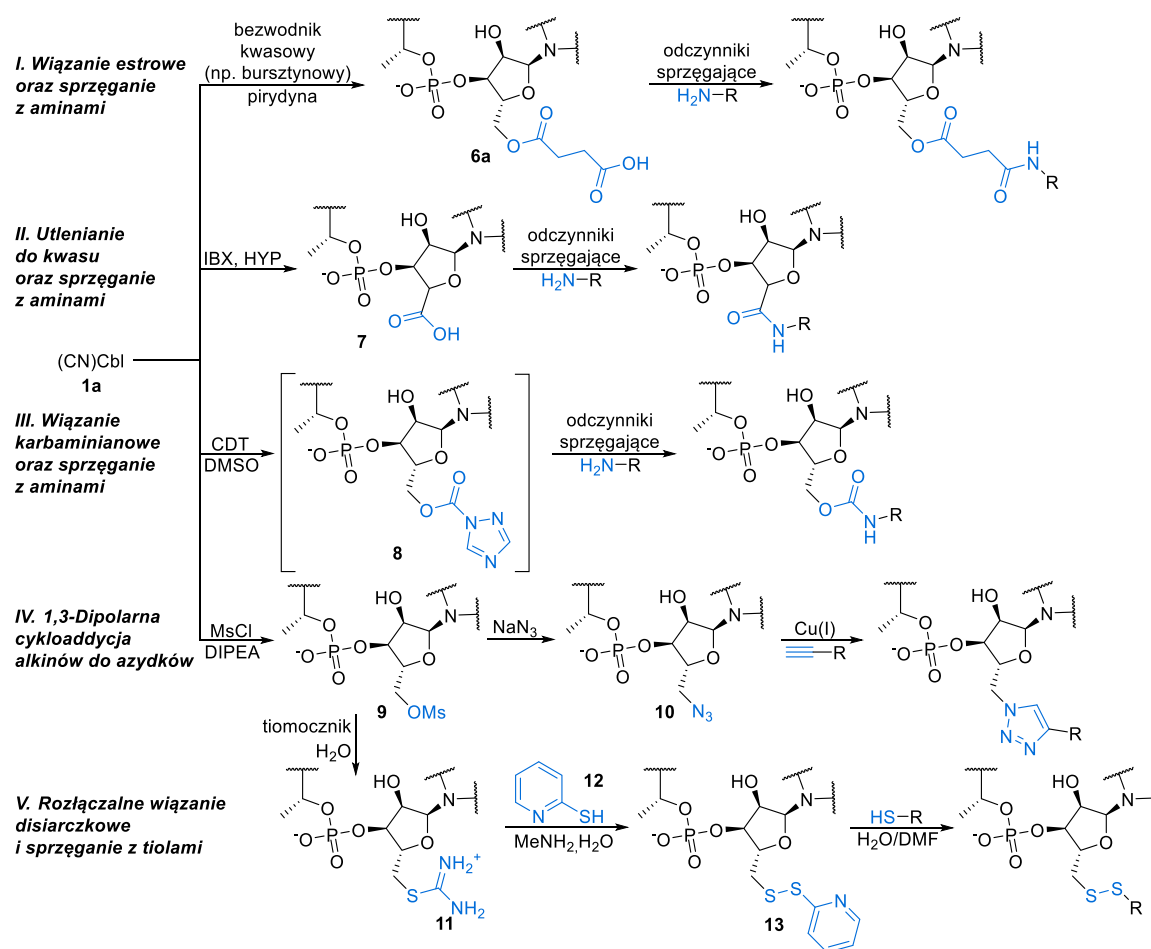
Do kluczowych aspektów dotyczących tworzenia biokoniugatu, a następnie jego transportu do komórek, zalicza się nie tylko dobór właściwego miejsca koniugacji, lecz również kwestię oddziaływania na siebie poszczególnych jego elementów. Ważne jest, aby żaden fragment nie blokował działania pozostałych, tak aby sfunkcjonalizowana kobalamina była nadal rozpoznawana przez serię białek niezbędnych do jej pobierania, a cząsteczka przyłączonego związku, tj. leku, barwnika lub innej aktywnej biologicznie molekuly, mogła oddziaływać ze swoim receptorem, co w konsekwencji pozwala na wywołanie pożądanego efektu terapeutycznego bądź analitycznego. W związku z powyższym, aby wykorzystać witaminę B₁₂ (**1**) do transportowania związków do komórek, należy pamiętać nie tylko o właściwym doborze odpowiedniej pozycji, ale również o uniknięciu niepożądanego oddziaływania między elementami biokoniugatu, co uzyskuje się poprzez wprowadzenie linkera oddzielającego bezpośrednio połączone ze sobą cząsteczki. W tym celu wprowadza się linkery o określonej długości i charakterze (hydrofilowe, hydrofobowe, rozłączalne pod wpływem czynników takich jak GSH, światło bądź nierozłączalne).

Najbardziej dogodną pozycją do modyfikacji kobalaminy (1**), zarówno ze względu na dostępność syntetyczną, jak i rozpoznawanie przez białka transportujące (komórek eukariotycznych i bakterii), jest grupa hydroksylowa rybozy 5'-OH. Dlatego też do opracowania nowych pochodnych witaminy B₁₂ wybrałam właśnie tę pozycję. W części literaturowej**

szczegółowo omówię funkcjonalizację w pozycji 5' kobalaminy (**1**), aby wprowadzić czytelnika w tematykę mojego doktoratu.

Funkcjonalizacje w pozycji R_{5'}

Modyfikacje w pozycji R_{5'}, w przeciwieństwie do peryferyjnych grup amidowych, zachodzą selektywnie. Obecnie, znanych jest pięć selektywnych metod funkcjonalizacji w tej pozycji (Schemat 3). Należą do nich estryfikacja (**I**), utlenianie do grupy karboksylowej (**II**), synteza karbaminianów (**III**), które łączy możliwość przeprowadzenia następczego sprzężenia z aminami. Pozostałe opracowane metodologie to wprowadzenie grupy azydkowej i następcza 1,3-dipolarna cykloaddycja do alkinów (**IV**) oraz tworzenie rozłączalnego wiązania disiarczkowego reaktywnego względem tioli (**V**).

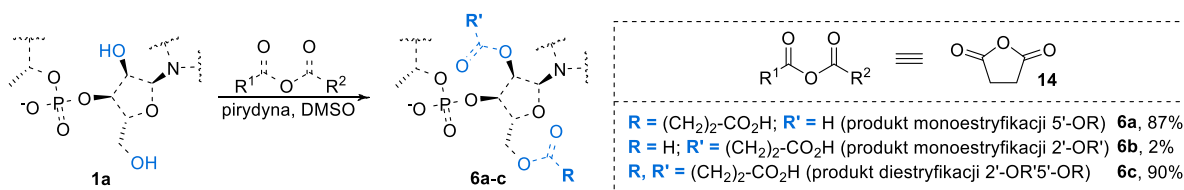


Schemat 3. Modyfikacje witaminy B₁₂ (**1**) w pozycji R_{5'} (R = lek, barwnik, łącznik, itp.).

I. Wiązanie estrowe oraz sprzężenie z aminami

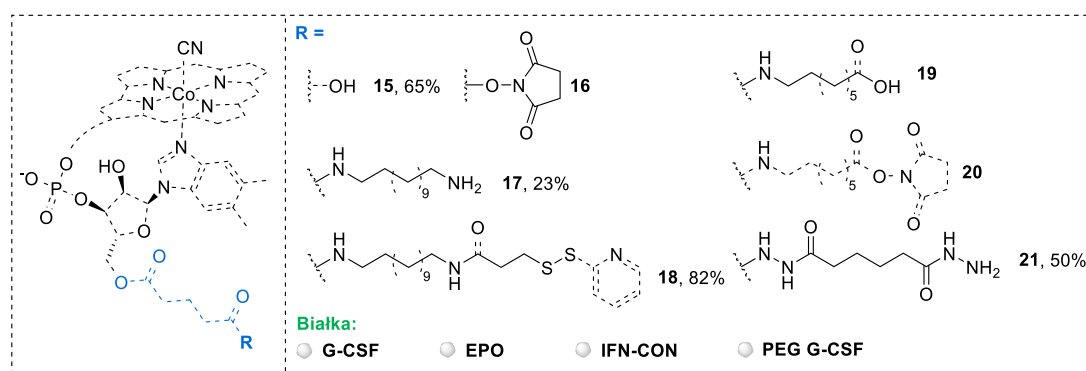
Najwcześniej opracowaną i jednocześnie syntetycznie najprostszą metodą funkcjonalizacji w pozycji 5'-OH jest reakcja estryfikacji bezwodnikami kwasowymi (Schemat 4), która w zależności od ilości zastosowanego bezwodnika, zachodzi głównie na pierwszorzędowej grupie hydroksylowej dając produkty monoestryfikacji i znacznie wolniej na drugorzędowej (2'-OH).^[30] W przypadku

zastosowania dużego nadmiaru bezwodnika, reakcja prowadzi do diestru **6c**. Powstałe pochodne są jednak niestabilne i bardzo łatwo ulegają hydrolizie kwasowej lub zasadowej do kobalaminy (**1**).



Schemat 4. Reakcje estyfikacji witaminy B₁₂ (**1**) bezwodnikiem kwasu bursztynowego (**14**).

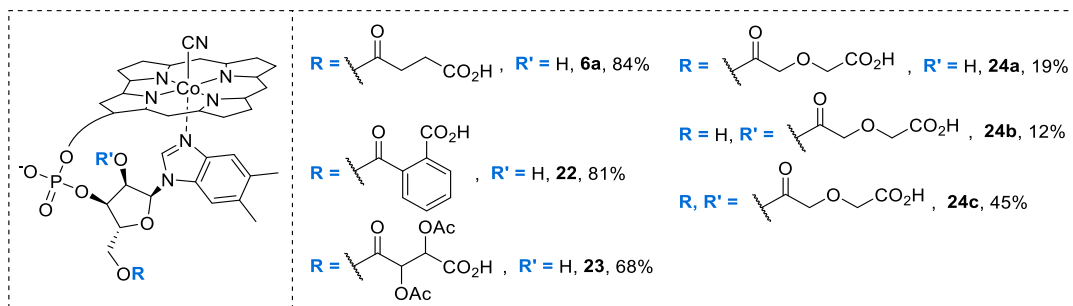
W oparciu o tę metodologię opracowano syntezę pochodnych witaminy B₁₂ z różnymi, terminalnymi grupami funkcyjnymi (Rysunek 3).^[31] Pochodną **15** zawierającą 5-węglowy linker poddano reakcji z *N*-hydroksysukcynoimidem (NHS), w celu aktywowania terminalnej grupy karboksylowej. Aktywny ester **16** wykorzystano następnie w reakcji sprzęgania z białkami, takimi jak: G-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów, ang. *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*), EPO (erytropoetyna – hormon peptydowy, odpowiedzialny m.in. za wzrost liczby erytrocytów i retikulocytów oraz stężenia hemoglobiny), a także IFN-CON (białko stosowane w leczeniu zapalenia wątroby typu C, ang. *Interferon Consensus*). Kolejne przekształcenia pozwoliły na syntezę disiarczkowej formy kobalaminy **18**, którą poddano reakcji sprzęgania z peptydem G-CSF oraz jego pochodną zawierającą poli(tlenek etylenu) (ang. *polyethylene glycol*, PEG). Następnie, pochodną NHS **16** poddano reakcji z kwasem 8-aminokaprylowym, po czym powtórnie przekształcono w aktywny ester **20**, stosując chlorowodorek *N*-(3-dimetyloaminopropyl)-*N'*-etylokarbodiimidu (EDC). Przeprowadzono także reakcję z dihydrazidem kwasu adypinowego, a do otrzymanej cząsteczki **21** przyłączono proteiny EPO oraz IFN-CON. Pionierska praca Habberfielda i jego współpracowników wyeksponowała atrakcyjność funkcjonalizacji witaminy B₁₂ (**1**) w pozycji 5'-OH rybozy.



Rysunek 3. Produkty estyfikacji witaminy B₁₂ (**1**).

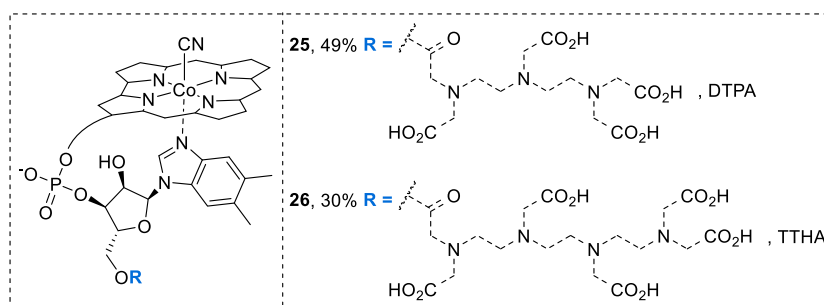
Nie tylko długość, ale również i charakter linkera odgrywa istotną rolę w procesie transportu koniugatów. Kotra i współpracownicy przeprowadzili reakcje estyfikacji z odpowiednimi bezwodnikami: bursztynowym, ftalowym, winowym oraz diglikolowym, uzyskując sześć nowych pochodnych (Rysunek 4).^[32] Reakcje z bezwodnikami bursztynowym, ftalowym oraz diacetylową

pochodną bezwodnika kwasu winowego były selektywne i prowadziły do otrzymania pochodnych **6a**, **22** oraz **23**. Reakcja witaminy B₁₂ (**1**) z bezwodnikiem kwasu diglikolowego prowadziła do mieszaniny trzech produktów estryfikacji **24a**, **24b** oraz **24c** w stosunku 3:2:8 (19:12:45%). Celem przeprowadzonych reakcji było zbadanie właściwości otrzymanych koniugatów pod kątem ich rozpuszczalności i stabilności w różnych warunkach (ludzka surowica, esteraza z wątroby wieprzowej w PBS, woda).



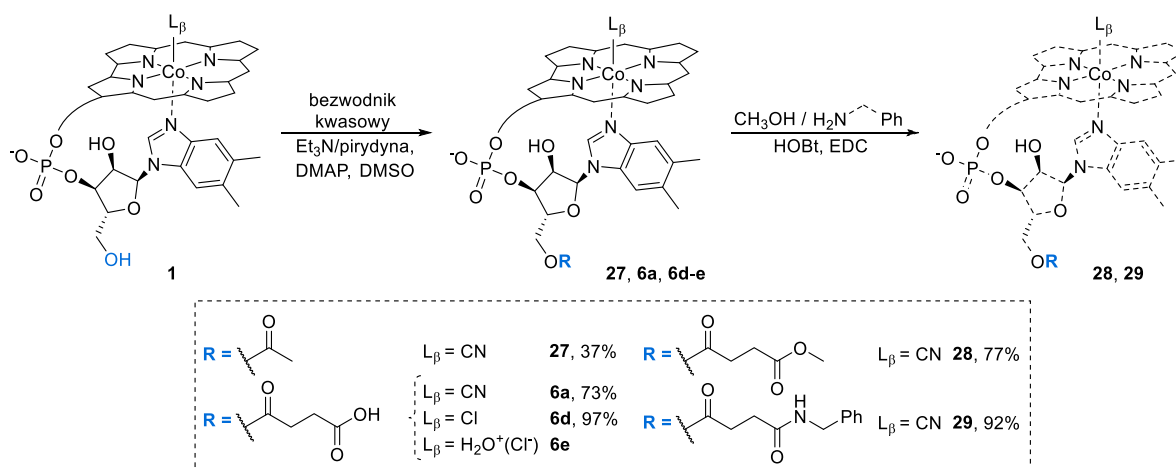
Rysunek 4. Produkty estryfikacji witaminy B₁₂ (**1**) bezwodnikami: bursztynowym, ftalowym, winowym i diglikolowym.

Ta sama metoda posłużyła do syntezy pochodnych witaminy B₁₂ (**1**) z czynnikami chelatującymi metale DTPA lub TTHA, występującymi w formie dibezwodników (Rysunek 5).^[33] Wykazano, że obie pochodne **25** i **26** w formie kompleksów z jonami Gd³⁺ są zdolne do wiązania się z białkiem transportującym TC, z powinowactwem prawie tak samo wysokim, jak macierzysta cząsteczka witaminy B₁₂ (**1**). Testy żywotności inkubowanych komórek K562 w obecności (CN)Cbl-DTPA **25** sugerują, że biokoniugat **25** dostarcza jony Gd³⁺ do komórek na poziomie cytotoksycznym.

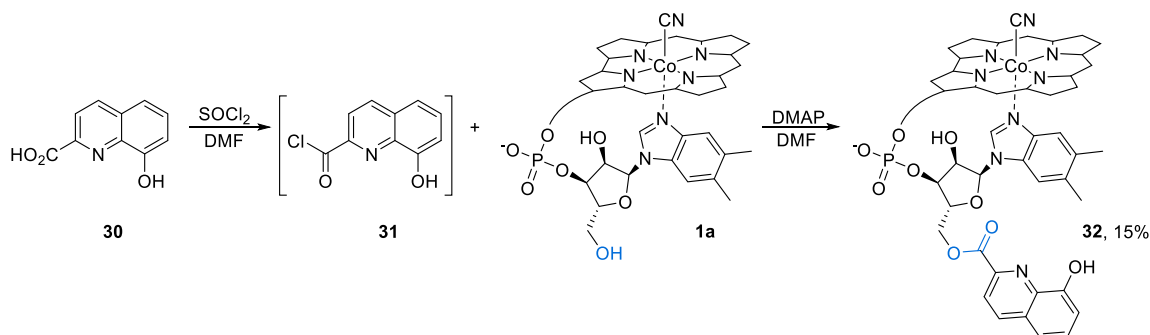


Rysunek 5. Struktury kobalaminy z grupami chelatowymi DTPA oraz TTHA.

Z kolei, zabezpieczenie grupy 5'-OH umożliwia selektywne modyfikacje w pozycji 2'-OH. Doskonałym narzędziem do tego celu okazała się reakcja acylowania bezwodnikiem octowym lub bursztynowym. Kräutler wraz z współpracownikami otrzymali 5'-O-acylowane pochodne kobalaminy **27**, **6a**, **6d-e**, różniące się grupą acylową i/lub ligandem aksjalnym L_β (Schemat 5).^[34] Ponadto, pochodną **6a** poddano dalszym reakcjom estryfikacji i amidowania, otrzymując produkty **28** i **29**.

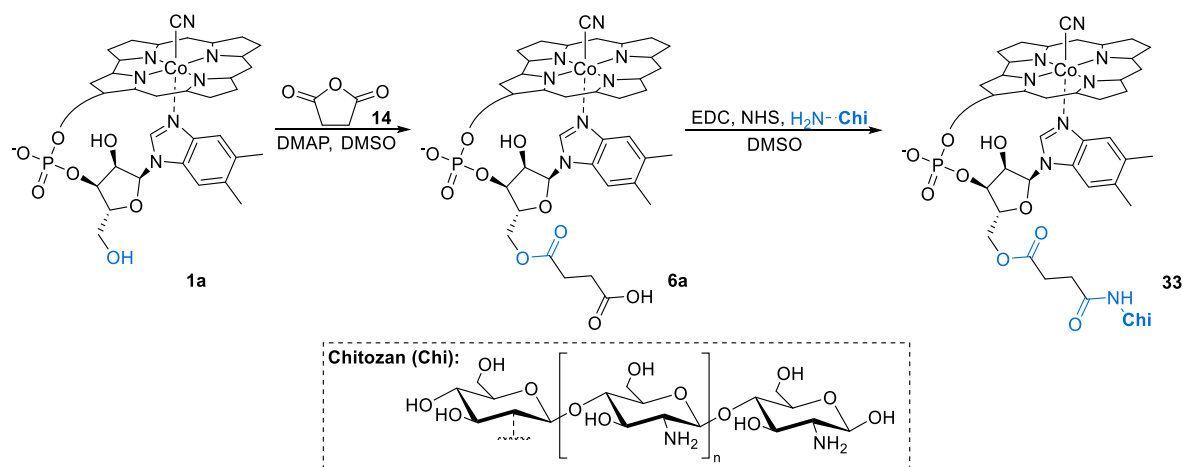
Schemat 5. Reakcje acylowania witaminy B₁₂ (**1**).

Zelder i współpracownicy wykorzystali metodę estyfikacji do syntezy koniugatu B₁₂-chinolina **32**. W tym przypadku zastosowano chlorek kwasowy zamiast bezwodnika (Schemat 6).^[35] Udowodniono, że wprowadzenie ugrupowania chinoliny w pozycję 5'-OH nie zmieniło sposobu wewnątrzcząsteczkowej koordynacji (ugrupowanie chinoliny versus DMBI) i właściwości elektronowych jonu kobaltu, co jest istotne w procesie rozpoznawania witaminy B₁₂ przez białka transportujące. Pochodna **32**, w stosunku do macierzystej cząsteczki B₁₂ (**1**), charakteryzuje się zmniejszoną aktywnością biologiczną, co zaobserwowano na podstawie obniżonego wzrostu komórek *Lactobacillus delbrueckii* w obecności tego koniugatu.

Schemat 6. Synteza koniugatu B₁₂-chinolina **32** otrzymanego w reakcji estyfikacji.

Funkcjonalizacje kobalaminy (**1**) są narzędziem do syntezy biokoniugatów, które wykorzystywane są do badań biologicznych. Mishra wraz z współpracownikami wykorzystali proces tworzenia wiązania estrowego do syntezy pochodnej **6a**, którą poddali reakcji sprzęgania z chitozaniem (Chi) w obecności EDC i NHS (Schemat 7).^[36] Chitozan jest jednym z najczęściej testowanych polimerów stosowanym w doustnym podawaniu insuliny. Badania biologiczne potwierdziły pozytywny wpływ witaminy B₁₂ (**1**) na rozpuszczalność biokoniugatu B₁₂-Chi **33** w obojętnym oraz lekko zasadowym pH (do 8). W dalszych badaniach udowodniono, że nanocząsteczki pokryte chitozaniem-B₁₂ zwiększały wchłanianie insuliny 4-krotnie, w porównaniu z nanocząsteczkami powlekanymi wyłącznie chitozaniem. Co więcej, efekt hipoglikemii utrzymywał się przez 12 godzin.

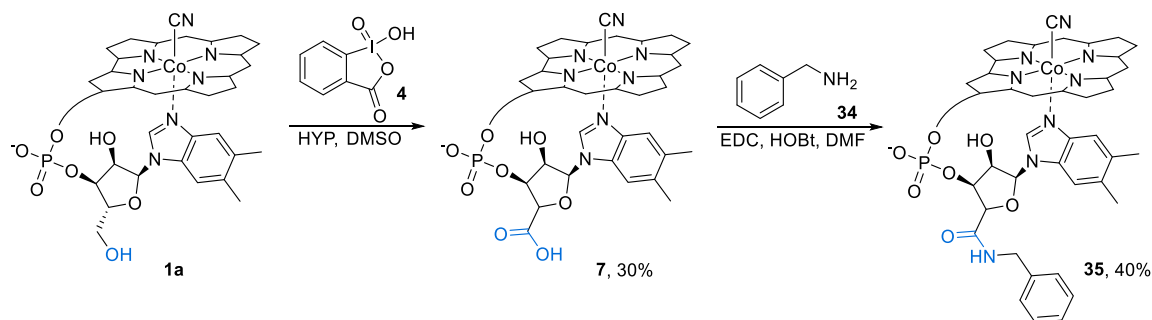
Z wyników uzyskanych w trakcie badań wnioskuje się, że kapsułki z nanocząsteczkami i witaminą B₁₂ (**1**) mogą być klinicznie obiecującym nośnikiem do doustnego podawania insuliny, a także innych peptydów.



Schemat 7. Synteza biokoniugatu B₁₂-chitozan **33**.

II. Utlenie do kwasu oraz sprzężanie z aminami

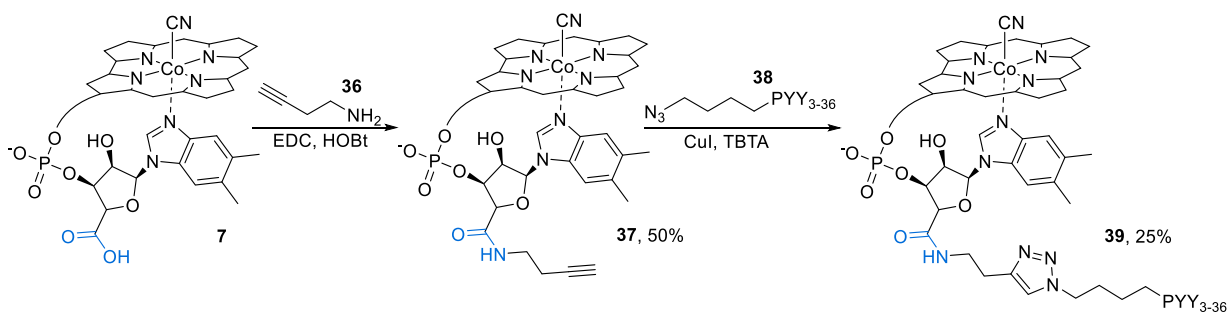
Grupa Doyle'a opracowała metodologię pozwalającą na bezpośrednie łączenie witaminy B₁₂ (**1**) z aminami. Stosując odczynnik utleniający, jakim jest kwas 2-jodoksybenzoowy (IBX, **4**), przeprowadzono proces utleniania pierwszorzędowej grupy hydroksylowej do kwasu karboksylowego (Schemat 8).^[37] Utlenienie grupy 5'-OH do -CO₂H umożliwia przeprowadzenie reakcji estryfikacji, w której tym razem grupa karboksylowa usytuowana jest w cząsteczce witaminy B₁₂. Pochodną **7** wykorzystywano głównie w reakcjach sprzężania z prostymi aminami, bez zastosowania łączników. Niestety, proces utleniania kobalaminy jest zarówno mało selektywny, jak i mało wydajny (30%). Opracowaną pochodną **7** przetestowano w reakcji sprzężania z benzyloaminą (**34**), która prowadziła do otrzymania produktu **35** z wydajnością 40%.



Schemat 8. Reakcja utleniania grupy R₅-OH do kwasu karboksylowego oraz następcza reakcja pochodnej **7** z benzyloaminą (**34**).

Bardziej istotne wydaje się wykorzystanie kwasu **7** w syntezie pochodnej **37** zawierającej terminalne wiązanie potrójne odpowiednie do dalszej funkcjonalizacji na drodze katalizowanej jonami miedzi(I) 1,3-dipolarnej cykloaddycji azydu do alkinu (Schemat 9).^[38] Reakcja kwasu

7 z 3-butynoloaminą (**36**) w obecności EDC oraz HOBt dała pochodną **37** z wydajnością 50%. W kolejnym etapie, w reakcji CuAAC otrzymano biokoniugat **39** z odpowiednio zmodyfikowanym peptydem PYY₃₋₃₆ **38** (ang. *peptide tyrosine tyrosine*, PYY). Peptyd PYY₃₋₃₆ hamuje łaknienie, jednakże jego stosunkowo krótki okres półtrwania jest czynnikiem ograniczającym jego zastosowania kliniczne. Wykorzystanie witaminy B₁₂ (**1**), związanych z nią białek wiążących i receptorów wychwytu zdaje się być interesującym rozwiązaniem tego problemu. Z przedstawionych badań wynika, że koniugat B₁₂-PYY₃₋₃₆ **39** ma podobną bioaktywność do natywnego peptydu *in vitro*, a jednocześnie jest on lepiej wchłaniany.



Schemat 9. Wykorzystanie wiązania amidowego i CuAAC do przyłączania związków o aktywności biologicznej.

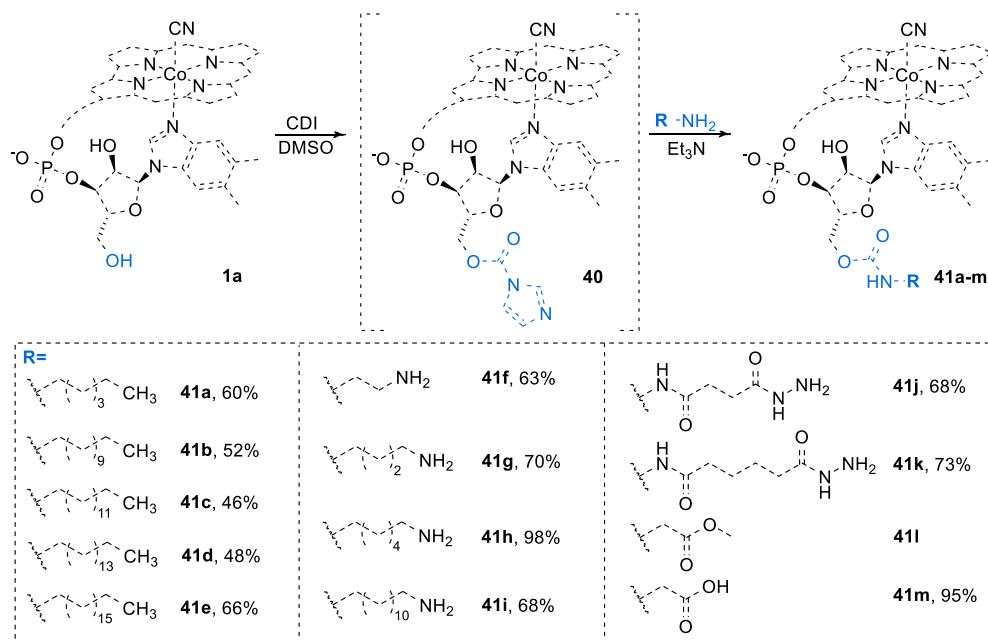
Pochodna **37** z terminalnym wiązaniem potrójnym posłużyła również do syntezy biokoniugatu z peptydem – eksendyną-4 (ang. *Exendin-4*, Ex-4), wykazującą działanie przeciwcukrzycowe i będącą agonistą receptora glukagonopodobnego peptydu-1 (ang. *glucagon-like peptide-1*, GLP-1).^[39] W reakcji cykloaddycji katalizatorem był CuSO₄, przy czym miedź(II) redukowana była do miedzi(I) *in situ* askorbinianem sodu.

Reakcja estryfikacji niewątpliwie była pionierską w temacie modyfikacji pozycji R₅ witaminy B₁₂ (**1**). Tym samym otworzyła nowe możliwości w kontekście tworzenia narzędzi do jej dalszych funkcjonalizacji i przekształceń, a w konsekwencji wykorzystania tej interesującej cząsteczki w biologii i medycynie.

III. Wiązanie karbaminianowe oraz sprzężanie z aminami

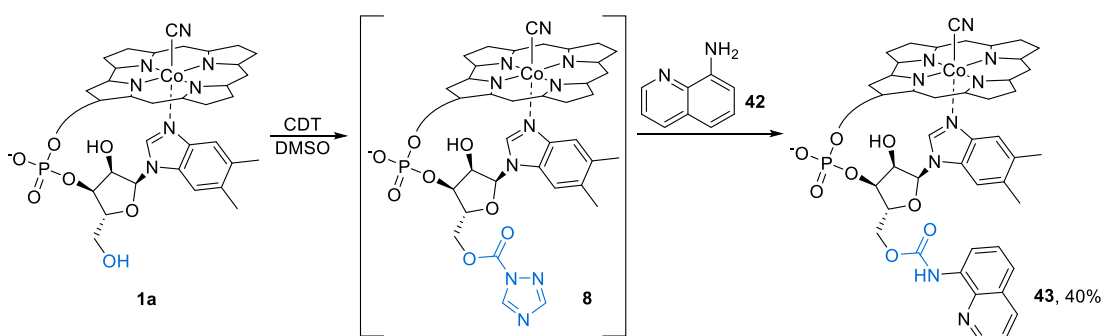
Tworzenie koniugatów kobalaminy z wykorzystaniem wiązania karbaminianowego należy do najczęściej stosowanych strategii w chemii witaminy B₁₂ (**1**). Już w 1999 roku McEwan i współpracownicy otrzymali szereg pochodnych stosując zamiennie 1,1'-karbonylo-diimidazol (CDI), 1,1'-karbonylo-di-(1,2,4-triazol) (CDT) lub węglan di(benzotriazolo-1-ilu) (DBTC) do aktywowania pierwszorzędowej grupy hydroksylowej 5'-OH.^[40] W reakcji z heksyloaminą, pochodna **41a** powstawała z wydajnościami 28, 60 i 95%, odpowiednio w obecności DBTC, CDI oraz CDT. Pomimo najbardziej efektywnego działania CDT, większość opisanych sprzęgań przeprowadzono stosując CDI, którego cena jest najbardziej przystępna (Schemat 10). Wykazano, że pochodne 5'-O-karbaminianowe mają podobne lub wyższe powinowactwo do IF w porównaniu z odpowiednimi pochodnymi *e*-monokwasów. Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów, wykazano, że

zastosowanie 5'-OH pochodnych kobalaminy stanowi realną drogę do skutecznego doustnego dostarczania białek i peptydów.



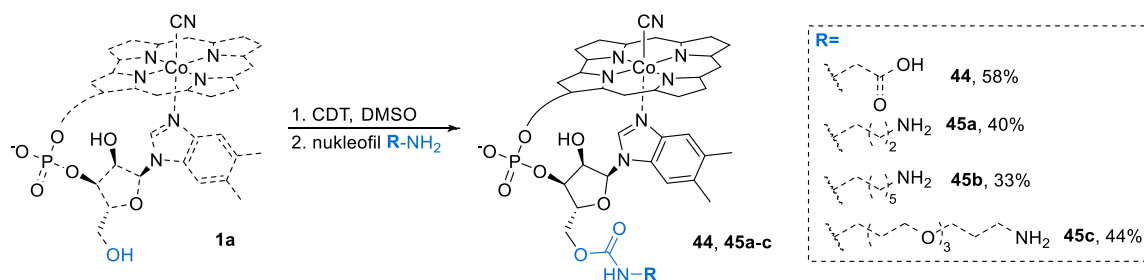
Schemat 10. Pochodne modyfikowane w pozycji 5'-OH poprzez utworzenie wiązania karbaminianowego.

Grupa Zeldera, badając pochodne kobalaminy z przyłączonym ugrupowaniem chinoliny w pozycji 5', zsyntezowała połączenia B₁₂-chinolina nie tylko w procesie estryfikacji (Schemat 6), ale również w oparciu o wiązanie karbaminianowe (Schemat 11), co pozwoliło im na ocenę wpływu łącznika na stabilność i właściwości koniugatów.^[35] Pochodna **43** była bardziej stabilna od związku **32** zarówno w warunkach kwasowych, jak i w obecności jonów Zn²⁺.



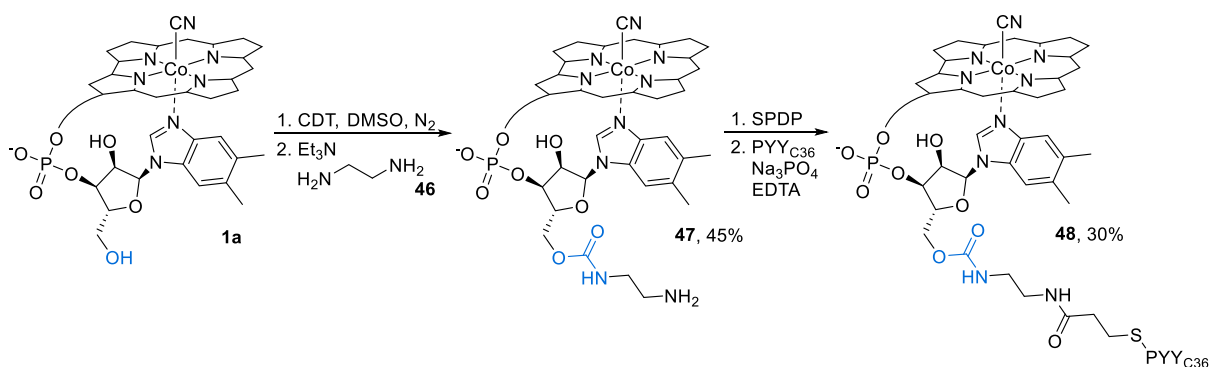
Schemat 11. Synteza koniugatu B₁₂-chinolina **43** utworzonego za pomocą wiązania karbaminianowego.

Grissom i współpracownicy, w reakcji adduktu B₁₂-CDT **8** z estrem metylowym glicyny, otrzymali pochodną **44**.^[41] Analogicznie zsyntetyzowano związki **45a-c** w reakcjach z odpowiednimi diaminami (Schemat 12). Wielowymiarowa spektroskopia NMR potwierdziła, że jedynie pozycja 5'-OH usytuowana na rybofuranosydzidzie została zmodyfikowana w związkach **44**, **45a-c**.



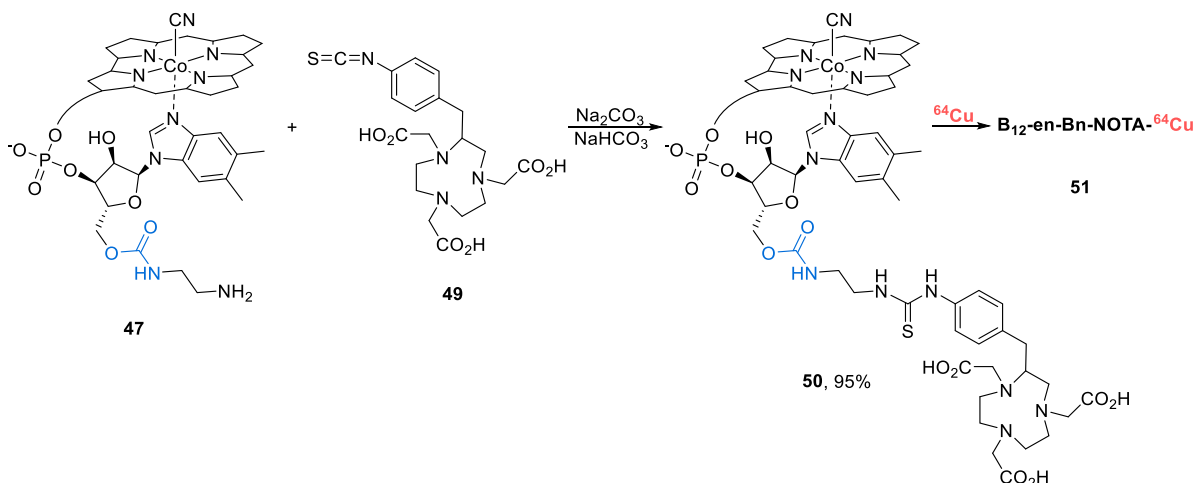
Schemat 12. Pochodne karbaminianowe utworzone z wykorzystaniem CDT.

Wiązanie karbaminianowe wykorzystano również w syntezie biokoniugatów witaminy B₁₂ z peptydem PYY_{C36}.^[38] Pierwszy z nich otrzymany został na drodze tworzenia wiązania amidowego wykorzystując do tego kwas **7**^[37] (Schemat 9), drugi natomiast – bezpośrednio z kobalaminy (**1**) stosując CDT, a następnie przyłączając do adduktu B₁₂-CDT **8** etylenodiaminę (**46**) (Schemat 13).^[42] W kolejnym etapie otrzymaną pochodną **47** sprzęgnięto z peptydem PYY_{C36}.



Schemat 13. Wykorzystanie wiązania karbaminianowego do syntezy koniugatów kobalamina-białko.

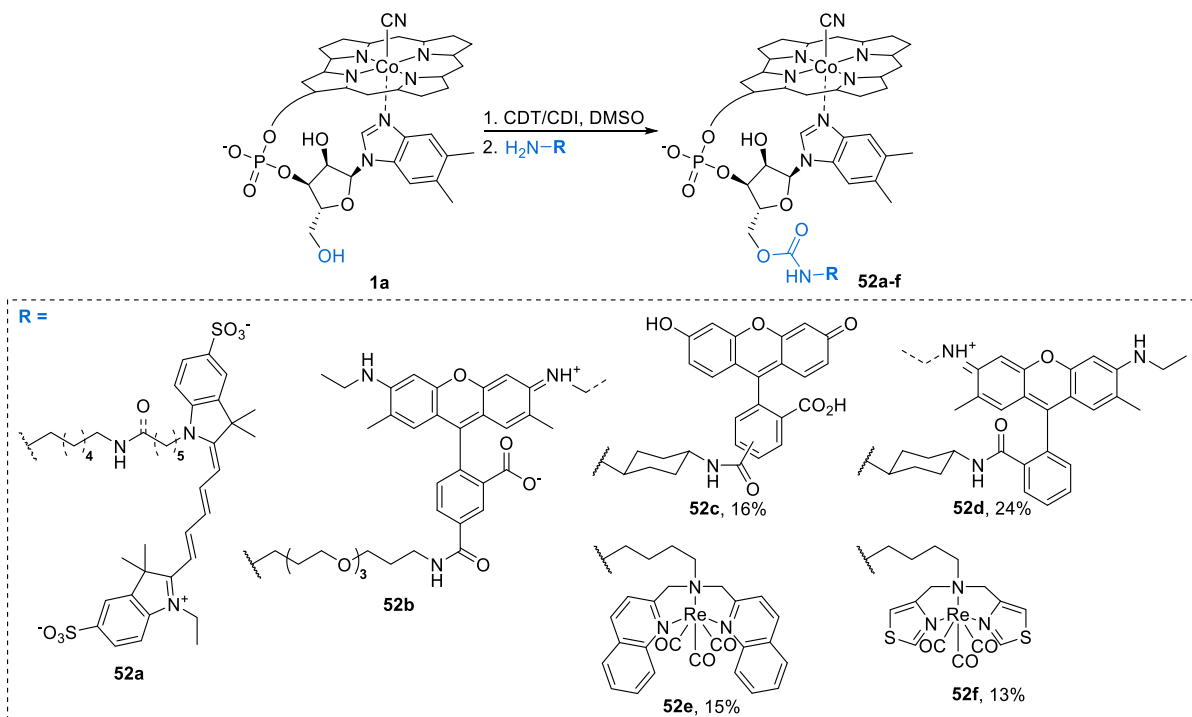
W oparciu o opracowaną metodologię zsyntezowano biokoniugat **51**, który został wykorzystany w obrazowaniu metodą pozytonowej tomografii emisyjnej (PET).^[42] Do syntezy znakowanej radioaktywnie kobalaminy **51** wykorzystano pochodną **47**, której reakcja z chelatem *p*-SCN-Bn-NOTA (**49**) w obecności węglanów Na₂CO₃ oraz NaHCO₃ prowadziła do koniugatu **50** (Schemat 14).



Schemat 14. Synteza pochodnej witaminy B₁₂ wykorzystanej do obrazowania techniką PET.

Został on wykorzystany w obrazowaniu nowotworów trzustki, jajnika, jelita grubego i czerniaka, po uprzednim znakowaniu miedzią ^{64}Cu . Był to pierwszy opisany w literaturze przykład wykorzystania witaminy B₁₂ (**1**) do znakowania techniką PET.

Znakowanie fluorescencyjne jest niezwykle użyteczne m.in. do śledzenia procesów biochemicznych zachodzących w komórkach i tkankach, obrazowania mikroskopowego oraz znakowania biocząsteczek i leków. Ze względu na specyficzny mechanizm wychwytu witaminy B₁₂ (**1**) przez komórki, znalazła ona szerokie zastosowanie w mapowaniu opartym na zjawisku fluorescencji. Przedstawione poniżej przykłady połączeń z kobalaminą (**1**) zostały otrzymane na drodze utworzenia wiązania karbaminianowego (Schemat 15). Do otrzymania wszystkich pochodnych, z wyjątkiem związku **52a** powstałego w obecności CDI, zastosowano CDT. Koniugaty kobalaminy z fluoroforami były testowane m.in. do mapowania limfatycznego (**52a**),^[43] śledzenia akumulacji witaminy B₁₂ w komórkach, w tym także nowotworowych (**52b**),^[44] jako markery nowotworowe wykorzystywane podczas zabiegów chirurgicznych (**52c-d**),^[45] jako biomarkery wykorzystujące receptor kubulinę, stosowane w diagnostyce nowotworów przewodu pokarmowego, raka nerek (**52e**)^[46] oraz raka płuc (**52f**).^[47] W niektórych przypadkach przyłączenie fluorescencyjnej cząsteczki poprzedzono wprowadzeniem linkera, którego zadaniem było oddalenie fluoroforu od pierścienia koryny, minimalizując przy tym interakcje międzycząsteczkowe.

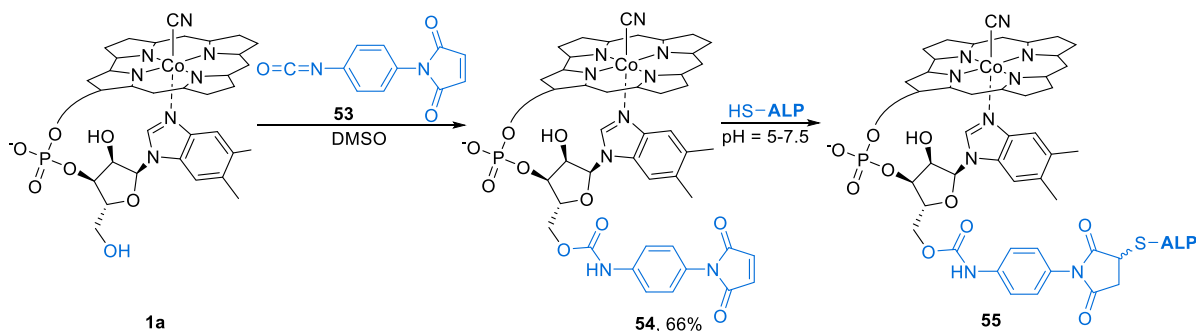


Schemat 15. Synteza pochodnych witaminy B₁₂ stosowanych w obrazowaniu wykorzystującym zjawisko fluorescencji.

Wiązanie karbaminianowe wykorzystywane było wielokrotnie do tworzenia koniugatów witaminy B₁₂ stosowanych w celu opracowania systemu doustnego dostarczania leków. Przykładem modelowego terapeutyku była insulina. Dorkoosh i współpracownicy, podobnie jak zespół Mishry

(Schemat 7),^[36] opracowali metodę syntezy kobalaminy z chitozanem, który ze względu na zdolności biodegradacji, biokompatybilności i właściwości zwiększające wchłanianie, jest szeroko stosowany w systemach dostarczania leków. Taki efekt zaobserwowano również w przypadku insuliny.^[48] Z kolei, grupa Doyle'a zsyntezowała połączenia kobalaminy z zabezpieczoną insuliną. Przedstawiono mechanizm doustnego dostarczania insuliny,^[22] a także wykazano zdolność insuliny do wiązania kobalaminy w przynajmniej dwóch pozycjach tego peptydu.^[49] Ponadto, jako nośnik w badaniach systemu doustnego dostarczania insuliny wykorzystano również połączenie witaminy B₁₂ z usieciowanymi cząstkami dekstranu.^[50]

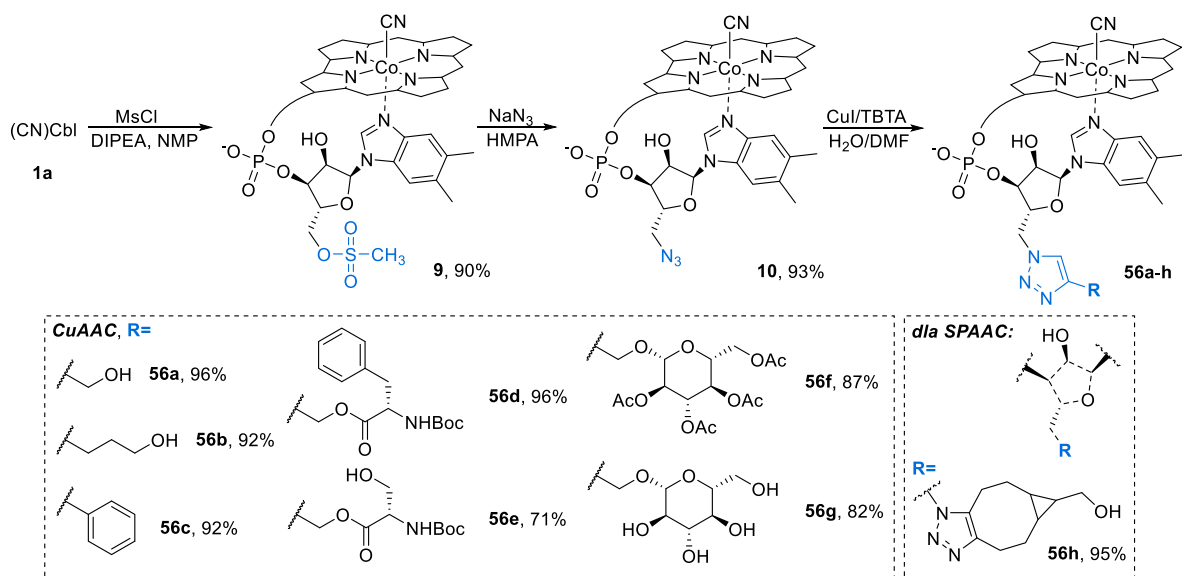
Na uwagę zasługuje również praca Palumbo i współpracowników z 1993 roku, która opisuje metodę syntezy analogu witaminy B₁₂ na drodze tworzenia wiązania karbaminianowego z wykorzystaniem izocyjanianu **53**, zamiast podejścia z CDI czy CDT (Schemat 16).^[51] Otrzymany związek **54** wykazywał reaktywność względem tioli reagując z enzymem fosfatazą alkaliczną (ang. *alkaline phosphatase*, ALP).



Schemat 16. Zastosowanie grupy izocyjanianowej do utworzenia wiązania karbaminianowego.

IV. 1,3-Dipolarna cykloaddycja alkinów do azydków

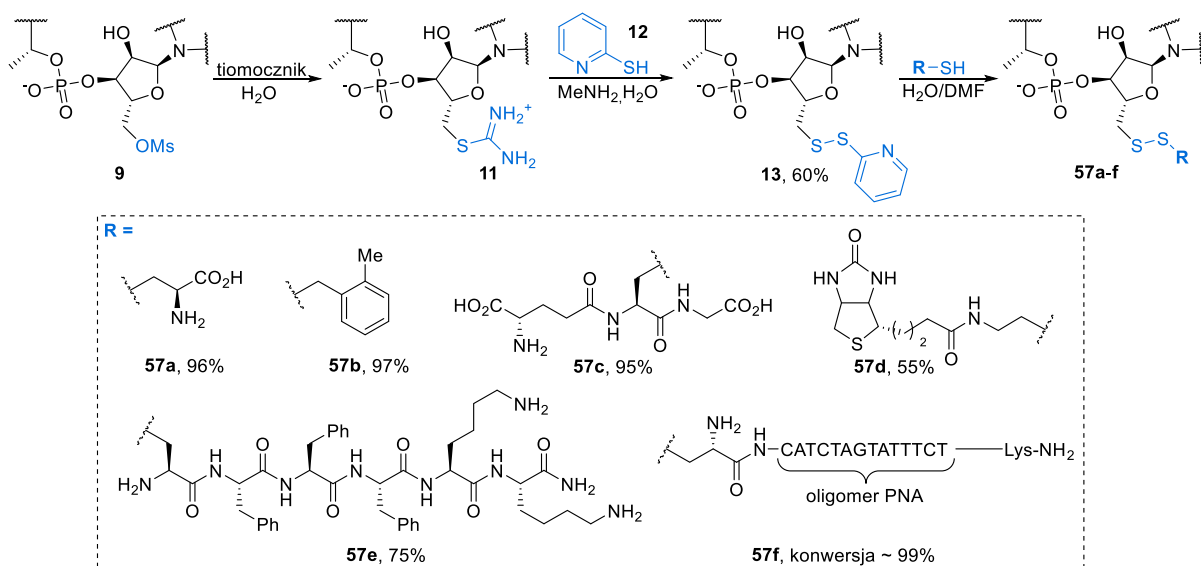
Ze względu na bioortogonalność reakcji azydków z alkinami, grupa Gryko opracowała metodę syntezy pochodnej witaminy B₁₂ **10** posiadającej w pozycji 5' grupę -N₃, która okazała się użytecznym narzędziem w syntezie połączeń w CuAAC (Schemat 17).^[52] Funkcjonalizację rozpoczęto od przekształcenia grupy hydroksylowej w lepszą grupę odchodzącą w reakcji witaminy B₁₂ (**1**) z chlorkiem mesyłu w obecności *N,N*-diizopropyletyloaminy (DIPEA) w *N*-metylopirolidonie (NMP) jako rozpuszczalniku. W kolejnym etapie w reakcji substytucji nukleofilowej wprowadzono azydek, przy czym zastosowanym rozpuszczalnikiem był heksametylofosforoamid (HMPA). Finalny azydek **10** jest użytecznym partnerem w reakcji typu 'click'. Jest on aktywny nie tylko w CuAAC, ale również w wariacie niewymagającym zastosowania miedziowego katalizatora (ang. *strain-promoted azide-alkyne cycladdition*, SPAAC). Reakcja ta okazała się bardzo użyteczną metodą syntezy stabilnych koniugatów.



Schemat 17. Synteza pochodnej kobalaminy z terminalną grupą $-\text{N}_3$ oraz jej wykorzystanie w CuAAC i SPAAC.

V. Rozłączalne wiązanie disiarczkowe i sprzężenie z tiolami

Opisane w literaturze podejścia syntetyczne prowadzą w większości przypadków do stabilnych połączeń kobalamina-terapeutyk. Czasami jednak, dodatkowym atutem może być możliwość kontrolowanego rozłączania otrzymanych koniugatów w docelowym miejscu. Kwestia ta została rozwinięta przez grupę Gryko, w której opracowano pochodną kobalaminy **13** zawierającą wiązanie reaktywne względem tioli.^[53] Synteza obejmowała opisane już mesylowanie pierwszorzędowej grupy hydroksylowej, podstawienie tiomocznikiem oraz następczą zasadową hydrolizę w obecności 2-merkaptopirydyny (**12**) (Schemat 18). Trójetapowa synteza prowadziła do otrzymania pochodnej **13** z wydajnością 60%, która jest reaktywna względem tioli.



Schemat 18. Sekwencja reakcji prowadząca do pochodnej **13** oraz jej następcze sprzężenie z tiolami.

Kluczowe w tym procesie było zastosowanie metyloaminy, która jako jedyna prowadziła do selektywnej hydrolizy soli tiouroniowej **11**. Wydzielenie powstałej pochodnej witaminy z grupą tiolową w pozycji R₅ było jednak niemożliwe z powodu tworzenia się dimerycznego produktu. Stąd związek ten przekształcono w pochodną **13**. Wprowadzone ugrupowanie –SSPy jest selektywne względem tioli, co wykorzystano m.in. w reakcji z cysteiną i PNA. Wykazano, że połączenie disiarczkowe w docelowych koniugatach może być selektywnie rozłączone w obecności glutationu (tiolu obecnego w komórkach eukariotycznych).

Podsumowanie

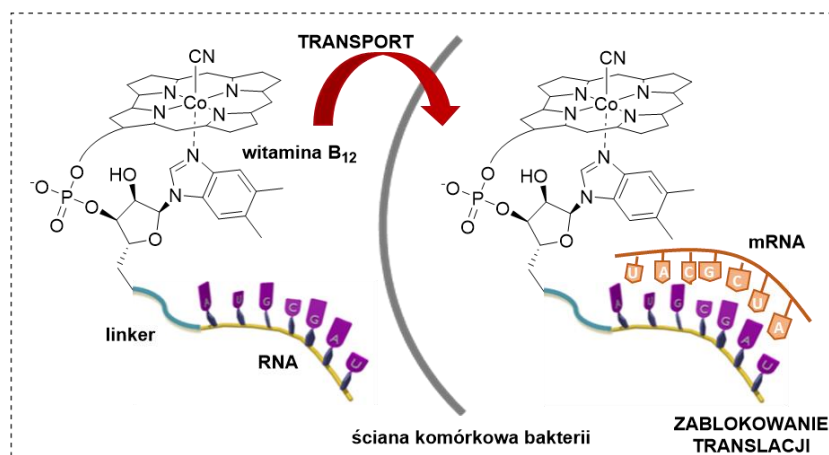
Ze względu na bardzo złożoną strukturę, modyfikacje witaminy B₁₂ (**1**) są ciągłym wyzwaniem wymagającym żmudnych procesów optymalizacyjnych, czasu i cierpliwości. Pomimo tego, liczne doniesienia literaturowe wskazują na nieustające zainteresowanie tą cząsteczką wśród naukowców. Spośród kilku grup funkcyjnych obecnych w jej strukturze, pierwszorzędowa grupa hydroksylowa jest pozycją najbardziej dostępną i najchętniej wykorzystywaną do dalszych funkcjonalizacji. Powodem tego jest wysoka selektywność przeprowadzanych procesów, jak również zadowalająca stabilność otrzymywanych połączeń. Opisanie w literaturze podejścia syntetyczne obejmują możliwość funkcjonalizacji tej pozycji na drodze estryfikacji bądź amidowania po uprzednim utlenieniu grupy hydroksylowej do karboksylowej lub w procesie tworzenia wiązania karbaminianowego. Ponadto, opracowano reakcję substytucji prowadzącą do wprowadzenia funkcji azydku w pozycję R₅, a otrzymana pochodna **10** jest doskonałym partnerem w katalizowanej jonami miedzi(I) 1,3-dipolarnej cykloaddycji. Odpowiednio zmodyfikowana witamina B₁₂ **13** wykazuje również doskonałą reaktywność względem tioli, a utworzone wiązanie disiarczkowe charakteryzuje selektywna rozłączalność w obecności glutationu, czyli tiolu obecnego w komórkach eukariotycznych. Ponadto, koniugaty witaminy B₁₂ ze związkami o znaczeniu biologicznym utworzone w obrębie pozycji R₅ są rozpoznawalne przez serię białek zaangażowanych w pobieranie kobalaminy, dzięki czemu połączenia witamina B₁₂-terapeutyk mogą być transportowane do komórek. Do najczęściej przyłączanych związków zalicza się leki,^[54] barwniki fluorescencyjne,^[44] związki chelatujące metale^[55] oraz kompleksy metali.^[47]

5.3 Badania własne

Kobalamina (**1**) cieszy się dużym zainteresowaniem wśród naukowców, co wynika przede wszystkim z jej szeroko poznanej aktywności biologicznej. Jednakże, bada się również możliwości wykorzystania jej jako transportera związków do komórek. W tym kontekście, należy pamiętać o miejscach koniugacji, które po modyfikacji nie mają negatywnego wpływu na proces rozpoznawania kobalaminy przez białka transportujące. Należą do nich centralny jon kobaltu, pozycja *e* oraz usytuowana na rybozje pierwszorzędowa grupa hydroksylowa w pozycji R₅.

Moim głównym celem badawczym było zaprojektowanie sekwencji reakcji obejmujących odpowiednio (a) funkcjonalizację witaminy B₁₂ (1**) w pozycji 5', (b) tworzenie jej koniugatów z aktywnymi biologicznie związkami oraz (c) badanie ich transportu do komórek prokariotycznych.** Pomimo licznych doniesień literaturowych opisujących transport związków do komórek eukariotycznych z wykorzystaniem witaminy B₁₂ (**1**) jako nośnika, przykłady zastosowania tej strategii do transportowania substancji do komórek bakteryjnych są nieliczne.^[5,6]

Infekcje wywołane zakażeniami bakteryjnymi powszechnie leczy się antybiotykami. Ich nadużywanie, niewłaściwe lub zbyt krótkie podawanie wywołuje zjawisko oporności, które powoduje obniżenie efektu terapeutycznego. Skłania to do poszukiwań nowych sposobów hamowania rozwoju bakterii. Atrakcyjnym podejściem wydaje się zastosowanie krótkich, modyfikowanych, antysensownych oligonukleotydów zaburzających ekspresję genów bakterii na poziomie translacji poprzez komplementarne przyłączanie się do bakteryjnego RNA, blokowanie produkcji białek bakteryjnych i w efekcie hamowanie wzrostu bakterii.^[3,4] Problem stanowi fakt, że komórki bakterii nie pobierają oligonukleotydów ze środowiska, co jest czynnikiem ograniczającym ich potencjalne zastosowanie jako alternatywę dla antybiotyków. Obiecującą strategią skutecznej i nieinwazyjnej metody wprowadzania krótkich, modyfikowanych oligonukleotydów do komórek prokariotycznych może być wykorzystanie właściwości transportujących witaminy B₁₂ (**1**) (Rysunek 6).

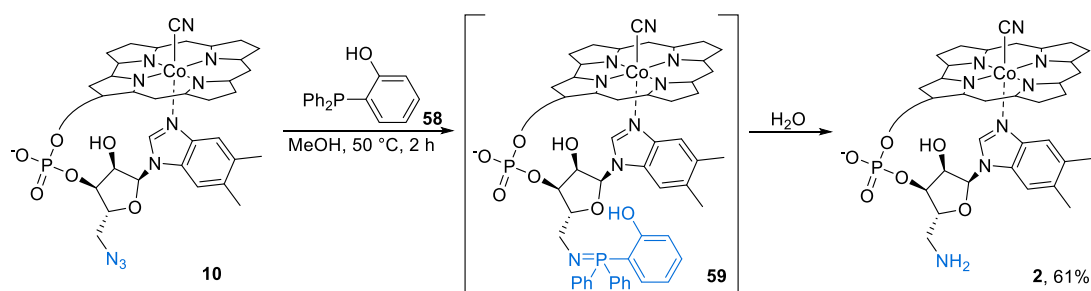


Rysunek 6. Witamina B₁₂ (**1**) jako transporter oligonukleotydów RNA do bakterii.

5.3.1 Synteza pochodnej B₁₂-5'NH₂ (**2**) i jej koniugatów

Większość opracowanych do tej pory pochodnych witaminy B₁₂ (**1**) to związki reaktywne względem amin (np. w reakcji estryfikacji bądź na drodze tworzenia wiązania karbaminianowego). Natomiast, w celu przyłączenia do cząsteczki B₁₂ związków z wolną grupą karboksylową, do których należy mnóstwo związków biologicznie czynnych, jak chociażby aminokwasy i peptydy zabezpieczone na *N*-końcu, stosowano podejścia związane z koniecznością wcześniejszego wprowadzania odpowiednich łączników. Metodologie bezpośredniego łączenia kobalaminy z kwasami karboksylowymi nie były znane z uwagi na brak odpowiednich ścieżek syntetycznych. **W związku z tym, na początku swojej pracy za cel postawiłam sobie opracowanie pochodnej witaminy B₁₂ zawierającej grupę aminową w pozycji 5', co w konsekwencji pozwoliłoby na bezpośrednie sprzężenie jej ze związkami z funkcją -CO₂H.**^[56] Postanowiłam wykorzystać azydek **10**, którego redukcja prowadziłaby do pożądanej aminy **2**. Dwuetapowa synteza związku **10**, obejmująca odpowiednio mesylowanie grupy hydroksylowej i substytucję azydkiem, została opracowana wcześniej w naszej grupie,^[52] dlatego moim zadaniem było opracowanie efektywnych warunków redukcji azydku **10** do aminy **2**.

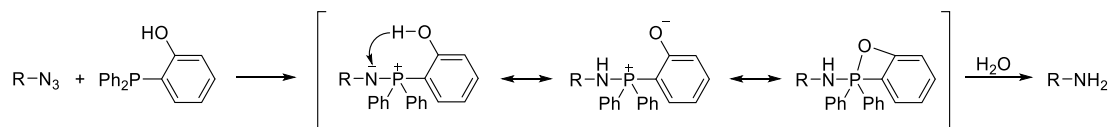
Redukcja azydków organicznych jest dobrze znaną, selektywną i stosunkowo prostą metodą otrzymywania amin pierwszorzędowych. Praca z witaminą B₁₂ (**1**) nauczyła mnie jednak, że reakcje, które można bez problemu przeprowadzić dla prostych związków organicznych, wymagają dużego nakładu pracy w przypadku tak złożonej cząsteczki. Tak było i tym razem. Badania rozpoczęłam od zastosowania prostych odczynników redukujących, takich jak NaBH₄ oraz układu Zn/kwas, niestety nie zaobserwowałam tworzenia się pożądanej 5'-B₁₂NH₂ (**2**). Uwodornienie katalizowane Rh/C w wodzie pozwoliło na otrzymanie jedynie śladowych ilości produktu **2**. Nieskuteczne okazały się również metody, w których stosowałam mesylan **9** w reakcji z amoniakiem lub użyłam go jako substratu w warunkach syntezy Gabriela. Jedynie reakcja Staudingera z wykorzystaniem fosfin pozwoliła mi na redukcję azydku **10** do aminy **2** (Schemat 19).^[56]



Schemat 19. Redukcja azydku **10** do 5'-aminy **2** w reakcji Staudingera.

Proces redukcji wymagał optymalizacji, ponieważ w obecności standardowo stosowanej Ph₃P otrzymywałam jedynie odporny na hydrolizę iminofosforan **59**. Rozwiązaniem okazało się zastosowanie fosfiny **58**, w której jedna z grup fenyłowych posiadała w swej strukturze podstawnik 2-hydroksylowy. W tym przypadku, hydroliza zachodziła efektywnie, ponieważ w produkcie

pośrednim proton fenolowy formy betainowej charakteryzuje się zwiększoną kwasowością z powodu pojawienia się dodatniego ładunku na atomie fosforu, co w konsekwencji powoduje jego migrację do atomu azotu (Schemat 20). Podobny mechanizm opisany został przez Gololobova i współpracowników, którzy zaobserwowali w reakcji Staudingera (z azydkami zawierającymi hydroksylową bądź aminową grupę funkcyjną) wewnątrzcząsteczkowy nukleofilowy atak atomu O lub N na fosfor i późniejszą migrację protonów do atomu azotu w P=N.^[57]



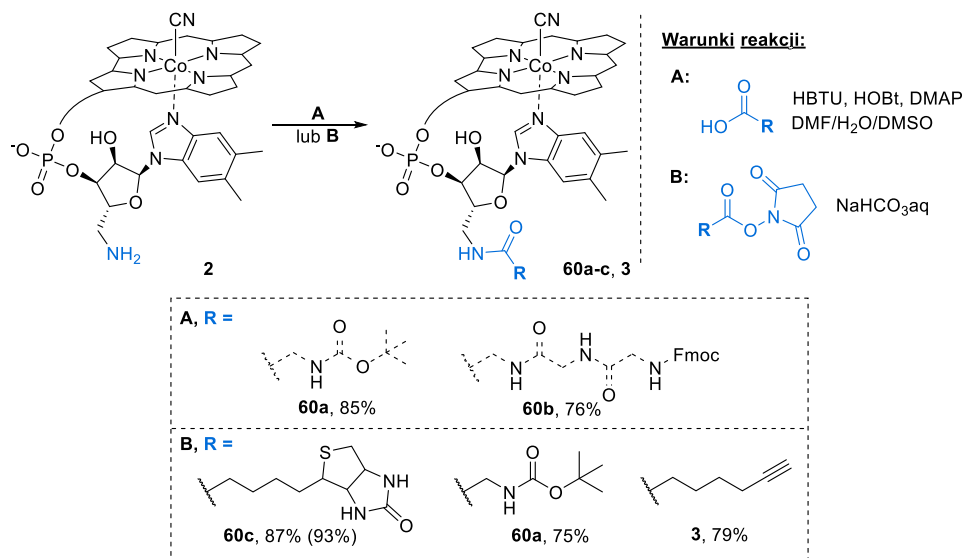
Schemat 20. Mechanizm hydrolizy betainy.

W kolejnym etapie zoptymalizowałam warunki reakcji redukcji, mając na uwadze ilość stosowanej fosfiny **58**, rodzaj rozpuszczalnika i czas reakcji. Spośród wszystkich testowanych rozpuszczalników (DMSO, DMA, NMP, HMPA, DMF) tylko zastosowanie metanolu pozwoliło uzyskać pożądaną 5'-aminę **2**, a najlepszy rezultat uzyskałam już po 2 godzinach reakcji stosując 3 równoważniki molowe fosfiny **58**. Aminę **2** otrzymałam z wydajnością 61%. Ze względu na złożoną strukturę cząsteczki, a w konsekwencji szeroki wachlarz grup funkcyjnych, w funkcjonalizacji witaminy B₁₂ (**1**) nie tylko sam przebieg reakcji potrafi być zaskakujący, ale również często mało selektywny. Problematyczny bywa również proces oczyszczania.

Otrzymana pochodna aminowa **2** okazała się doskonałym partnerem w reakcjach ze związkami zawierającymi wolne grupy karboksylowe. W celu syntezy amidów, zastosowałam dwa podejścia: pierwsze z nich – klasyczne – zakładające reakcję kwasów karboksylowych w obecności odpowiednich odczynników sprzęgających (Schemat 21, **A**) oraz drugie – coraz częściej spotykane – polegające na reakcji z aktywnymi estrami NHS (Schemat 21, **B**). Wariant klasyczny wymagał optymalizacji, w której zwróciłam uwagę na rodzaj odczynnika sprzęgającego, stosowaną zasadę oraz rozpuszczalnik. Optymalne w tej reakcji było zastosowanie HBTU z dodatkiem HOBT, DMAP-u jako zasady oraz trójskładnikowego układu rozpuszczalników DMF/H₂O/DMSO. Koniugat aminy **2** z *N*-Boc-glicyną otrzymałam z bardzo dobrą wydajnością 85%. Wariant ten rozszerzyłam o sprzęganie z tripeptydem Gly-Gly-Gly, otrzymując koniugat **60b** z równie dobrym rezultatem (76%).

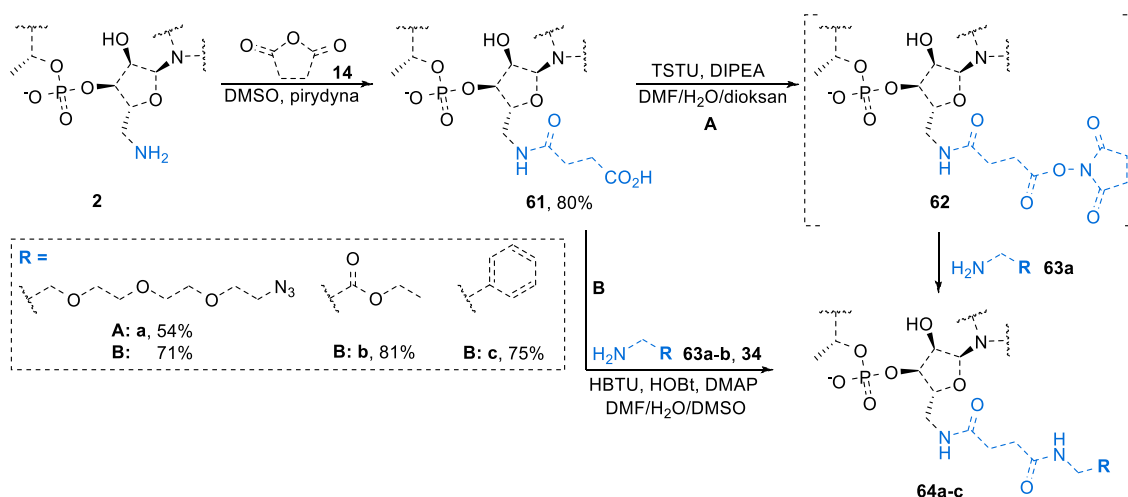
Reakcje z aktywnymi estrami przeprowadziłam w 0.1 M roztworze NaHCO₃, a partnerami były pochodne NHS: biotyny, glicyny oraz kwasu hept-6-ynowego. Wprowadzenie do struktury kobalaminy terminalnego wiązania potrójnego w przypadku ostatniego partnera otworzyło możliwość koniugacji B₁₂ z azydkami w CuAAC. Pożądane koniugaty **60c**, **60a** oraz **3** uzyskałam z satysfakcjonującymi wydajnościami, odpowiednio 87, 75 i 79%. Niewątpliwie dużym potencjałem opracowanej metodologii była możliwość przeprowadzenia reakcji w układach biologicznych, co potwierdziłam przeprowadzając reakcję z biotyną w warunkach fizjologicznych (pH = 7.4, 37 °C),

która prowadziła do uzyskania produktu **60c** z wydajnością 93% (vs. 87% dla reakcji prowadzonej w warunkach optymalnych).



Schemat 21. Sprzężanie kwasów karboksylowych z 5'-B₁₂NH₂ (**2**).

Opracowaną metodologię syntezy aminowej pochodnej 5'-B₁₂NH₂ (**2**) oraz jej koniugatów, wykorzystałam do wprowadzenia funkcji kwasu karboksylowego w pozycję 5' poprzez zastosowanie odpowiedniego łącznika (Schemat 22). Do tego celu wykorzystałam bezwodnik bursztynowy (**14**). Proces ten zoptymalizowałam biorąc pod uwagę ilość bezwodnika i pirydyny, temperaturę oraz czas reakcji. Najlepsze rezultaty uzyskałam stosując 10 równoważników molowych substratu **14** i pirydyny. Reakcję prowadziłam w DMSO w temperaturze 40 °C przez 5 godzin, co w konsekwencji pozwoliło mi otrzymać kwas **61** z wydajnością 80%.



Schemat 22. Synteza pochodnej karboksylowej **61** i jej sprzężanie z aminami.

Otrzymany kwas **61** umożliwił syntezę koniugatów z: 11-azydo-3,6,9-trioksaundekano-1-aminą (**63a**) – użyteczną w następnej reakcji typu 'click', aminokwasem – estrem etylowym glicyny (**63b**) oraz benzyloaminą (**34**). Pierwszy wariant syntetyczny (Schemat 22, **A**) obejmował transformację

'one-pot' witaminowego kwasu **61** do aktywnego estru **62** i następcze sprzęganie z 11-azydo-3,6,9-trioksaundekano-1-aminą (**63a**). Pożądany koniugat **64a** wyizolowałam z wydajnością 54%. Zaproponowane podejście **B** wymagało wykorzystania odczynników sprzęgających. Stosując tę metodę koniugaty **64a-c**, z odpowiednio 11-azydo-3,6,9-trioksaundekano-1-aminą (**63a**), estrem etylowym glicyny (**63b**) i benzyloaminą (**34**), uzyskałam z wydajnościami 71, 81 oraz 75%.

Pomimo licznych doniesień literaturowych na temat modyfikacji witaminy B₁₂ (**1**), jak dotąd nie opracowano metodologii pozwalającej na syntezę pochodnej zawierającej grupę aminową bezpośrednio w pozycji 5'. To zadanie zrealizowałam, co więcej rozszerzyłam je o wprowadzenie funkcji karboksylowej. Oba podejścia poparłam przykładami następczych sprzęgań z aminami – w wariancie klasycznym z odczynnikami sprzęgającymi, jak również poprzedzone wytworzeniem aktywnego estru na cząsteczce witaminy B₁₂. Wszystkie zaproponowane przeze mnie ścieżki syntetyczne tolerują obecność wody, a reakcja w warunkach fizjologicznych przyniosła bardzo zadowalające rezultaty. **Pochodna 5'-B₁₂NH₂ (2) stanowi użyteczne narzędzie do łączenia witaminy B₁₂ ze związkami biologicznie czynnymi.**

Opisana procedura funkcjonalizacji została opublikowana w artykule:

Agnieszka Jackowska, Mikołaj Chromiński, Maciej Giedyk, Dorota Gryko

Org. Biomol. Chem. **2018**, *16*, 936–943

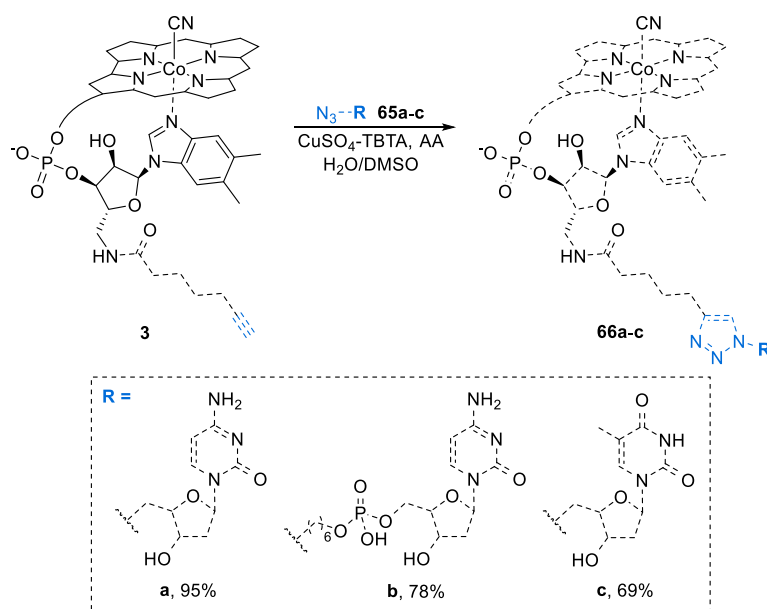
5'-Vitamin B₁₂ derivatives suitable for bioconjugation via the amide bond

5.3.2 Synteza połączeń typu B₁₂-2'OMeRNA

Rosnąca oporność bakterii względem obecnie stosowanych terapii antybiotykowych skłania naukowców do opracowywania nowych podejść umożliwiających walkę z infekcjami bakteryjnymi. Kobalamina (**1**) w naturalny sposób przenika przez błony bakteryjne, zatem jej połączenia z terapeutykami powinny być rozpoznawalne przez białka transportujące. To założenie zostało potwierdzone przez zespoły Gryko i Trylskiej, które wykazały, że witamina może transportować oligomery peptydowego kwasu nukleinowego do komórek bakterii.^[5,6] PNA jest syntetycznym analogiem kwasów nukleinowych charakteryzującym się znacznie większą trwałością niż jego naturalny odpowiednik. Ważnym zagadnieniem była dla mnie możliwość syntezy koniugatów witaminy z bardziej wymagającym syntetycznym partnerem, a mianowicie metylovanym oligomerem RNA. Dlatego też, za cel postawiłam sobie opracowanie podejścia syntetycznego prowadzącego do syntezy koniugatów witaminy B₁₂ (**1**) z odpowiednio zmodyfikowanymi oligonukleotydami (2'OMeRNA), ocenę skuteczności ich przenikania przez bakteryjne błony komórkowe, jak również sprawdzenie ich właściwości przeciwbakteryjnych.

Zaproponowane przeze mnie podejście syntetyczne opierało się na zastosowaniu katalizowanej jonami miedzi(I) 1,3-dipolarnej cykloaddykcji azydków do alkinów.^[58] Do tego celu wykorzystałam opracowaną pochodną **3**,^[56] która zawiera terminalne wiązanie potrójne, oraz czternastonukleotydowe

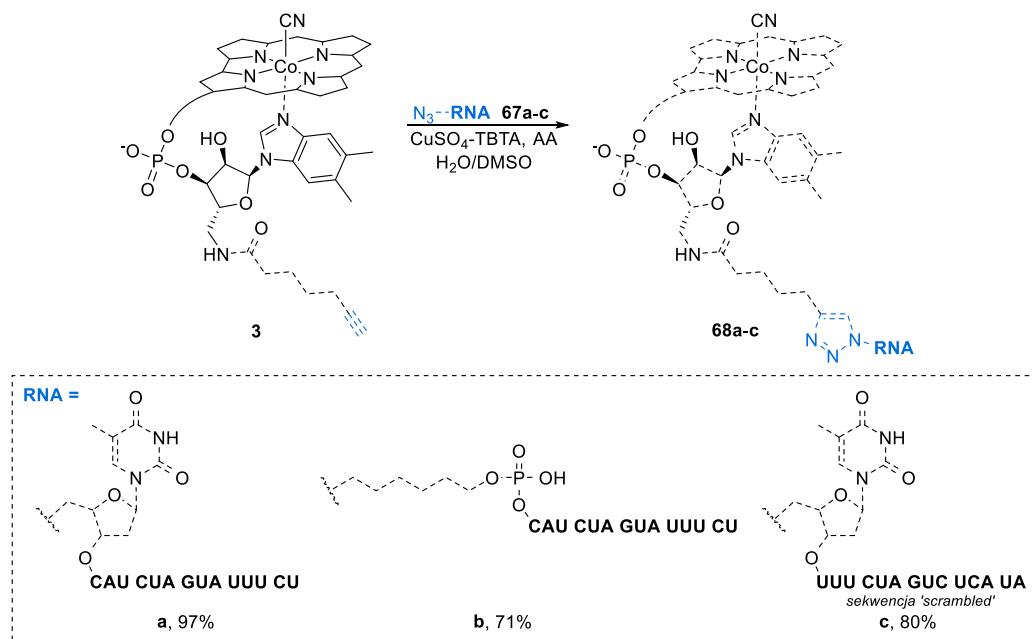
sekwencje RNA z grupą $-N_3$ na końcu 5' wygaszające białko czerwonej fluorescencji (ang. *red fluorescence protein*, RFP).^[5] Ze względu na wysoki koszt antysensownych oligonukleotydów, badania modelowe rozpoczęłam od opracowania strategii syntezy z wykorzystaniem ich skróconych analogów. W pierwszej kolejności opracowałam syntezę modelowych azydków **65**, którymi były: (a) pochodna deoksycytydyny **65a**, zawierająca nukleofilową grupę aminową, (b) pochodna deoksycytydyny **65b** z ujemnie naładowanym linkerem fosforanowym oraz (c) 5'-azydotymidyna (**65c**) (Schemat 23). Następnie zoptymalizowałam warunki reakcji pochodnej witaminy B₁₂ **3** z azydkiem **65a**, pod względem katalizatora, środka redukującego, rozpuszczalnika i czasu reakcji. Optymalne warunki sprawdziły się również dla reakcji z pozostałymi azydkami **65b** i **65c**. Stosując układ katalityczny CuSO₄-TBTA (tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)metylo]amina), kwas askorbinowy niezbędny do redukcji miedzi(II) oraz mieszaninę H₂O/DMSO, związki **66a**, **66b**, i **66c** uzyskałam z bardzo dobrymi wydajnościami, odpowiednio 95, 78 oraz 69%.^[58]



Schemat 23. Reakcja pochodnej **3** ze związkami **65** zawierającymi funkcję azydku.

Mając opracowaną metodologię tworzenia koniugatów pochodnej witaminy B₁₂ **3** z pochodnymi **65a-c**, związek **3** poddałam reakcji z odpowiednio zmodyfikowanymi oligomerami 2'OMeRNA **67a-c** (Schemat 24). Pierwsza sekwencja oligonukleotydów, tzw. anty-RFP, została zaprojektowana jako komplementarna do transkryptu mRNA kodującego białko czerwonej fluorescencji w celu zahamowania jego produkcji w odpowiednio zmodyfikowanych komórkach *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium*.^[14,59-62] Hamowanie fluorescencji białka RFP było wskaźnikiem efektywnego transportu koniugatów B₁₂-RNA do komórek bakterii. Chcąc porównać wpływ linkera na transport, przeprowadziłam reakcje z azydkami **67a** i **67b** różniącymi się długością łańcucha węglowego. Pierwszy z nich zawierał deoksytymidynę, a drugi – sześciowęglowy łańcuch alifatyczny. Koniugat z linkerem heksylovym **68b** był jednak niestabilny podczas oczyszczania, dlatego też nie był brany pod uwagę w badaniach biologicznych prowadzonych przez grupę biologów

w zespole prof. Trylskiej. Druga sekwencja – zwana sekwencją ‘scrambled’, występująca w analogu **68c**, zawiera dokładnie te same zasady jak sekwencja anty-RFP, jednak nie była komplementarna do pożądanego fragmentu mRNA, co tym samym czyniło ją sekwencją kontrolną w stosunku do anty-RFP. Reakcje pochodnej kobalaminy **3** z oligomerami **67a-c** przebiegały selektywnie w zoptymalizowanych wcześniej warunkach, co pozwoliło mi na uzyskanie koniugatów B₁₂-2’OMeRNA **68a-c** z zadowalającymi rezultatami (konwersja HPLC), odpowiednio 97, 71 i 80%.



Schemat 24. Synteza koniugatów B₁₂-2’OMeRNA **68a-c** w katalizowanej jonami miedzi(I) 1,3-dipolarnej cykloaddycji.

Otrzymane pochodne **68a** i **68c** przetestowałam pod względem stabilności w pożywce bakteryjnej Davis Minimal Broth.^[63] Analiza RP-HPLC nie wykazała znaczących różnic po 16-sto godzinnej inkubacji w temperaturze 37 °C, co dowodzi stabilności koniugatów **68a** i **68c** w tych warunkach. Badania biologiczne, przeprowadzone w grupie prof. Trylskiej, polegające na monitorowaniu inhibicji produkcji białka czerwonej fluorescencji w komórkach *Escherichia coli* i *Salmonella Typhimurium*, potwierdziły antysensowny efekt koniugatu zawierającego anty-RFP, co wykazano poprzez spadek poziomu fluorescencji o około 50% w obu typach komórek, co tym samym stanowi miarę efektywności witaminy B₁₂ jako nośnika tych związków. Zgodnie z oczekiwaniami, pozostałe związki, czyli koniugat z sekwencją ‘scrambled’ oraz macierzysta cząsteczka witaminy B₁₂ (**1**) nie wpływały na obniżenie poziomu fluorescencji w komórkach. Dodatkowo, wykluczono niespecyficzną toksyczność koniugatów B₁₂-2’OMeRNA **68a** i **68c** oraz przeprowadzono badania cytotoksyczności na komórkach *E. coli*, *S. Typhimurium* oraz ludzkich embrionalnych komórkach nerkowych (HEK 293), dla których nie zaobserwowano znaczącego wpływu na żywotność w porównaniu do komórek kontrolnych.

Opracowana przeze mnie metodologia pozwoliła na efektywną syntezę stabilnych koniugatów witaminy B₁₂ z oligomerami 2’OMeRNA. Otrzymane koniugaty przenikają do bakterii

Gram-ujemnych, co dowodzi, że witamina B₁₂ jest zdolna do transportowania oligonukleotydów 2'OMeRNA do komórek prokariotycznych. Jest to pierwszy odnotowany przypadek dostarczenia 2'OMeRNA do komórek bakteryjnych przy zastosowaniu witaminy B₁₂ jako nośnika, który dowodzi, że kobalamina jest obiecującym narzędziem do zwiększenia biodostępności tych oligomerów.

Opisana procedura syntezy koniugatów B₁₂-2'OMeRNA została opublikowana w artykule:

Maciej Giedyk, **Agnieszka Jackowska**, Marcin Równicki, Monika Kolanowska, Joanna Trylska, Dorota Gryko

Chem. Commun. **2019**, 55, 763–766

Vitamin B₁₂ transports modified RNA into E. coli and S. Typhimurium cells

5.3.3 Fotelabilne koniugaty witaminy B₁₂

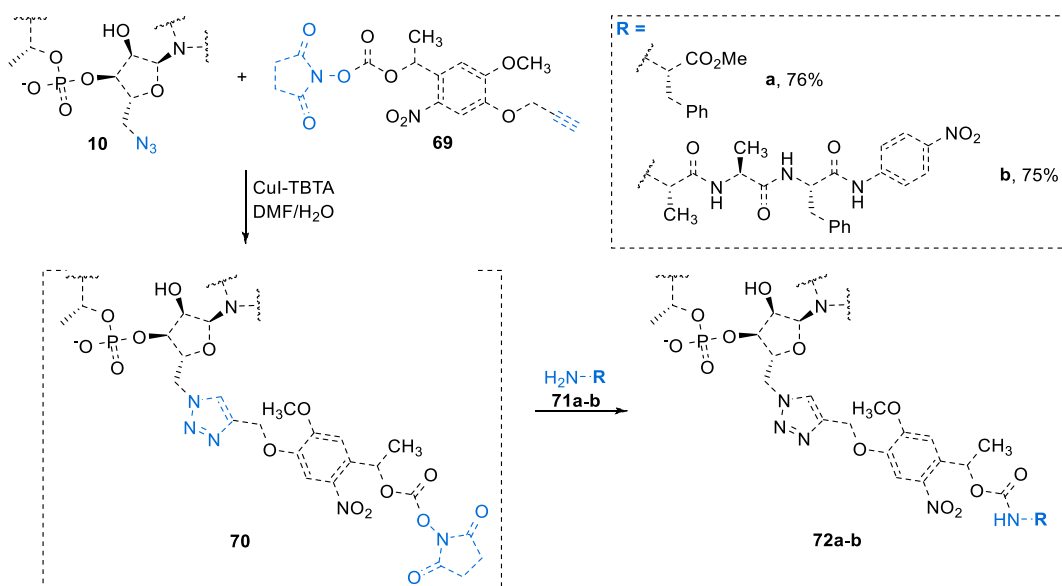
Kontrolowane rozłączenie połączeń B₁₂-aktywna molekula w docelowym miejscu może być korzystne, w przypadku gdy witamina B₁₂ (**1**) oddziałuje z miejscem wiązania transportowanego związku lub w badaniach obejmujących interakcje bispecyficzne między tym związkiem a inną cząsteczką w układzie biologicznym.^[64] Jak dotąd opracowano niewiele podejść syntetycznych pozwalających na uwolnienie cząsteczki przyłączonej do kobalaminy. Opisane podejścia dotyczą głównie syntezy koniugatów zawierających w swej strukturze wrażliwe na warunki redukujące wiązanie disiarczkowe, przy czym tylko jedna praca odnosi się do interesującej mnie pozycji R₅. Pierwsza klasa związków otrzymana została na drodze modyfikowania pozycji *e* kobalaminy poprzez zastosowanie wiązania karbaminowego, w celu wprowadzenia łącznika zawierającego wiązanie disiarczkowe.^[65] Natomiast drugie podejście związane jest z odpowiednią funkcjonalizacją w pozycji 5' rybozy, która pozwala na bezpośrednie przyłączenie tioli.^[53] Wprowadzone w ten sposób do struktury witaminy B₁₂ połączenia disiarczkowe są selektywnie rozłączone w obecności glutationu, który jest biologicznym czynnikiem redukującym.

W ramach pracy doktorskiej postanowiłam opracować metodologię syntezy fotorozłączalnych koniugatów witaminy B₁₂. Światło, ze względu na swoje niewątpliwe zalety, na przestrzeni lat stało się atrakcyjnym, a co za tym idzie często stosowanym, czynnikiem zewnętrznym służącym do kontrolowania chemicznych i biologicznych procesów *in situ*.^[66-69] Oferuje ono wysoką selektywność przeprowadzanych transformacji, jest na ogół nieinwazyjne (przy odpowiednim doborze długości fali), ortogonalne w stosunku do większości elementów żyjących systemów oraz nie powoduje zanieczyszczenia próbki. Co więcej, długość fali i natężenie mogą być precyzyjnie regulowane, pozwalając na dobór fotolabilnego łącznika o odpowiedniej selektywności. Według doniesień literaturowych, wszystkie fotolabilne koniugaty witaminy B₁₂ oparte są na wprowadzaniu cząsteczek transportowanych w obrębie jonu kobaltu, z których uwolnienie związku możliwe jest poprzez zerwanie relatywnie słabego wiązania Co-C (energia wiązania ~30 kcal/mol). Synteza takich koniugatów jest trudna z uwagi na ich ograniczoną stabilność.^[70] Prace Lawrence'a i Shella wykazały,

że wyposażenie koniugatów we fluorofor przyłączony w obrębie centrum koryny wyzwała fotohomolizę wiązania Co-C, która jest uzależniona od charakteru wprowadzonego barwnika i dzięki temu może być wywołana promieniowaniem z zakresu od UV do NIR.^[25,71-73]

Mając na uwadze atrakcyjność podejścia z wykorzystaniem światła jako czynnika uwalniającego związku z cząsteczki, postanowiłam opracować metodologię tworzenia sfunkcjonalizowanych w pozycji R_{5'} pochodnych witaminy B₁₂ zawierających ugrupowanie rozszczepialne pod jego wpływem. Wybrany przeze mnie fotolabilnym łącznikiem był 1-(5-metoksy-2-nitro-4-prop-2-ynyloksyfenylo)etylowęglan *N*-sukcynoimidylu (**69**) zawierający dwa użyteczne w syntezie ugrupowania: aktywny ester zdolny do sprzęgań z aminami oraz, niezbędne w 1,3-dipolarnej cykloaddycji z azydkami, terminalne wiązanie potrójne (Schemat 25). Natomiast, modelowymi biologicznie czynnymi cząsteczkami były aminokwasy, biotyna, odpowiednio zmodyfikowany oligomer RNA oraz barwnik fluorescencyjny.^[74] Zawierały one w swych strukturach niezbędne do koniugacji ugrupowania: grupę aminową, funkcję azydku lub terminalne wiązanie potrójne, co w konsekwencji wymagało adekwatnej funkcjonalizacji witaminy B₁₂ (**1**), czyli odpowiednio: grupy karboksylowej, terminalnego wiązania potrójnego bądź funkcji azydku. Otrzymanie koniugatów poprzedziła kilkuetapowa synteza fotorozłączalnego łącznika **69**, którą wykonałam zgodnie z procedurami literaturowymi.^[75,76]

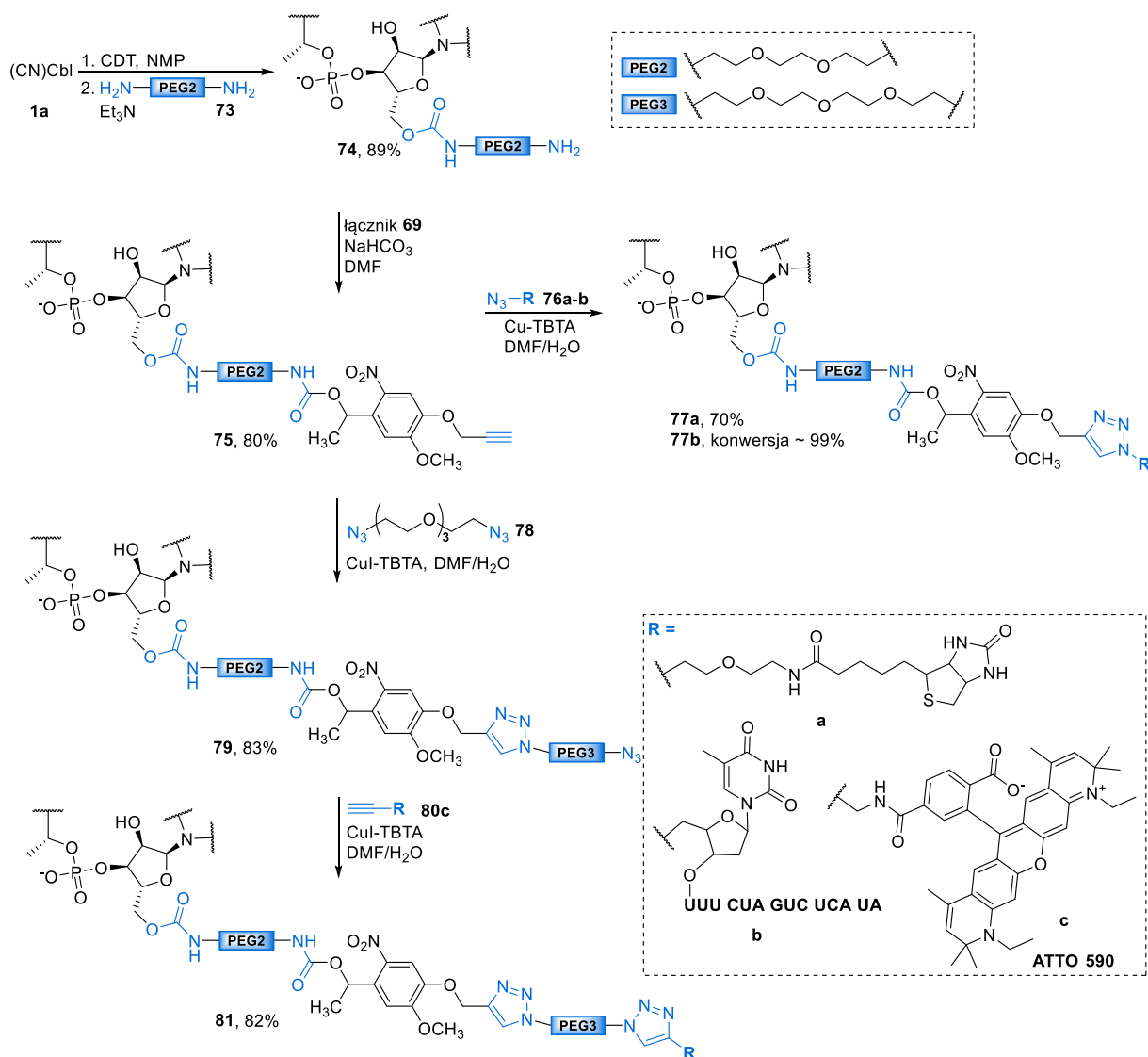
W pierwszym podejściu wykorzystałam opracowany w naszej grupie azydek **10**, który w katalizowanej jonami miedzi(I) reakcji z fotolabilnym łącznikiem **69** prowadził do uzyskania pochodnej **70**, zdolnej do następczej reakcji z aminami (Schemat 25). Jej masę potwierdziłam metodą ESI-MS HR, a charakterystyczny sygnał $m/z = 1770,6516$ odpowiadał jonowi pseudomolekularnemu $[M - H]^-$. Aktywny ester **70** był jednak niestabilny i szybko ulegał hydrolizie. W tej sytuacji konieczne było opracowanie procedury ‘one-pot’, w której powstający aktywny ester **70** poddałam reakcji z aminą, bez uprzedniego izolowania.



Schemat 25. Fotolabilna pochodna witaminy B₁₂ **70** w reakcji z aminami.

Optymalizację procesu prowadziłam stosując modelowy ester metylowy fenyloalaniny (**71a**), gdzie szczególną uwagę zwróciłam na ilość zastosowanej aminy **71a** oraz łącznika **69**, katalizator, rozpuszczalnik oraz czas reakcji. Spośród wszystkich testowanych rozpuszczalników (DMA, NMP, DMSO, HMPA, DMF), zastosowanie mieszaniny DMF-u i H₂O okazało się skuteczne. W zoptymalizowanych warunkach przeprowadziłam reakcje z estrem metylowym fenyloalaniny (**71a**) oraz tripeptydem Ala-Ala-Phe-*p*NA (**71b**), otrzymując koniugaty **72a** i **72b** z dobrymi wydajnościami, odpowiednio 76 oraz 75%.^[74]

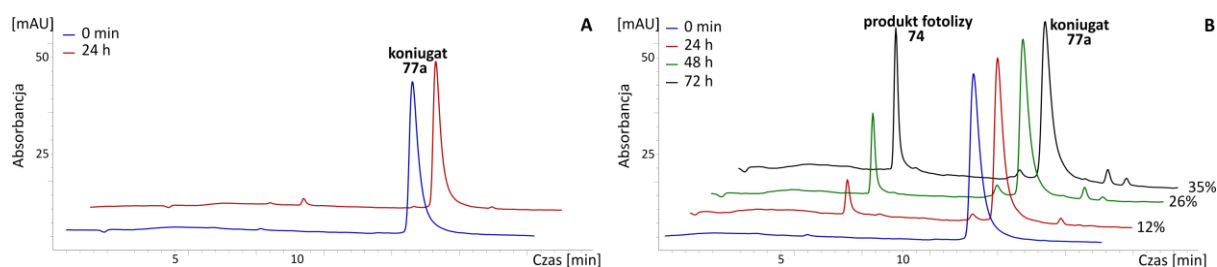
Oprócz wyżej opisanego podejścia, opracowałam również dwa warianty, w których pochodna kobalaminy reaguje z azydami lub alkinami (Schemat 26). W tym celu, niezbędna była pochodna B₁₂ z grupą aminową. Z uwagi na trój etapowy proces tworzenia 5'-B₁₂NH₂ (**2**), zdecydowałam się na syntezę pochodnej **74**, poprzez utworzenie wiązania karbaminianowego za pomocą aktywacji grupy hydroksylowej z CDT oraz następcze sprzężenie z 2,2'-(etylenodioksy)bis(etyloamina) (**73**). Pochodną aminową **74** otrzymałam z wydajnością 89%.



Schemat 26. Fotelabilne koniugaty witaminy B₁₂ utworzone w reakcji CuAAC.

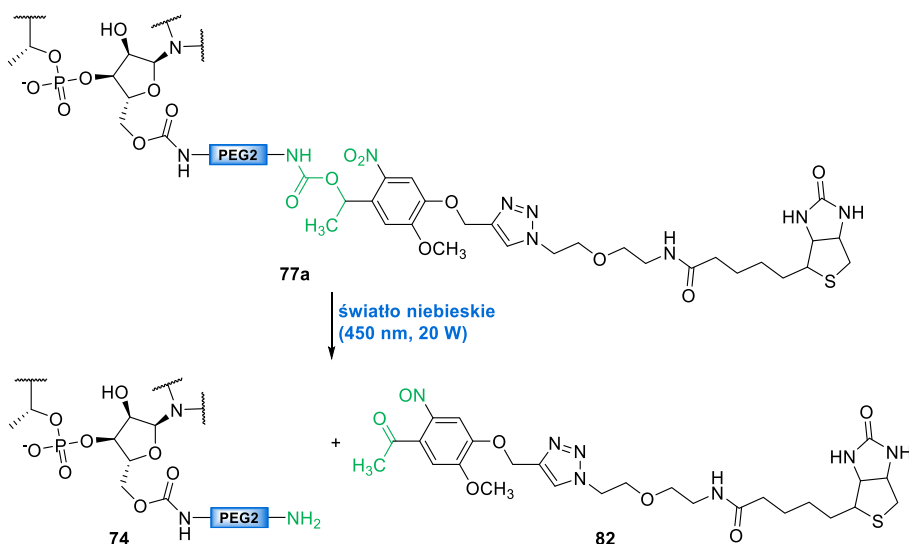
W kolejnym etapie pochodną **74** poddałam reakcji z fotorozłączalnym łącznikiem **69**, a otrzymaną cząsteczkę **75** wykorzystałam do syntezy koniugatów. Pierwsze opracowane przeze mnie podejście obejmowało możliwość reakcji z azydkami, gdzie jednym z nich była biotyna **76a**, a drugim odpowiednio zmodyfikowany oligonukleotyd **76b**. Oba przykłady wymagały zastosowania układu katalitycznego zawierającego źródło jonów miedzi(I) i ligand TBTA, z tą różnicą, że w reakcji z RNA miedź(II) redukowana była *in situ* kwasem askorbinowym. Pochodną **77a** otrzymałam z wydajnością 70%, natomiast reakcja z oligonukleotydem **76b** przebiegła z 99% konwersją prowadząc do produktu **77b**. Alternatywna droga syntezy fotolabilnych koniugatów zakładała sytuację odwrotną, w której CuAAC zachodzi pomiędzy witaminą B₁₂ zawierającą grupę azydkową a cząsteczką z terminalnym wiązaniem potrójnym. Zastosowanym przeze mnie związkiem modelowym był barwnik fluorescencyjny ATTO 590 **80c** posiadający maksimum absorpcji przy długości fali 590 nm. W pierwszej kolejności pochodną **75** poddałam reakcji z 1,11-diazydo-3,6,9-trioksaundekaniem (**78**), która dała pochodną azydkową **79** niezbędną w następczej cykloaddycji z ATTO 590 **80c**. Pochodne **79** i **81** otrzymałam z wydajnościami 83 i 82%.

Kluczowym etapem projektu było sprawdzenie, czy otrzymane koniugaty są wrażliwe na działanie światła. Badania rozpoczęłam od sprawdzenia stabilności koniugatów na świetle dziennym w czasie 24 h oraz podczas naświetlania ich światłem białym o mocy 10 W. Koniugat **77a**, stabilny na świetle dziennym (Rysunek 7, A), ulegał powolnemu rozkładowi pod wpływem światła białego (35% konwersji **77a** do produktu fotolizy **74** po 72 h) (Rysunek 7, B, Schemat 27). Uwalnianie przyłączonego uprzednio związku zachodziło wolniej pod wpływem światła zielonego (520 nm) w porównaniu do światła białego.

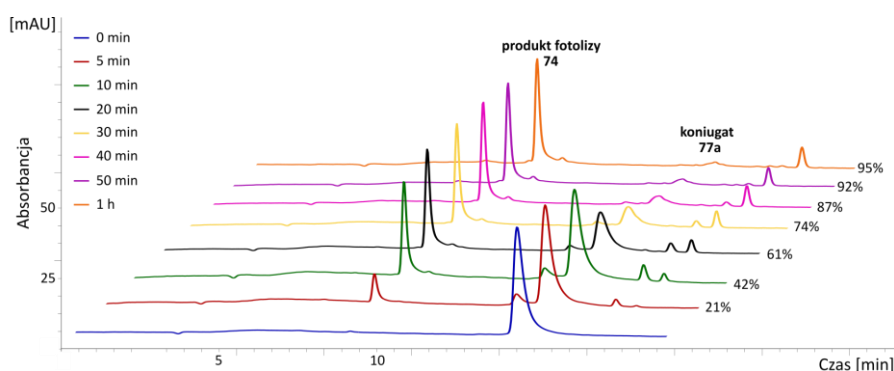


Rysunek 7. Koniugat **77a** w świetle dziennym (A) oraz naświetlany światłem białym o mocy 10 W (B).

Doskonałym rozwiązaniem okazało się użycie światła niebieskiego o długości fali 450 nm. Pochodną z biotyną **77a** poddałam działaniu światła niebieskiego o mocy 10, 20 i 40 W, analizując rozpad próbek w czasie (Rysunek 8) metodą RP-HPLC. Najbardziej optymalnymi warunkami do fotouwalniania modelowego związku (biotyny) z witaminy B₁₂ były (dla B₁₂-biotyna **77a**, 46 μM): światło niebieskie (450 nm, 20 W), 1 h, H₂O (1 mL), gdzie już po 1 h naświetlania obserwowałam 95% konwersji koniugatu **77a** do produktu fotolizy **74** (Schemat 27, Rysunek 8).

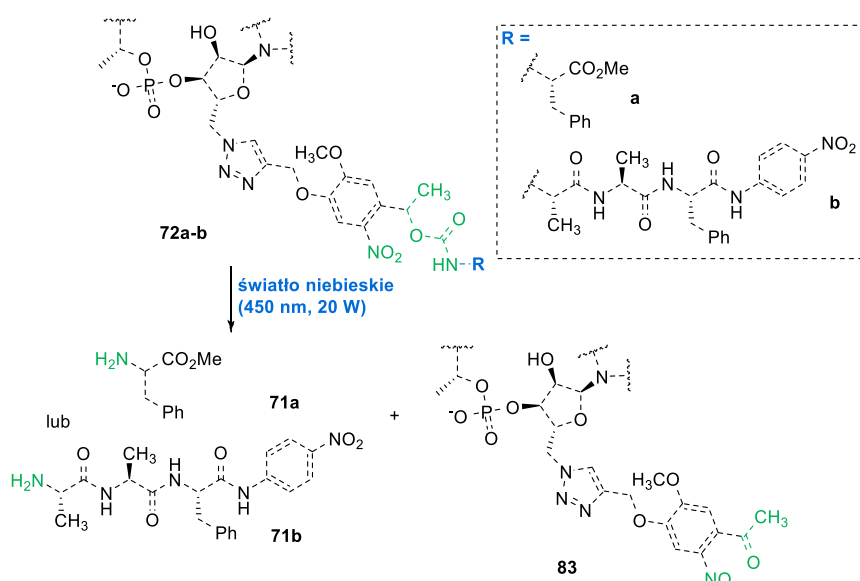


Schemat 27. Uwolnienie pochodnej biotyny **82** pod wpływem światła niebieskiego.



Rysunek 8. Kontrolowane w czasie naświetlanie koniugatu **77a** światłem niebieskim o mocy 20 W.

W optymalnych warunkach, przeprowadziłam kontrolowane światłem uwalnianie pozostałych związków z koniugatów **72a**, **72b** i **81**. Analizy LC-MS potwierdziły przewidywany rozpad koniugatów na odpowiednie pochodne kobalaminy i biologicznie czynne cząsteczki. Fotorozłączanie koniugatów **72b** i **77a** przeprowadziłam na skalę syntetyczną. Produkty fotolizy – tripeptyd Ala-Ala-Phe-*p*NA (**71b**) oraz związek **74** – wydzieliłam z wydajnościami 86 oraz 56% (ugrupowania zawierające po naświetleniu fragment fotolabilnego związku **69** ulegają dalszemu rozpadowi, co uniemożliwia ich wyizolowanie). Kluczowy jest fakt, że witamina B₁₂, połączona z fotorozłączalnym ugrupowaniem **69** poprzez wiązanie karbaminianowe, po naświetleniu zostaje w niezmięnionej formie **74** (Schemat 27). Bardziej pożądana okazała się sytuacja odwrotna, kiedy to kobalamina połączona jest z fotorozłączalnym związkiem **69** w reakcji CuAAC, ponieważ takie podejście pozwala na uwolnienie modelowych molekuł **71a** lub **71b** o pierwotnej strukturze (Schemat 28).



Schemat 28. Uwolnienie związków **71a** i **71b** pod wpływem światła niebieskiego.

Ponadto, zbadalam stabilność pochodnych **72b** i **77a** w buforach PBS o różnych pH (4.3, 7.4 oraz 8.7), w obecności glutationu oraz biologicznych nukleofili (cysteina, lizyna, seryna), co jest warunkiem koniecznym w zastosowaniach biologicznych. Wszystkie przeprowadzone eksperymenty dowiodły stabilności otrzymanych przeze mnie koniugatów w zastosowanych warunkach.

Opracowałam metodologię tworzenia koniugatów witaminy B₁₂ posiadających w strukturze fotolabilny łącznik i następczego kontrolowanego światłem uwalniania związków o znaczeniu biologicznym. Pochodne witaminy B₁₂ zmodyfikowałam w taki sposób, aby można było przyłączać do niej związki zawierające grupy aminowe, azydkowe lub terminalne wiązanie potrójne, generując tym samym szeroki zakres możliwości przeprowadzanych reakcji. Rozpad powstałych koniugatów możliwy był na świetle niebieskim (450 nm, 20 W) przy zastosowaniu łącznika 1-(5-metoksy-2-nitro-4-prop-2-ynyloksyfenylo)etylowęglanu *N*-sukcynoimidylu (**69**). Według doniesień literaturowych łącznik ten ulega rozkładowi pod wpływem promieniowania o długości fali 365 nm,^[76,77] jednak w moich badaniach w połączeniu z witaminą B₁₂ aktywny jest już na świetle niebieskim, które jest mniej energetyczne niż światło UV, a co za tym idzie – bardziej odpowiednie dla systemów biologicznych. Przeprowadzając naświetlanie przy zastosowaniu różnych wartości mocy fotoreaktora, wykazałam, że szybkość reakcji rośnie wraz z mocą diod LED, nie tracąc przy tym na selektywności. Zielone światło nie niesło fotonów o wystarczającej energii do rozszczepienia fotolabilnego łącznika **69**.

Opisana procedura syntezy fotolabilnych koniugatów witaminy B₁₂ została opublikowana w artykule:

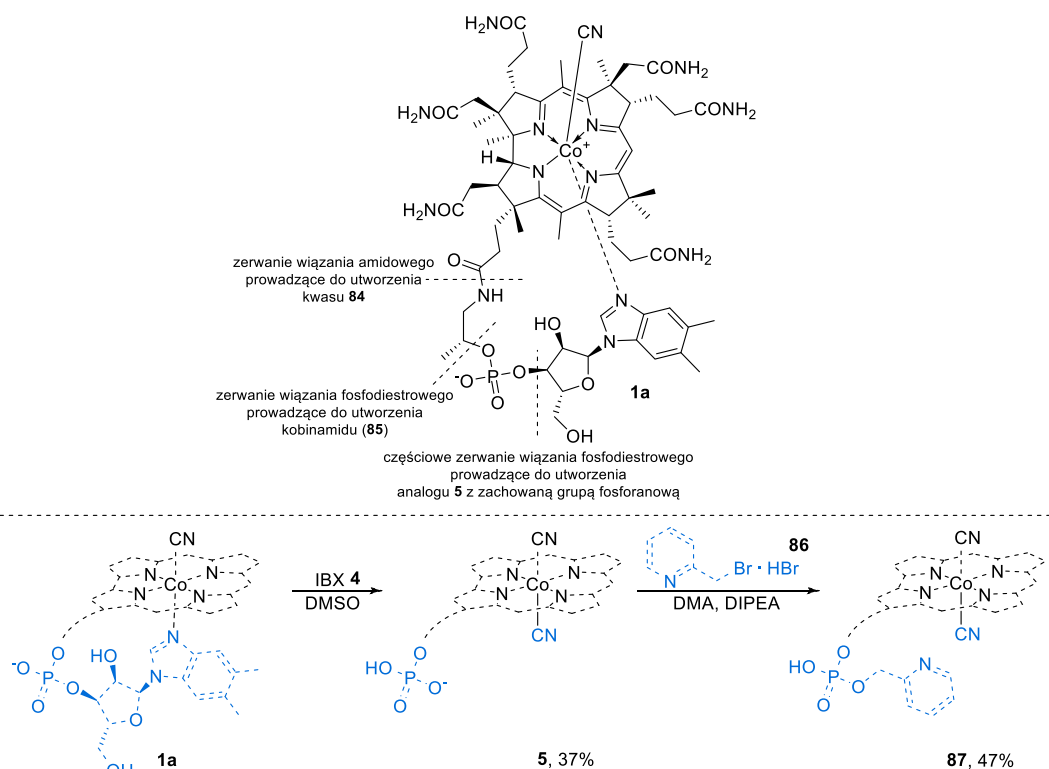
Agnieszka Jackowska, Dorota Gryko

Org. Lett. **2021**, DOI: 10.1021/acs.orglett.1c00839

Vitamin B₁₂ Derivatives Suitably Tailored for the Synthesis of Photolabile Conjugates

5.3.4 Synteza pochodnej kobinamidu (85) z zachowaną grupą fosforanową

Pozycja 5' jest niewątpliwie doskonale użytecznym miejscem w kontekście modyfikacji i funkcjonalizacji witaminy B₁₂ (**1**). Jednak znane są także formy witaminy B₁₂ pozbawione pętli nukleotydowej, zatem niezawierające pierwszorzędowej grupy hydroksylowej w pozycji R₅. Należą do nich m.in. kwas **84**^[18] oraz kobinamid (**85**),^[78] które są cennymi blokami budulcowymi syntetycznych kobalamin (Schemat 29). Warto podkreślić, że niektóre bakterie, w przeciwieństwie do ssaków, posiadają zdolność rozpoznawania tzw. niepełnych korynoidów,^[10,11] co może być wykorzystywane do selektywnego dostarczania związków do komórek prokariotycznych, także w obecności eukariotycznych. Pochodne **84** i **85** zawierają w swej strukturze niezmodyfikowane centrum koryny oraz grupy peryferyjne, jednak pozbawione są części nukleotydowej, w tym grupy fosforanowej, której potencjał w kontekście tworzenia koniugatów nie został jak dotąd dogłębnie zbadany. **Z uwagi na atrakcyjność tzw. niepełnych korynoidów postanowiłam opracować syntezę pochodnej kobalaminy niezawierającej pętli nukleotydowej, jednak z zachowaną grupą fosforanową, którą zamierzałam wykorzystać w dalszych modyfikacjach** (Schemat 29).^[79]



Schemat 29. Synteza skróconej pochodnej witaminy B₁₂ **5** z zachowaną grupą fosforanową i jej następcza reakcja z halogenkiem organicznym **86**.

Rozszczepienie wiązań P–O w estrach fosforanowych ma duże znaczenie zarówno w chemii, jak i biochemii. Pomimo opracowania licznych warunków tej reakcji, żadne z nich nie zostały wykorzystane do rozszczepienia tylko jednego wiązania fosfodiesterowego w cząsteczce witaminy B₁₂ (**1**). Na podstawie przeglądu literaturowego, fosforany dialkilo-*O*-hydroksyfenylu są rozszczepiane

przez (diacetoksy)jodobenzen (PIDA) do kwasu monoalkilofosforowego.^[80] Wiadomo również, że kwas 2-jodozylobenzoowy (IBA) był szeroko stosowany w fosforolizie aktywowanych substratów fosforoorganicznych.^[81] W celu rozszczepienia tylko jednego wiązania fosfodiastrowego P–O w cząsteczce kobalaminy (**1**) zastosowałam wyżej wymienione źródła hiperwaleńnego jodu: PIDA oraz IBA, jednak ich zastosowanie nie przyniosło oczekiwanych rezultatów. Kolejną próbą, jaką podjęłam, było przeprowadzenie selektywnej fosforolizy w obecności analogu IBA – kwasu 2-jodoksybenzoowego (IBX, **4**), który okazał się skuteczny. Stosując pięć równoważników molowych IBX, otrzymałam analog witaminy B₁₂ **5** z zachowanym ugrupowaniem fosforanowym z wydajnością 37%.^[79] Analizy NMR potwierdziły obecność atomu fosforu w cząsteczce oraz wykluczyły obecność 5,6-dimetylobenzimidazolu. Próby podwyższenia wydajności, w których zmieniałam ilość IBX oraz temperaturę prowadzenia reakcji, nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Zastosowanie suchego DMSO spowodowało spadek wydajności do 11%, wynik ten wykazał, że obecność wody ma kluczowe znaczenie w procesie rozszczepienia wiązania P–O. W reakcjach prowadzonych w NMP i CH₃CN odzyskiwałam nieprzereagowaną witaminę B₁₂ (**1**).

Z uwagi na zastosowania skróconych form witaminy B₁₂ – kwasu **84** oraz kobinamidu (**85**), do których zalicza się głównie tworzenie syntetycznych kobalaminy użytecznych m.in. jako antywitaminy^[82] – otrzymaną pochodną **5** przetestowałam pod kątem jej dalszej funkcjonalizacji. Poddałam ją następnie alkilowaniu 2-bromometylopirydyną (**86**), które zoptymalizowałam mając na uwadze rozpuszczalnik, zasadę oraz temperaturę. Optymalne warunki obejmowały zastosowanie DIPEA, temperatury 60 °C oraz DMA jako rozpuszczalnika, co pozwoliło na uzyskanie pożądanego produktu **87** z wydajnością 47%.

Na drodze selektywnego rozszczepienia tylko jednego wiązania fosfodiastrowego, opracowałam metodologię tworzenia skróconej pochodnej kobalaminy **5 pozbawionej pętli nukleotydowej, ale zawierającej ugrupowanie fosforanowe.** Fosforolizę przeprowadziłam w obecności kwasu 2-jodoksybenzoowego (**4**), a otrzymany analog **5** poddałam następnie alkilowaniu halogenkiem organicznym **86**, co potwierdziło jego rolę jako prekursora do syntezy pochodnych witaminy B₁₂ modyfikowanych w obrębie grupy fosforanowej.

Opisana procedura funkcjonalizacji została opublikowana w artykule:

Sidra Hassan, **Agnieszka Jackowska**, Dorota Gryko

J. Porphyrins Phthalocyanines **2019**, *23*, 554–560

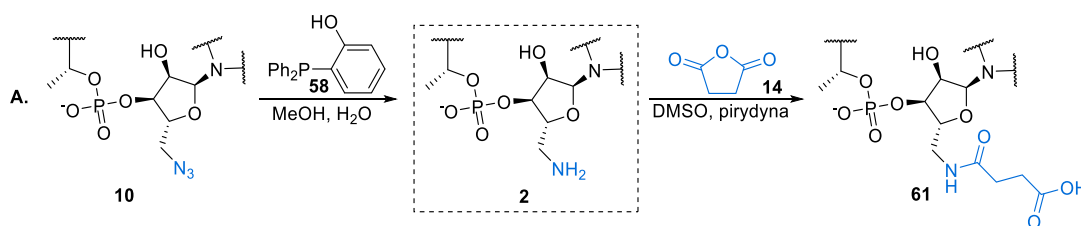
Truncated vitamin B₁₂ derivative with the phosphate group retained

5.4 Podsumowanie

Kobalamina (**1**) jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Ponadto, dzięki serii białek zaangażowanych w jej pobieranie, jest potencjalnym transporterem związków do komórek, co szczególnie wpłynęło na moje zainteresowanie tą cząsteczką. Ze względu na złożoną budowę kobalaminy, konieczne było opracowanie metodologii jej funkcjonalizacji, które mogłyby posłużyć do selektywnego tworzenia koniugatów. **Celem mojej pracy doktorskiej było zatem opracowanie syntezy pochodnych witaminy B₁₂ (**1**), posiadających w pozycji R_{5'} grupy funkcyjne odpowiednie do syntezy połączeń kobalaminy ze związkami o znaczeniu biologicznym.**

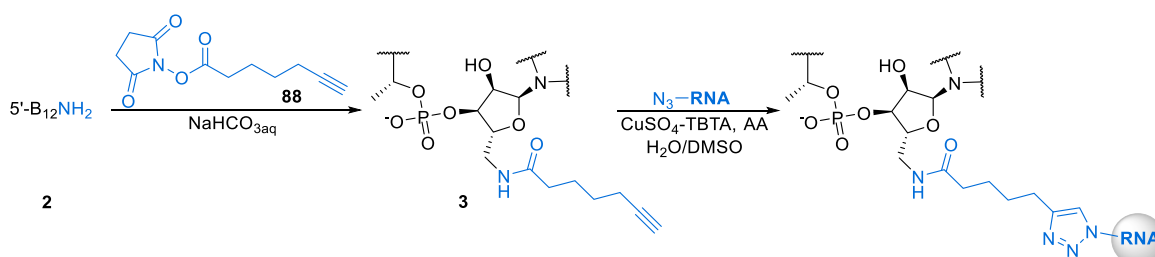
W ramach swoich badań opracowałam metodologie syntezy nowych pochodnych witaminy B₁₂ zmodyfikowanych w obrębie pętli nukleotydowej: w pozycji R_{5'} oraz na grupie fosforanowej. Zaprojektowane efektywne podejścia syntetyczne wykorzystałam do otrzymania koniugatów ze związkami o znaczeniu biologicznym, takimi jak: aminokwasy, krótkie peptydy, biotyna, barwnik fluorescencyjny ATTO 590 oraz modyfikowane oligonukleotydy RNA. Za największe osiągnięcia mojej pracy uważam:

- a) Opracowanie metody syntezy pochodnej kobalaminy **2**, zawierającą w pozycji 5' grupę aminową, która jest doskonałym partnerem w reakcjach ze związkami zawierającymi grupę karboksylową (wolną lub w formie aktywnego estru). Dodatkowo, jej reakcja z bezwodnikiem bursztynowym **14**, prowadząca do pochodnej kwasowej **61**, pozwoliła na sprzęganie z aminami (Schemat 30).



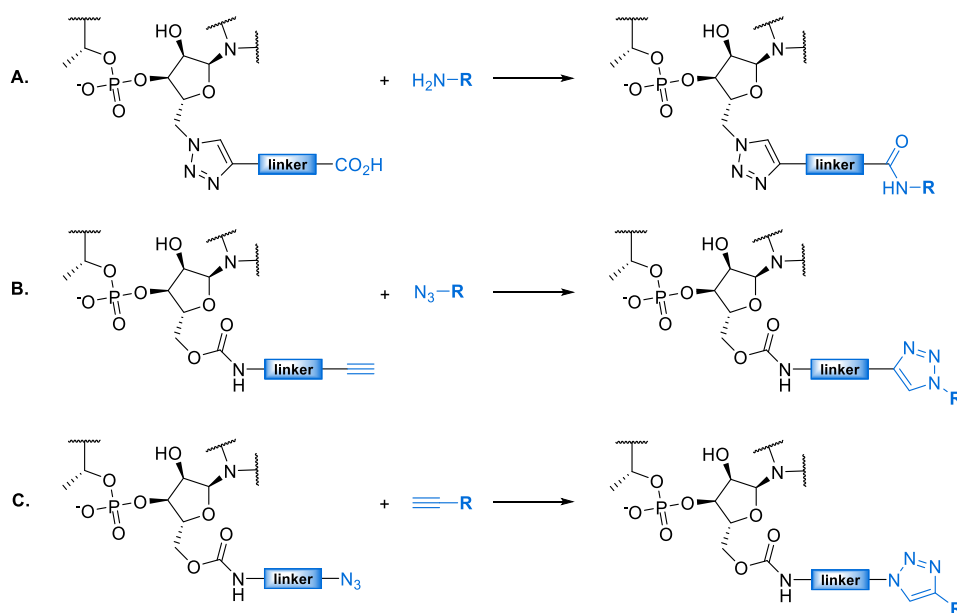
Schemat 30. Synteza pochodnych aminowej **2** i kwasowej **61**.

- b) Opracowanie metodologii syntezy biokoniugatów pochodnej **3** z odpowiednio zmodyfikowanymi oligonukleotydami (Schemat 31). Badania biologiczne przeprowadzone we współpracy z zespołem prof. Trylskiej wykazały, że otrzymane koniugaty są pobierane przez Gram-ujemne komórki bakterii, co jest pierwszym odnotowanym przykładem zastosowania witaminy B₁₂ jako transportera oligonukleotydów 2'OMeRNA do komórek prokariotycznych.



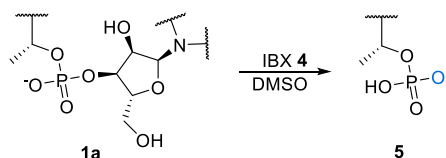
Schemat 31. Otrzymywanie witaminy B₁₂ z terminalnym wiązaniem potrójnym oraz jej wykorzystanie w tworzeniu koniugatów z RNA.

- c) Opracowanie metodologii syntez fotolabilnych koniugatów kobalaminy, w oparciu o pochodne witaminy B₁₂ zawierające grupę karboksylową (Schemat 32, **A**), terminalne wiązanie potrójne (Schemat 32, **B**) oraz azydek (Schemat 32, **C**), pozwalające na łączenia kobalaminy ze związkami o znaczeniu biologicznym posiadającymi różne grupy funkcyjne – aminową, azydkową bądź terminalne wiązanie potrójne. Otrzymane biokoniugaty ulegają kontrolowanemu rozpadowi pod wpływem światła. Zaproponowane podejście uwalniania związków z połączeń z kobalaminą może być wykorzystywane w terapiach celowanych, których korzyści obejmują: przedłużenie działania w miejscu docelowym, zmniejszenie dawkowania ogólnoustrojowego, zmniejszenie skutków ubocznych i możliwość miejscowego dostarczania wielu środków.



Schemat 32. Metodologie syntez fotolabilnych koniugatów kobalaminy (linker = fotolabilne ugrupowanie i łącznik, jeśli jest wymagany, R = związek biologicznie czynny).

- d) Opracowanie metodologii syntezy oraz funkcjonalizacji skróconej pochodnej **5** z zachowaną grupą fosforanową (Schemat 33), która może znaleźć zastosowanie w tworzeniu syntetycznych kobalamin użytecznych m.in. jako antywitaminy.



Schemat 33. Metoda syntezy skróconej pochodnej witaminy B₁₂ **5** z zachowaną grupą fosforanową.

Badania przedstawione w niniejszej rozprawie stanowią zestaw metod funkcjonalizacji witaminy B₁₂ oraz demonstrują użyteczność otrzymanych pochodnych do tworzenia połączeń ze związkami o znaczeniu biologicznym. Przeprowadzone badania po raz pierwszy dowiodły, że witamina B₁₂ może być efektywnym transporterem oligonukleotydów RNA do komórek prokariotycznych. W przyszłości, podejście to może zostać wykorzystane do transportu odpowiednio zmodyfikowanych oligonukleotydów do komórek, co może stanowić alternatywę dla coraz częściej nieskutecznych antybiotyków.

Dodatkowo, moje badania wykazały, że możliwe jest konstruowanie fotolabilnych koniugatów witaminy B₁₂, których rozkład może być ściśle kontrolowany za pomocą światła o określonej energii. Opracowane przeze mnie metodologie mogą stanowić podstawę dalszych badań w dziedzinie wykorzystania witaminy B₁₂ jako transportera leków czy znaczników fluorescencyjnych do komórek.

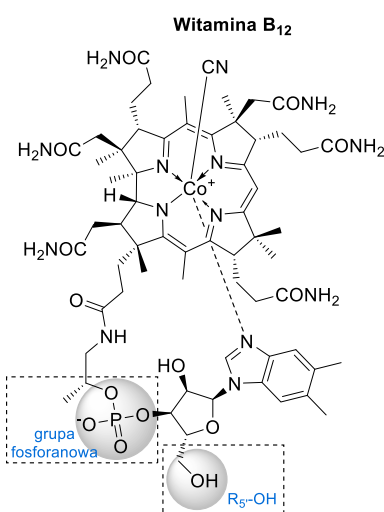
5.5 Literatura

- [1] R. Banerjee, *Chemistry and Biochemistry of B₁₂*, Wiley, **1999**.
- [2] B. Kräutler, D. Arigoni, B. T. Golding, *Vitamin B₁₂ and B₁₂-Proteins*, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, **1998**.
- [3] E. K. Sully, B. L. Geller, *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *33*, 47–55.
- [4] J. P. Hegarty, D. B. Stewart, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 1055–1065.
- [5] M. Równicki, M. Wojciechowska, A. J. Wierzba, J. Czarnecki, D. Bartosik, D. Gryko, J. Trylska, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 7644–7654.
- [6] A. J. Wierzba, K. Maximova, A. Wincenciuk, M. Równicki, M. Wojciechowska, E. Nexø, J. Trylska, D. Gryko, *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24*, 18772–18778.
- [7] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2006**, *45*, 4900–4921.
- [8] M. Sameiro, T. Goncalves, *Chem. Rev.*, **2009**, *109*, 190–212.
- [9] R. H. Newman, M. D. Fosbrink, J. Zhang, *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 3614–3666.
- [10] A. D. Lawrence, E. Nemoto-Smith, E. Deery, J. A. Baker, S. Schroeder, D. G. Brown, J. M. A. Tullet, M. J. Howard, I. R. Brown, A. G. Smith, et al., *Cell Chem. Biol.* **2018**, 1–11.
- [11] S. A. Mireku, M. Ruetz, T. Zhou, V. M. Korkhov, B. Kräutler, K. P. Locher, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 41575.
- [12] K. L. Brown, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2075–2150.
- [13] J. H. Martens, H. Barg, M. J. Warren, D. Jahn, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58*, 275–285.
- [14] K. Gruber, B. Puffer, B. Kräutler, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4346–4362.
- [15] A. Kośmider, K. Czaczyk, *ŻYWNOŚĆ. Nauka. Technologia. Jakość.* **2010**, *5*, 17–32.
- [16] R. B. Woodward, *Pure Appl. Chem.* **1968**, *17*, 519–547.
- [17] A. Eschenmoser, *Pure Appl. Chem.* **1963**, *7*, 297–316.
- [18] K. ó Proinsias, M. Giedyk, D. Gryko, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6605–6619.
- [19] M. J. Nielsen, M. R. Rasmussen, C. B. F. Andersen, E. Nexø, S. K. Moestrup, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *9*, 345–354.
- [20] Y. Gupta, D. V. Kohli, S. Jain, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* **2008**, *25*, 347–379.
- [21] A. Pettenuzzo, R. Pigot, L. Ronconi, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *2017*, 1625–1638.
- [22] A. K. Petrus, A. R. Vortherms, T. J. Fairchild, R. P. Doyle, *ChemMedChem* **2007**, *2*, 1717–1721.
- [23] A. K. Petrus, T. J. Fairchild, R. P. Doyle, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2009**, *48*, 1022–1028.
- [24] Z. L. Rodgers, T. A. Shell, A. M. Brugh, H. L. Nowotarski, M. D. E. Forbes, D. S. Lawrence, *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 1962–1969.
- [25] T. A. Shell, D. S. Lawrence, *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 2866–2874.
- [26] D. S. Wilbur, P. M. Pathare, D. K. Hamlin, S. P. Rothenberg, E. V. Quadros, *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10*, 912–920.
- [27] B.-R. Sah, R. Schibli, R. Waibel, L. von Boehmer, P. Blauenstein, E. Nexø, A. Johayem, E. Fischer, E. Muller, J. D. Soyka, et al., *J. Nucl. Med.* **2014**, *55*, 43–49.

- [28] P. M. Pathare, D. S. Wilbur, S. Heusser, E. V. Quadros, P. McLoughlin, A. C. Morgan, *Bioconjug. Chem.* **1996**, *7*, 217–232.
- [29] A. J. Wierzba, S. Hassan, D. Gryko, *Asian J. Org. Chem.* **2019**, *8*, 6–24.
- [30] T. Toraya, K. Ohashi, H. Ueno, S. Fukui, *Bioinorg. Chem.* **1975**, *4*, 245–255.
- [31] A. D. Habberfield, O. B. Kinstler, C. G. Pitt, *US Patent*, US005574018A, **1996**.
- [32] X. Wang, L. Wei, L. P. Kotra, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 1780–1787.
- [33] P. Siega, J. Wuerges, F. Arena, E. Gianolio, S. N. Fedosov, R. Dreos, S. Geremia, S. Aime, L. Randaccio, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7980–7989.
- [34] R. B. Hannak, S. Gschösser, K. Wurst, B. Kräutler, *Monatsh. Chem.* **2007**, *138*, 899–907.
- [35] K. Zelenka, H. Brandl, B. Spingler, F. Zelder, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 9665–9667.
- [36] A. Verma, S. Sharma, P. K. Gupta, A. Singh, B. V. Teja, P. Dwivedi, G. K. Gupta, R. Trivedi, P. R. Mishra, *Acta Biomaterialia* **2016**, *31*, 288–300.
- [37] S. Clardy-James, J. Bernstein, D. Kerwood, R. Doyle, *Synlett* **2012**, *23*, 2363–2366.
- [38] K. E. Henry, C. T. Elfers, R. M. Burke, O. G. Chepurny, G. G. Holz, J. E. Blevins, C. L. Roth, R. P. Doyle, *Endocrinology* **2015**, *156*, 1739–1749.
- [39] R. L. Bonaccorso, O. G. Chepurny, C. Becker-Pauly, G. G. Holz, R. P. Doyle, *Mol. Pharmaceutics* **2015**, *12*, 3502–3506.
- [40] J. F. McEwan, H. S. Veitch, G. J. Russell-Jones, *Bioconjug. Chem.* **1999**, *10*, 1131–1136.
- [41] R. A. Horton, J. D. Bagnato, C. B. Grissom, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7108–7111.
- [42] O. F. Ikotun, B. V. Marquez, C. H. Fazen, A. R. Kahkoska, R. P. Doyle, S. E. Lapi, *ChemMedChem* **2014**, *9*, 1244–1251.
- [43] J. M. McGreevy, M. J. Cannon, C. B. Grissom, *Journal of Surgical Research* **2003**, *111*, 38–44.
- [44] S. N. Fedosov, C. B. Grissom, N. U. Fedosova, S. K. Moestrup, E. Nexø, T. E. Petersen, *FEBS J.* **2006**, *273*, 4742–4753.
- [45] M. Lee, C. B. Grissom, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2499–2502.
- [46] N. Viola-Villegas, A. E. Rabideau, M. Bartholoma, J. Zubieta, R. P. Doyle, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 5253–5261.
- [47] A. R. Vortherms, A. R. Kahkoska, A. E. Rabideau, J. Zubieta, L. L. Andersen, M. Madsen, R. P. Doyle, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 9792–9794.
- [48] N. J. Omid, N. Babanejad, H. Amini, M. Amini, M. R. Tehrani, F. Dorkoosh, *J Polym Res* **2014**, *21*, 510–525.
- [49] S. Clardy-James, D. G. Allis, T. J. Fairchild, R. P. Doyle, *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 1054–1058.
- [50] K. B. Chalasani, G. J. Russell-Jones, S. K. Yandrapu, P. V. Diwan, S. K. Jain, *Journal of Controlled Release* **2007**, *117*, 421–429.
- [51] M. E. Annunziato, U. S. Patel, M. Ranade, P. S. Palumbo, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 212–218.
- [52] M. Chromiński, D. Gryko, *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19*, 5141–5148.
- [53] A. J. Wierzba, M. Wojciechowska, J. Trylska, D. Gryko, *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 189–197.
- [54] C. H. Fazen, D. Valentin, T. J. Fairchild, R. P. Doyle, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8707–8711.

- [55] A. N. W. Kuda-Wedagedara, J. L. Workinger, E. Nexø, R. P. Doyle, N. Viola-Villegas, *ACS Omega* **2017**, *2*, 6314–6320.
- [56] A. Jackowska, M. Chromiński, M. Giedyk, D. Gryko, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 936–943.
- [57] Y. G. Gololobov, I. N. Zhmurova, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 437–472.
- [58] M. Giedyk, A. Jackowska, M. Równicki, M. Kolanowska, J. Trylska, D. Gryko, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 763–766.
- [59] B. Luan, R. Carr, M. Caffrey, A. Aksimentiev, *Proteins* **2010**, *78*, 1153–1162.
- [60] K. J. James, M. A. Hancock, J. N. Gagnon, J. W. Coulton, *Biochemistry* **2009**, *48*, 9212–9220.
- [61] E. L. Borths, B. Poolman, R. N. Hvorup, K. P. Locher, D. C. Rees, *Biochemistry* **2005**, *44*, 16301–16309.
- [62] C. R. Rioux, R. J. Kadner, *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 2986–2993.
- [63] B. D. Davis, *Proc. N. A. S.* **1949**, *35*, 1–10.
- [64] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*. Academic Press. USA, **2008**.
- [65] G. J. Russell-Jones, S. W. Westwood, A. D. Habberfield, *Bioconjugate Chem.*, **1995**, *6*, 459–465.
- [66] B. König *Chemical Photocatalysis*. Walter de Gruyter. Berlin/Boston, **2013**.
- [67] K. Glusac, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 734–735.
- [68] J. Li, H. Kong, C. Zhu, Y. Zhang, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 3390–3396.
- [69] J. P. Holland, M. Gut, S. Klingler, R. Fay, A. Guillou, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 1–18.
- [70] M. Ruetz, C. Gherasim, K. Gruber, S. Fedosov, R. Banerjee, B. Kräutler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2606–2610.
- [71] T. A. Shell, J. R. Shell, Z. L. Rodgers, D. S. Lawrence, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1–5.
- [72] W. J. Smith, N. P. Oien, R. M. Hughes, C. M. Marvin, Z. L. Rodgers, J. Lee, D. S. Lawrence, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10945–10948.
- [73] B. M. Vickerman, C. P. O'Banion, X. Tan, D. S. Lawrence, *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 93–103.
- [74] A. Jackowska, Dorota Gryko, *Org. Lett.* **2021**, DOI: 10.1021/acs.orglett.1c00839.
- [75] H. Mizuta, S. Watanabe, Y. Sakurai, K. Nishiyama, T. Furuta, Y. Kobayashi, M. Iwamura, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 675–683.
- [76] S. Kaneko, H. Nakayama, Y. Yoshino, D. Fushimi, K. Yamaguchi, Y. Horiike, J. Nakanishi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 4051–4059.
- [77] S. V. Wegner, O. I. Sentürk, J. P. Spatz, *Sci. Rep.* **2016**, *5*, 18309–18315.
- [78] K. ó Proinsias, M. Karczewski, A. Zieleniewska, D. Gryko, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 7752–7757.
- [79] S. Hassan, A. Jackowska, D. Gryko, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2019**, *23*, 554–560.
- [80] P. L. Wu, J. H. Chen, D. S. Huand, *J. Chin. Chem. Soc.* **1999**, *46*, 967–970.
- [81] H. Morales-Rojas, R. A. Moss, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2497–2521.
- [82] B. Kräutler, *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21*, 11280–11287.

6. Streszczenie w języku polskim



Witamina B₁₂ (kobalamina) jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych – bierze udział w produkcji erytrocytów oraz pełni rolę kofaktora wielu reakcji enzymatycznych. Jest ona mikroelementem egzogennym, stąd zarówno komórki eukariotyczne, jak i prokariotyczne wykształciły zdolność transportowania kobalaminy za pośrednictwem złożonego systemu odpowiednich białek transportujących. Fakt ten czyni witaminę B₁₂ atrakcyjnym kandydatem do wprowadzania związków biologicznie czynnych do komórek. Z chemicznego punktu widzenia, jest ona wysoce sfunkcjonalizowanym związkiem tetrapirolowym, co w znacznym

stopniu utrudnia jej selektywne modyfikacje prowadzące do odpowiednio sfunkcjonalizowanych bloków budulcowych. Te z kolei niezbędne są do tworzenia połączeń witaminy B₁₂ z terapeutykami.

Celem moich badań była synteza nowych pochodnych kobalaminy umożliwiających przyłączanie do niej związków w pozycji R₅ oraz opracowanie metod syntezy koniugatów ze związkami o znaczeniu biologicznym, takimi jak aminokwasy, barwniki fluorescencyjne oraz zasługujące na szczególne wyróżnienie – odpowiednio zmodyfikowane oligonukleotydy.

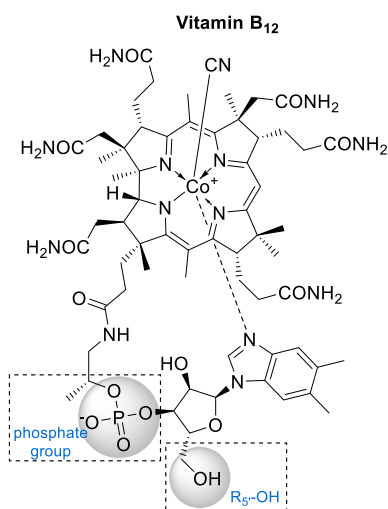
W pierwszym etapie badań opracowałam syntezę pochodnej kobalaminy, posiadającej w pozycji R₅ grupę NH₂ oraz – po funkcjonalizacji z bezwodnikiem bursztynowym – pochodną reaktywną względem grup aminowych. Otrzymane pochodne poddałam następczej reakcji łączenia z odpowiednimi partnerami. Kolejno, jedną z nich wykorzystałam do opracowania metodologii tworzenia koniugatów z zaprojektowanymi sekwencjami 2'OMeRNA w reakcji CuAAC. Otrzymane połączenia zostały wprowadzone do komórek prokariotycznych, co było pierwszym doniesieniem na temat wykorzystania witaminy B₁₂ jako nośnika tych złożonych związków do komórek bakterii.

W kolejnym etapie badań opracowałam metodologie syntez fotolabilnych koniugatów kobalaminy, pozwalających na połączenia witaminy B₁₂ z bioaktywnymi molekułami charakteryzującymi się różnorodnością pod względem grup funkcyjnych. Następnie, udowodniłam, że otrzymane koniugaty uwalniają transportowane związki pod wpływem światła.

Dodatkowo, opracowałam metodę syntezy oraz funkcjonalizacji skróconej pochodnej witaminy B₁₂ z zachowaną grupą fosforanową, która może być potencjalnie wykorzystywana do tworzenia syntetycznych kobalaminy użytecznych m.in. jako antywitaminy.

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że witamina B₁₂ może być efektywnym transporterem modyfikowanych oligonukleotydów do komórek bakterii, a zaproponowane podejście kontrolowanego uwalniania na świetle może mieć duży potencjał w zastosowaniach biomedycznych.

7. Streszczenie w języku angielskim/Abstract in English



Vitamin B₁₂ (cobalamin) is essential for proper functioning of living organisms – it plays a role of a cofactor for different enzymatic reactions. Due to the fact, that it is an exogenous microelement, cobalamin reaches mammalian and bacterial cells via a complex system of transport proteins. For that reason vitamin B₁₂ is an attractive candidate for the delivery of cargoes into cells. From a chemical point of view, cobalamin is a highly functionalized tetrapyrrole compound, what makes its selective transformations very challenging. Selective modifications, leading to suitably functionalized building blocks, are necessary for the formation of vitamin B₁₂-therapeutic conjugates.

The goal of my doctoral thesis was the design and synthesis of new derivatives of cobalamin allowing for the preparation of vitamin B₁₂ conjugates with cargoes at the R₅ position. The obtained derivatives were used for the preparation of conjugates with biologically active compounds, such as amino acids, fluorescent dyes, and specifically modified oligonucleotides.

At the first stage of my research, I have developed the synthesis of vitamin B₁₂ amine reactive towards carboxylic acids and – after functionalization with succinic anhydride – towards amines. Subsequently, the obtained derivatives were conjugated with appropriate partners. One of them, was the specifically designed sequence of 2'OMeRNA, which was coupled to cobalamin derivative via copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition. Biological investigations (conducted in prof. Trylska laboratory) have proven that vitamin B₁₂-2'OMeRNA conjugates are indeed transported into prokaryotic cells, which was the first report on the use of vitamin B₁₂ as a carrier of these complex compounds into bacterial cells.

Another part of my research focused on the development of methodologies leading to photolabile conjugates of cobalamin with bioactive molecules. Then, under light irradiation, the photocontrolled release of biologically active compounds indeed occurred.

Furthermore, I have also developed a method for the synthesis and functionalization of the truncated vitamin B₁₂ derivative with the phosphate group retained, which can be used to prepare synthetic cobalamins useful as antivitamins.

My studies demonstrate that vitamin B₁₂ can act as an efficient carrier for modified oligonucleotides into bacterial cells, and the developed approach of photocontrolled release has huge potential in biomedical applications.

8. Publikacje oryginalne

1. **Agnieszka Jackowska**, Mikołaj Chromiński, Maciej Giedyk, Dorota Gryko
Org. Biomol. Chem. **2018**, *16*, 936–943
5'-Vitamin B₁₂ derivatives suitable for bioconjugation via the amide bond
2. Maciej Giedyk, **Agnieszka Jackowska**, Marcin Równicki, Monika Kolanowska, Joanna Trylska, Dorota Gryko
Chem. Commun. **2019**, *55*, 763–766
Vitamin B₁₂ transports modified RNA into E. coli and S. Typhimurium cells
3. **Agnieszka Jackowska**, Dorota Gryko
Org. Lett. **2021**, DOI: 10.1021/acs.orglett.1c00839
Vitamin B₁₂ Derivatives Suitably Tailored for the Synthesis of Photolabile Conjugates
4. Sidra Hassan, **Agnieszka Jackowska**, Dorota Gryko
J. Porphyrins Phthalocyanines **2019**, *23*, 554–560
Truncated vitamin B₁₂ derivative with the phosphate group retained



Cite this: DOI: 10.1039/c7ob02898a

5'-Vitamin B₁₂ derivatives suitable for bioconjugation via the amide bond†

A. Jackowska, M. Chromiński, M. Giedyk* and D. Gryko *

Vitamin B₁₂ is an attractive candidate for a drug or an imaging-agent carrier into cells, due to its dietary uptake and well established transport through glycoproteins. Utilization of this system requires an appropriate functionalization of vitamin B₁₂ that both allows for the conjugation of therapeutics and does not interrupt its recognition by transport proteins. Modifications at the 5'-position on the ribose moiety are among a few approaches which meet the criteria. In this article we present vitamin B₁₂ derivatives bearing either the amino or the carboxylic group at the 5'-position. The presence of these functional groups enables conjugation of biologically important molecules to vitamin B₁₂ via the amide bond. The established method is not only limited to organic media but also works in an aqueous environment, giving the desired products in very good yields.

Received 23rd November 2017,
Accepted 8th January 2018

DOI: 10.1039/c7ob02898a

rsc.li/obc

Introduction

Vitamin B₁₂ (cobalamin, **1**, Fig. 1) belongs to a group of eight B vitamins and it has a key role in biological processes, including DNA synthesis and regulation, nervous system functioning, red blood cell formation, *etc.*¹ In the form of methyl- and adenosyl-cobalamin, it is a cofactor in a number of enzymatic reactions such as methylation, isomerization, or dehalogenation.²

Mammals do not produce vitamin B₁₂ (**1**) and as a result they have adapted to dietary uptake of this compound through

a system of specific transport proteins: intrinsic factor (IF), haptocorrin (HC), and transcobalamin II (TCII).^{1b,3} The well-established delivery pathway makes vitamin B₁₂ (**1**) an attractive candidate for a drug or an imaging-agent carrier into cells,^{3a,e,4} but this requires a proper functionalization of its structure. Importantly, a modified compound should not only allow for a selective coupling with biologically active compounds but also maintain high affinity to all three transport proteins. Previous reports showed that conjugations at certain positions significantly alter binding properties, and only functionalizations at the *b*, *e*, and 5' positions as well as at the central Co atom are allowed.^{3a,f,4a,5}

Modifications at the *b* and *e* sites rely on the partial hydrolysis of primary amide groups and as such, they suffer from low selectivity and yield.^{3f,5} On the other hand, functionalization at the cobalt centre can be achieved by its reduction to nucleophilic Co(I) species followed by their reaction with electrophiles *e.g.* alkyl halides, anhydrides *etc.*⁶ However, such conjugates usually tend to be extremely light sensitive. The stability of the complexes increases remarkably when the cobalt centre is bound to the sp hybridized carbon atom.⁷ Using this approach, which requires strictly anhydrous and anaerobic conditions, Kräutler *et al.* prepared stable phenylacetylde cobalamins.^{7a} We have demonstrated that the reduction step can be avoided if vitamin B₁₂ is reacted with phenylacetylene in the presence of CuOAc and DBU.^{7b}

An alternative route involves selective modifications of vitamin B₁₂ (**1**) at the 5' position but only a limited number of procedures are available. Direct transformation of the 5'-OH group into esters by reacting with succinyl anhydrides was used for the synthesis of a number of cobalamin-protein conjugates (granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), erythro-

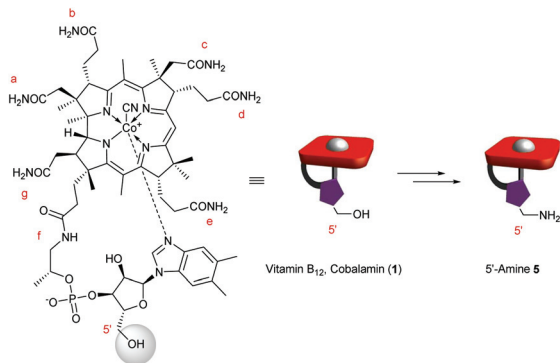


Fig. 1 Structure of vitamin B₁₂ (**1**) with the 5'-OH position highlighted.

Institute of Organic Chemistry Polish Academy of Sciences, Kasprzaka 44/52,
01-224 Warsaw, Poland. E-mail: dorota.gryko@icho.edu.pl

† Electronic supplementary information (ESI) available: ¹H and ¹³C NMR spectra, HPLC chromatograms, and optimization of the reaction conditions for the synthesis of compounds **7b**, **8** and **11a**. See DOI: 10.1039/c7ob02898a

Supporting Information
for

5'- Vitamin B₁₂ derivatives suitable for bioconjugation
via the amide bond

Agnieszka Jackowska,^a Mikołaj Chromiński,^a Maciej Giedyk^{a*} and Dorota Gryko^{a*}

^aInstitute of Organic Chemistry Polish Academy of Sciences, Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw

Table of contents

1. Optimization of the synthesis of amide 7b with coupling reagent.....	3
2. Optimization of the synthesis of acid 8	3
3. Optimization of the synthesis of amide 11a via active ester step.....	4
4. HPLC chromatograms.....	4
5. ¹ H NMR (500 MHz) and ¹³ C NMR (126 MHz) of compound 5 in CD ₃ OD.....	7
6. ¹ H NMR (500 MHz) and ¹³ C NMR (126 MHz) of compound 7a in CD ₃ OD.....	9
7. ¹ H NMR (500 MHz) and ¹³ C NMR (126 MHz) of compound 7b in CD ₃ OD.....	11
8. ¹ H NMR (500 MHz) and ¹³ C NMR (126 MHz) of compound 7c in CD ₃ OD.....	13
9. ¹ H NMR (500 MHz) and ¹³ C NMR (126 MHz) of compound 7a (in physiological conditions) in CD ₃ OD.....	15
10. ¹ H NMR (500 MHz) and ¹³ C NMR (126 MHz) of compound 7b (with coupling reagent) in CD ₃ OD.....	17
11. ¹ H NMR (500 MHz) and ¹³ C NMR (126 MHz) of compound 7d (with coupling reagent) in CD ₃ OD.....	19
12. ¹ H NMR (500 MHz) and ¹³ C NMR (126 MHz) of compound 8 in CD ₃ OD.....	21
13. ¹ H NMR (500 MHz) and ¹³ C NMR (126 MHz) of compound 11a (via active ester step) in CD ₃ OD.....	23
14. ¹ H NMR (500 MHz) and ¹³ C NMR (126 MHz) of compound 11a in CD ₃ OD.....	25
15. ¹ H NMR (500 MHz) and ¹³ C NMR (126 MHz) of compound 11b in CD ₃ OD.....	27
16. ¹ H NMR (500 MHz) and ¹³ C NMR (126 MHz) of compound 11c in CD ₃ OD.....	29

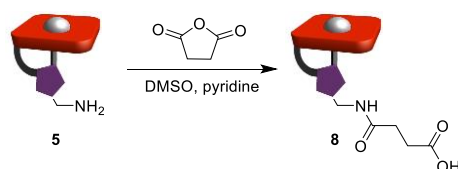
1. Optimization of the synthesis of amide **7b** with coupling reagent^a



Entry	Coupling agent	Solvents	Base	Yield [%] ^b
1	DCC	DMF/H ₂ O (1:1)	DIPEA	14
2	EDC	DMF/H ₂ O (1:1)	DIPEA	0
3	HBTU, HOBt	DMF/H ₂ O (1:1)	DIPEA	26
4	HBTU, HOBt	DMSO/H ₂ O (1:1)	DIPEA	31
5	HBTU, HOBt	DMF/H ₂ O/dioxane (2:1:2)	DIPEA	57
6	HBTU, HOBt	DMSO/H ₂ O/dioxane (2:1:2)	DIPEA	70
7	HBTU, HOBt	DMF/H ₂ O/DMSO (2:1:2)	DIPEA	82
8	HBTU, HOBt	DMF/H₂O/DMSO (2:1:2)	DMAP	85
9	HBTU, HOBt	DMF/H ₂ O/DMSO (2:1:2)	Et ₃ N	70
10 ^c	HBTU, HOBt	DMF/H ₂ O/DMSO (2:1:2)	DMAP	88

^aGeneral conditions: amine **5** (15 mg, 10 μmol), *N*-Boc-Gly-OH (9 mg, 51 μmol), DCC (11 mg, 51 μmol), EDC (10 mg, 51 μmol), HBTU (19 mg, 51 μmol), HOBt (7 mg, 51 μmol), DIPEA (9 μL, 51 μmol), DMAP (6 mg, 51 μmol), Et₃N (7 μL, 51 μmol), total volume of solvents was 1.5 mL (v/v/v), r.t., 4 h; ^bIsolated yield; ^cReaction performed with 102 μmol of *N*-Boc-Gly-OH, HBTU, HOBt and DMAP.

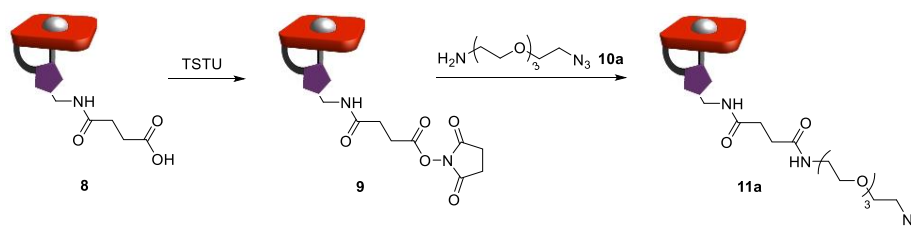
2. Optimization of the synthesis of acid **8**^a



Entry	Succinic anhydride [equiv.]	Pyridine [equiv.]	Temperature [°C]	Time [h]	Yield [%] ^b
1	5	5	r.t.	5	67
2	5	5	r.t.	17	91
3	10	10	r.t.	5	87
4	10	10	r.t.	17	96
5	5	5	40	5	81
6	5	5	40	17	96
7	10	10	40	5	96
8	10	10	40	17	96

^aGeneral conditions: amine **5** (5 mg, 3 μmol), DMSO (5 mL); ^bYield estimated based on HPLC analysis.

3. Optimization of the synthesis of amide **11a** via active ester step^a



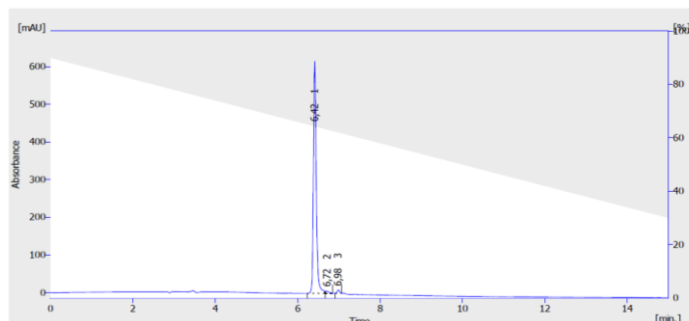
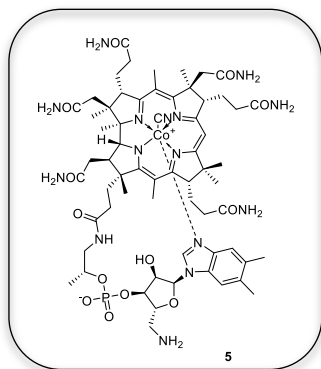
Entry	TSTU [equiv.]	DIPEA [equiv.]	Solvents	Yield [%] ^b
1	2.0	2.0	DMF/H ₂ O/dioxane (2:1:2)	16
2	4.0	4.0	DMF/H ₂ O/dioxane (2:1:2)	30
3	8.0	8.0	DMF/H₂O/dioxane (2:1:2)	54
4	20.0	20.0	DMF/H ₂ O/dioxane (2:1:2)	traces
5	8.0	8.0	DMF/H ₂ O (2:1)	43
6	8.0	8.0	DMF/0.1 M NaHCO ₃ /dioxane (2:1:2)	15
7 ^c	8.0	8.0	DMF/0.1 M NaHCO ₃ /dioxane (2:1:2)	9
8	8.0	8.0	MeCN/H ₂ O/dioxane (2:1:2)	41
9	8.0	8.0	NMP/H ₂ O/dioxane (2:1:2)	22

^aGeneral conditions: acid **8** (15 mg, 10 μmol), total volume of solvents was 1.5 mL (v/v/v), r.t., 20 h, amine **10a** (4.0 μL, 20 μmol), r.t., 75 min; ^bIsolated yield; ^cWithout DIPEA.

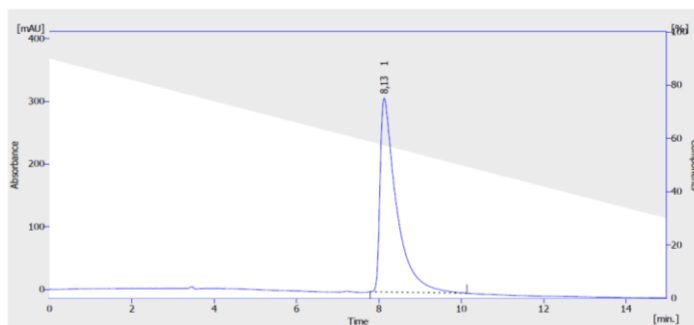
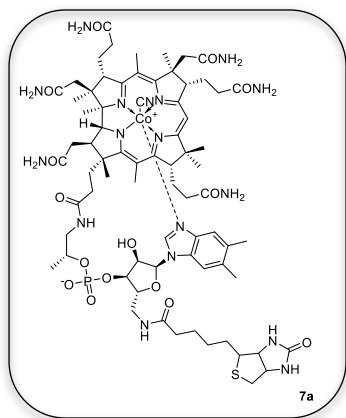
4. HPLC chromatograms

HPLC Method

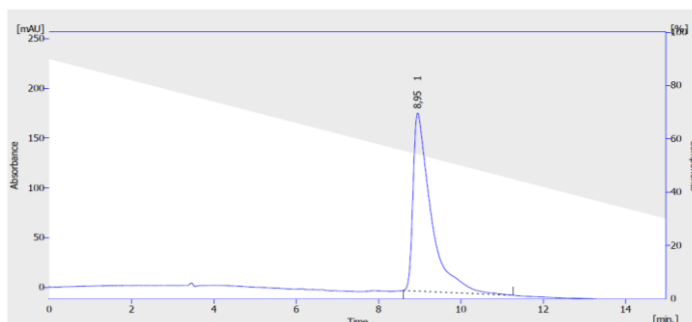
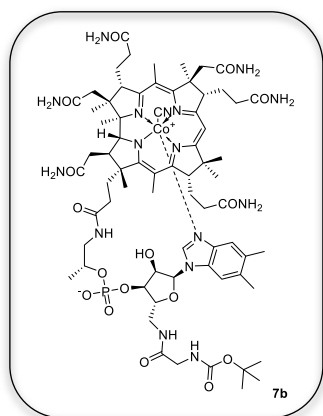
Time [min]	H ₂ O + 0.5% TFA [%]	MeCN [%]	λ [nm]
Initial	90	10	361
15	30	70	



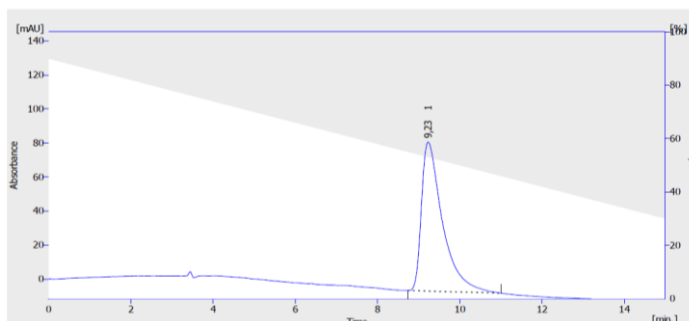
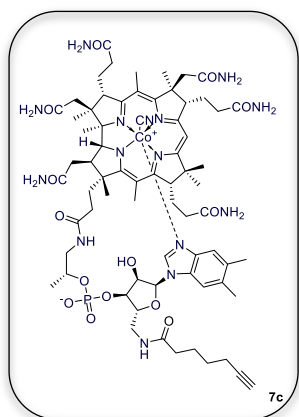
Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	6,417	293,116	615,739	97,5	0,06	748
2	6,717	37,950	6,176	1,3	0,10	980
3	6,963	35,703	9,028	1,2	1,4	934
Total		3004,768	630,943	100,0		



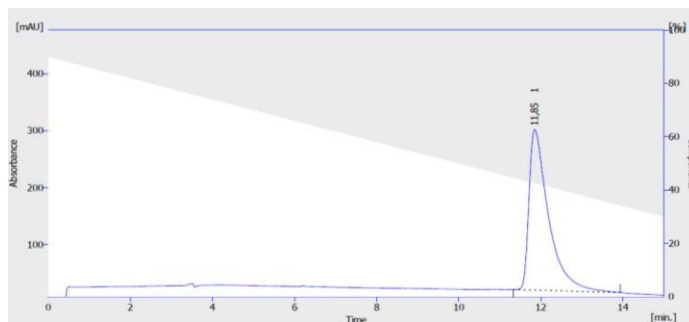
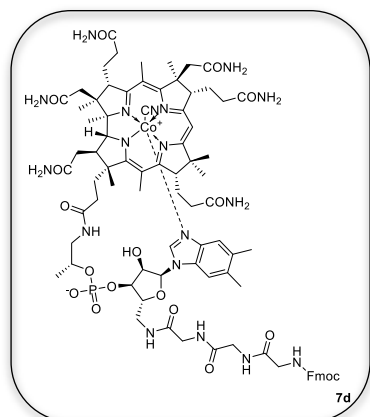
Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity	
1	0,133	8531,444	306,029	100,0	300,0	0,38	628
Total		8531,444	306,029	100,0	300,0		



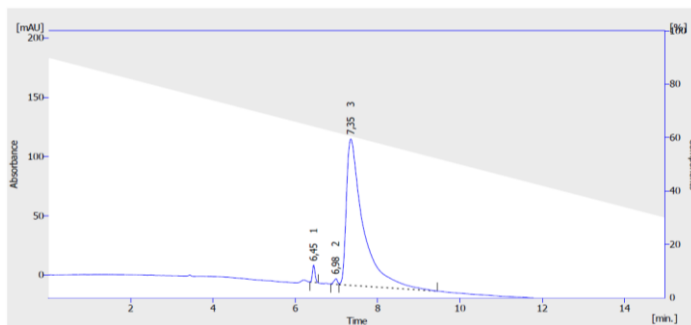
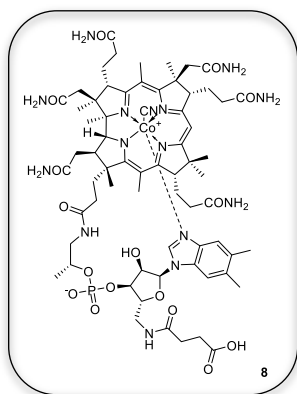
Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity	
1	0,990	5427,793	179,252	100,0	100,0	0,43	702
Total		5427,793	179,252	100,0	100,0		



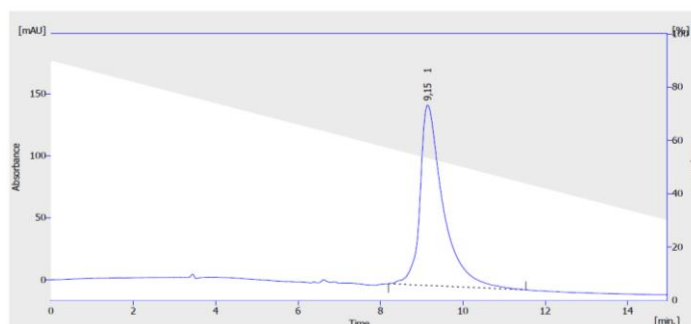
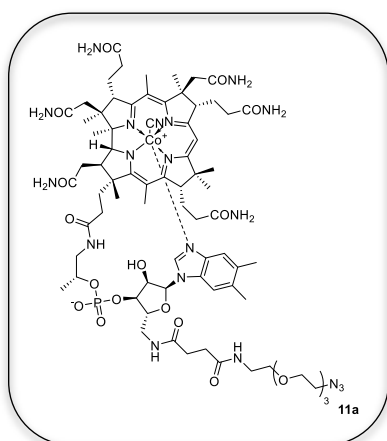
Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity	
1	0,233	3110,164	87,543	100,0	100,0	0,53	709
Total		3110,164	87,543	100,0	100,0		



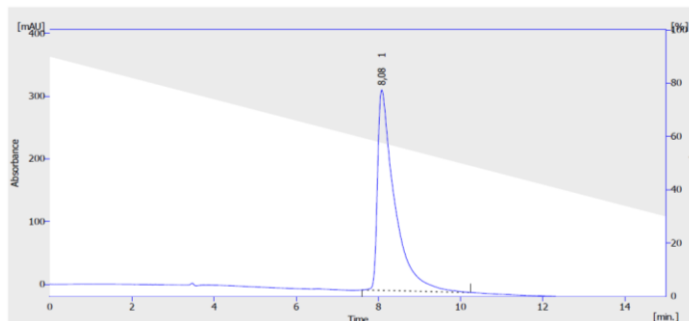
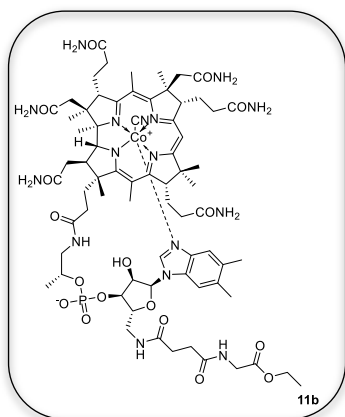
Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity	
1	11,850	9307,431	281,781	100,0	100,0	0,48	552
Total		9307,431	281,781	100,0	100,0		



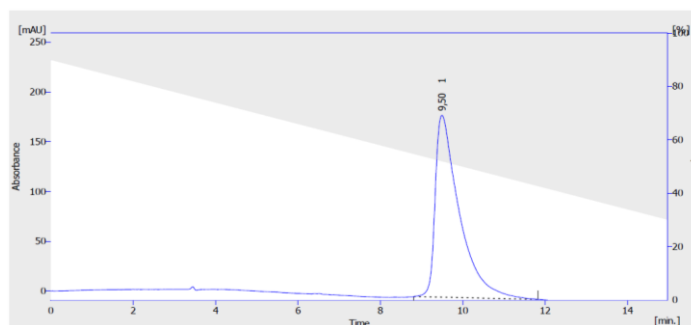
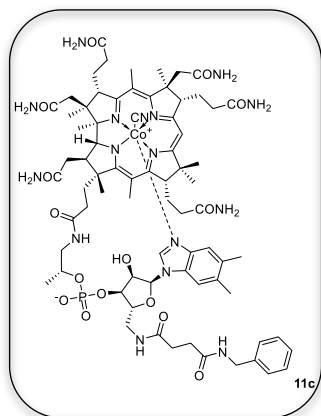
Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	WOS [min]	PDA Peak Purity
1	64,509	14,586	1,8	30,2	0,06	929
2	27,948	4,719	0,8	3,3	0,12	974
3	3505,415	123,476	97,4	86,5	0,38	744
Total	3597,772	142,779	100,0	100,0		



Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	WOS [min]	PDA Peak Purity
1	5667,932	145,556	100,0	100,0	0,53	688
Total	5667,932	145,556	100,0	100,0		

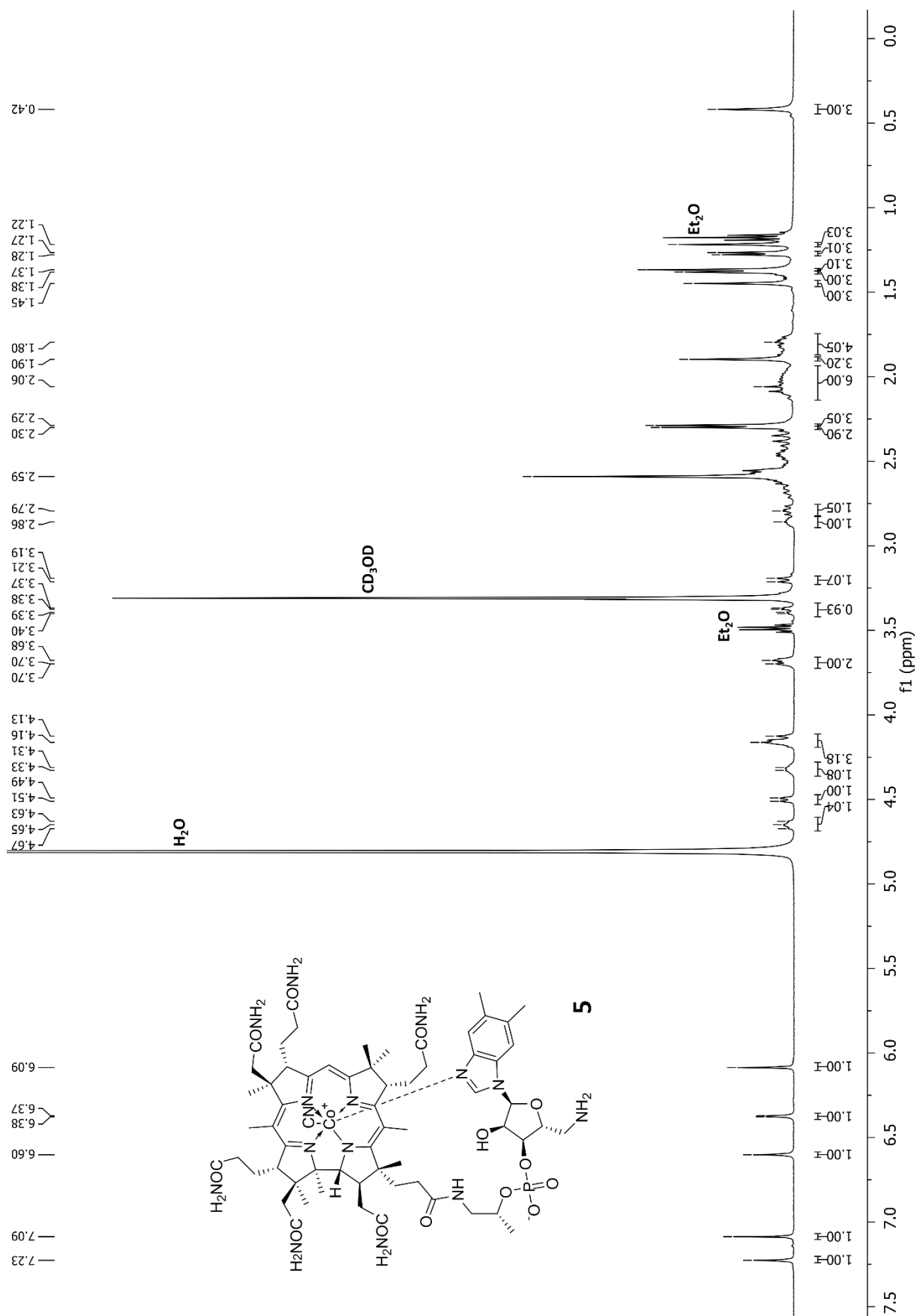


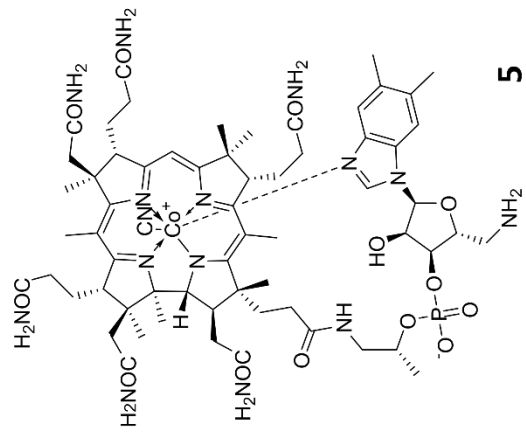
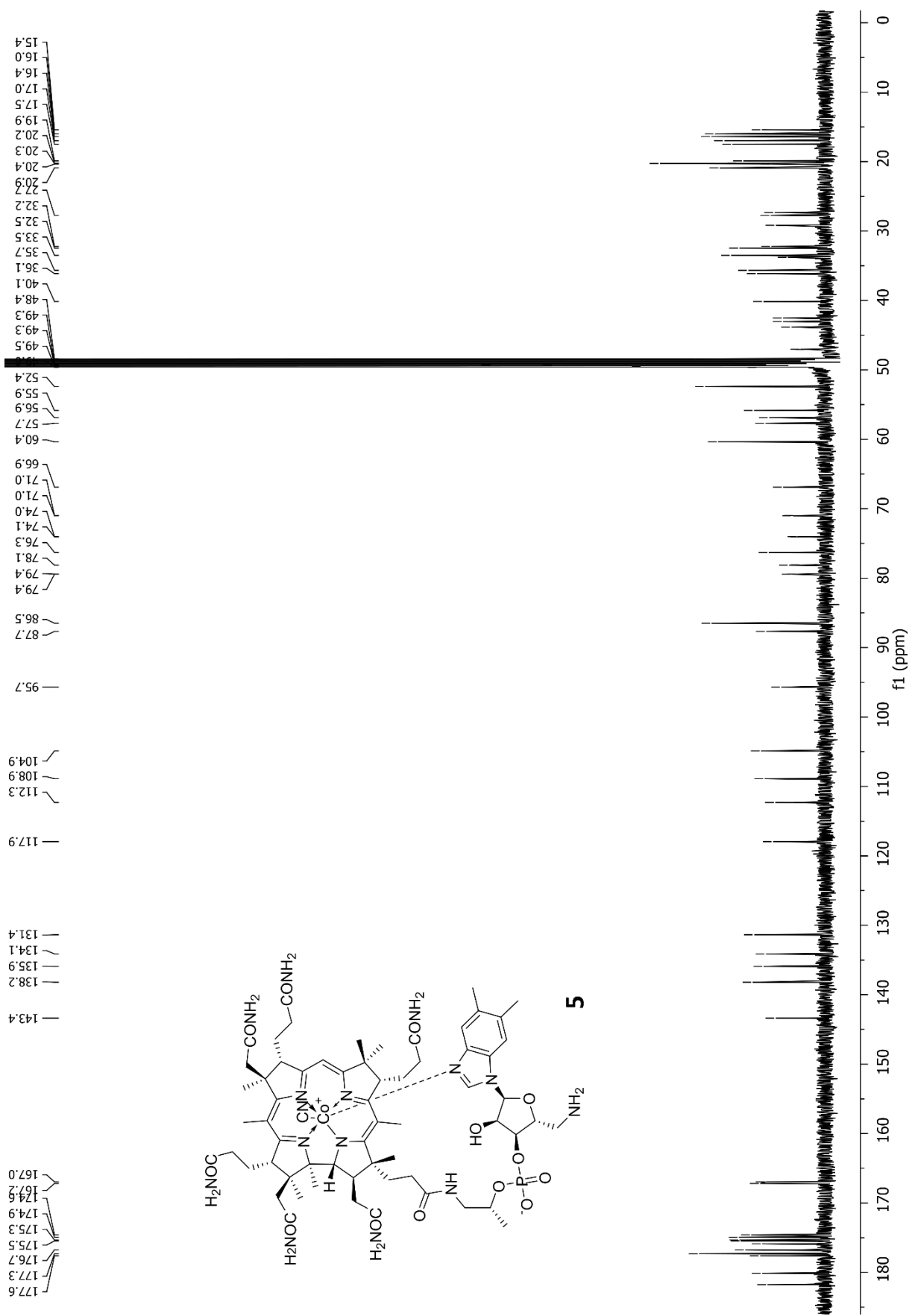
Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	WOS [min]	PDA Peak Purity
1	9207,680	319,976	100,0	100,0	0,40	639
Total	9207,680	319,976	100,0	100,0		



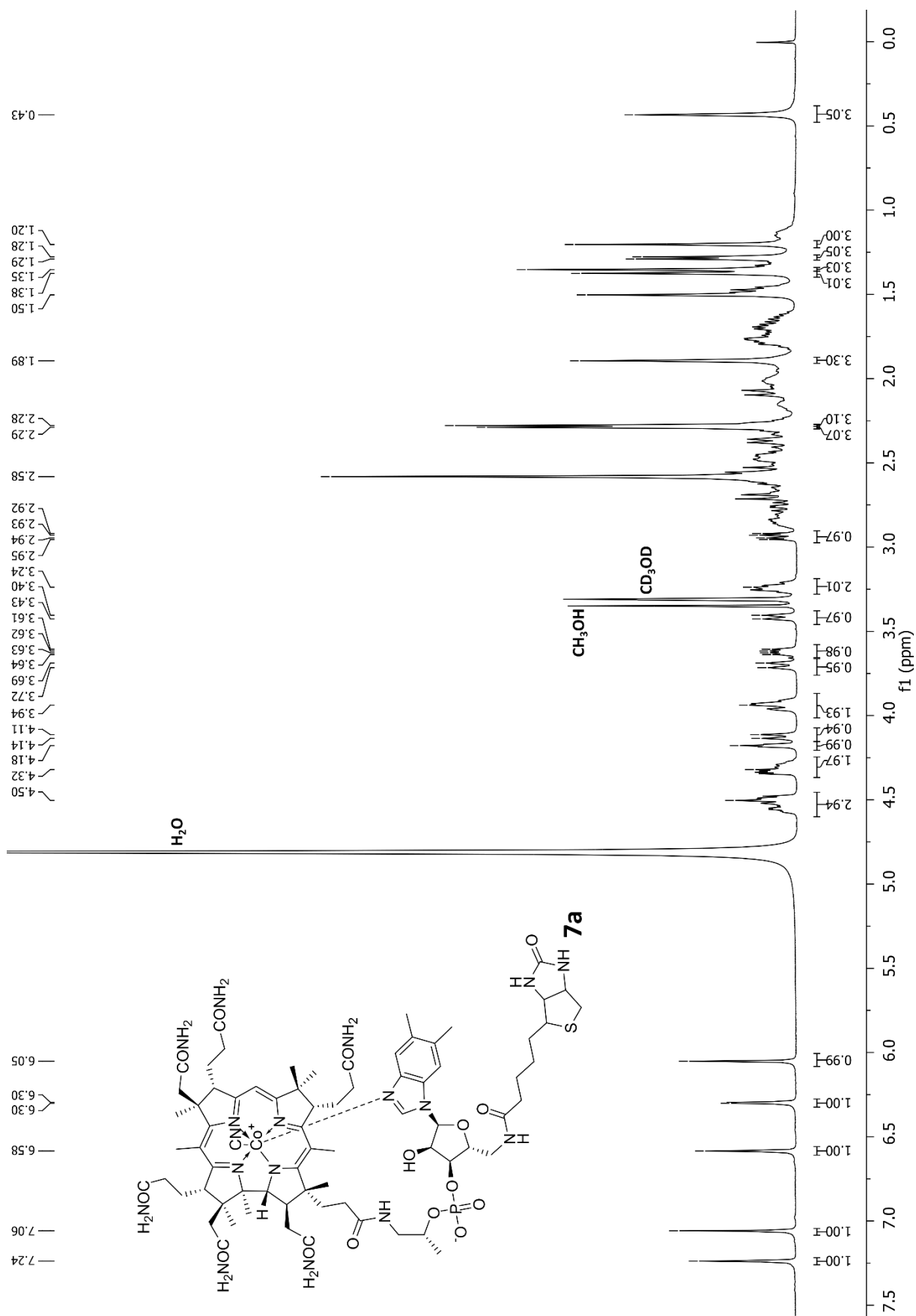
Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	WOS [min]	PDA Peak Purity
1	7414,466	182,862	100,0	100,0	0,58	680
Total	7414,466	182,862	100,0	100,0		

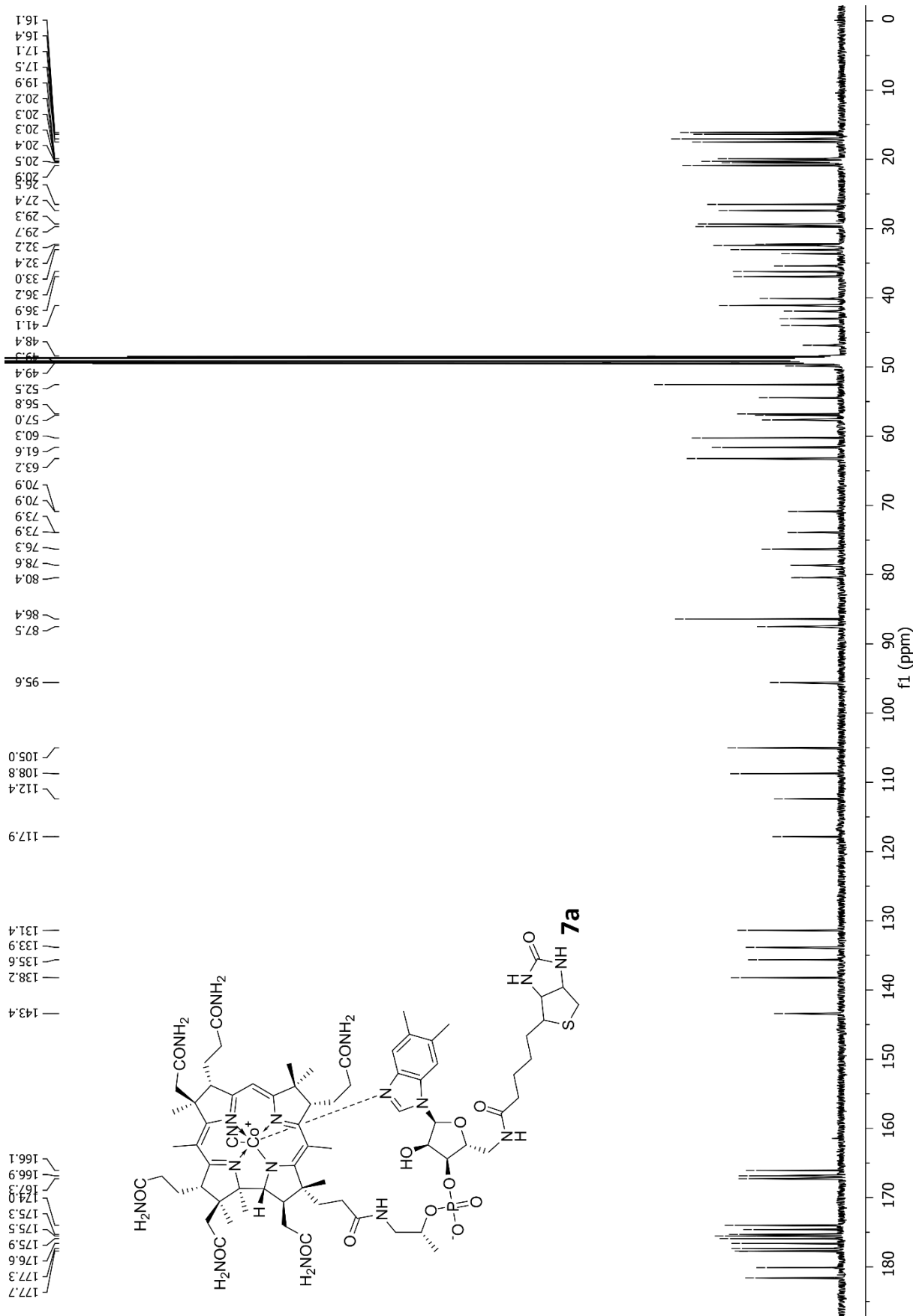
5. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound **5** in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)



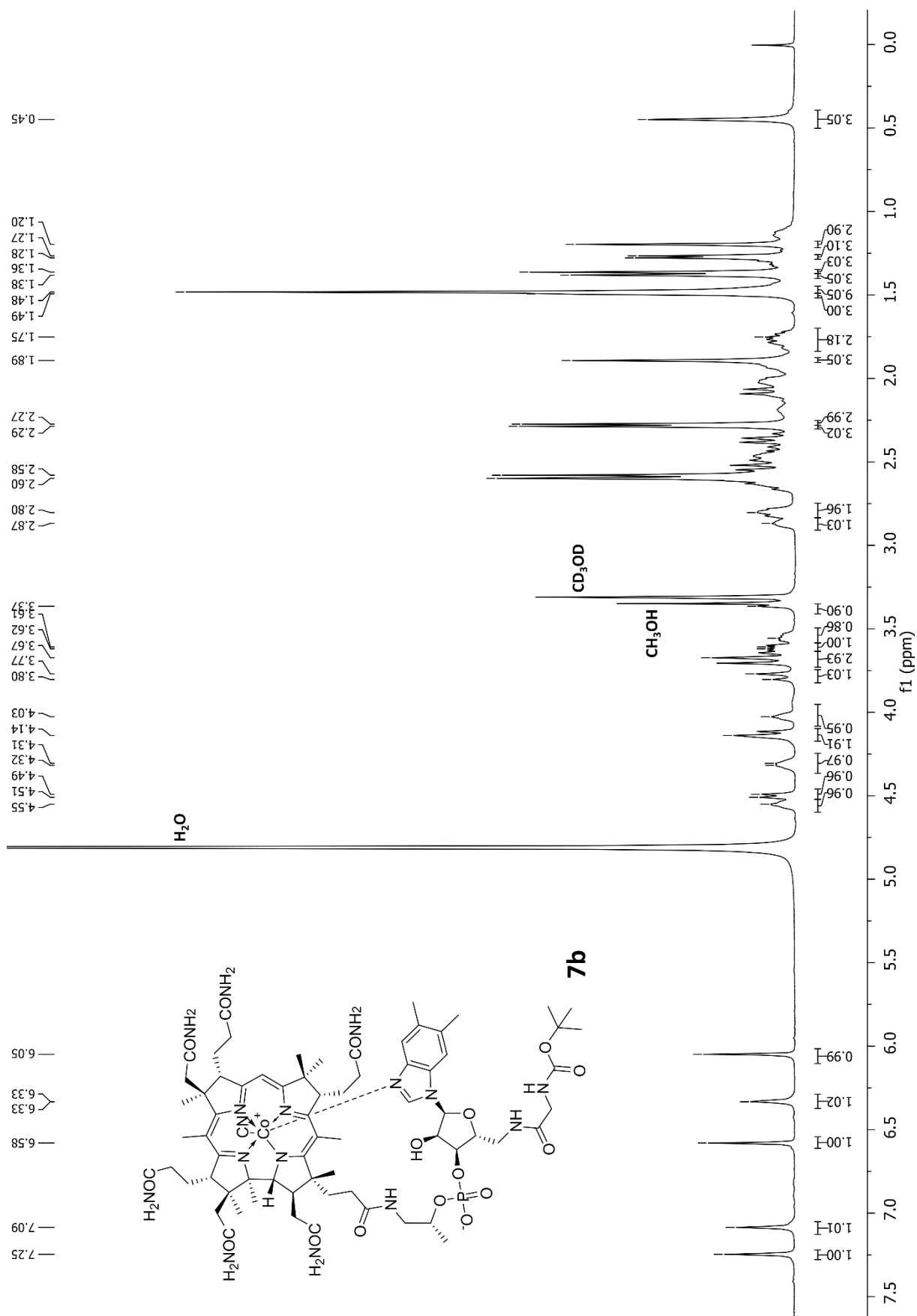


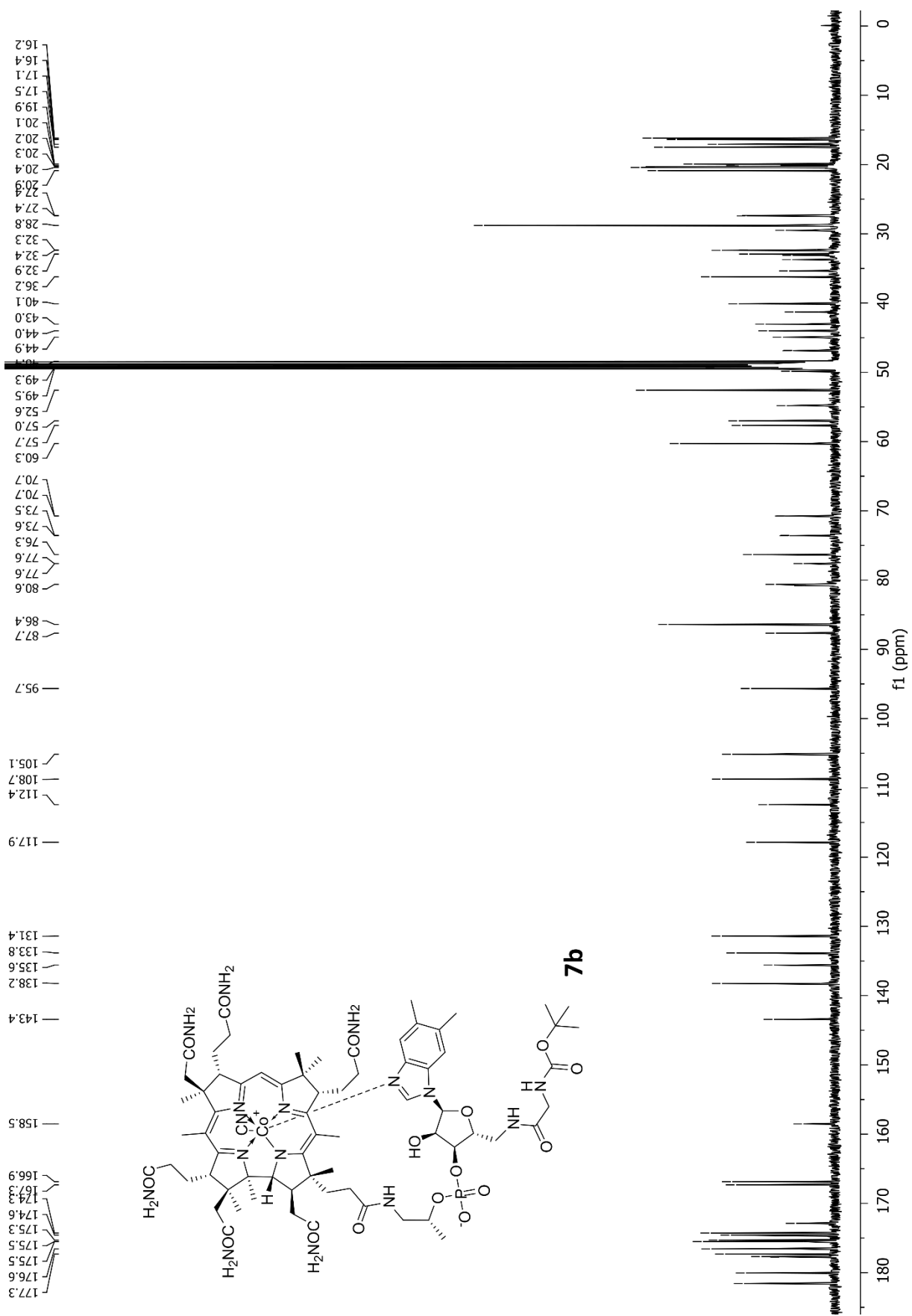
6. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound **7a** in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)



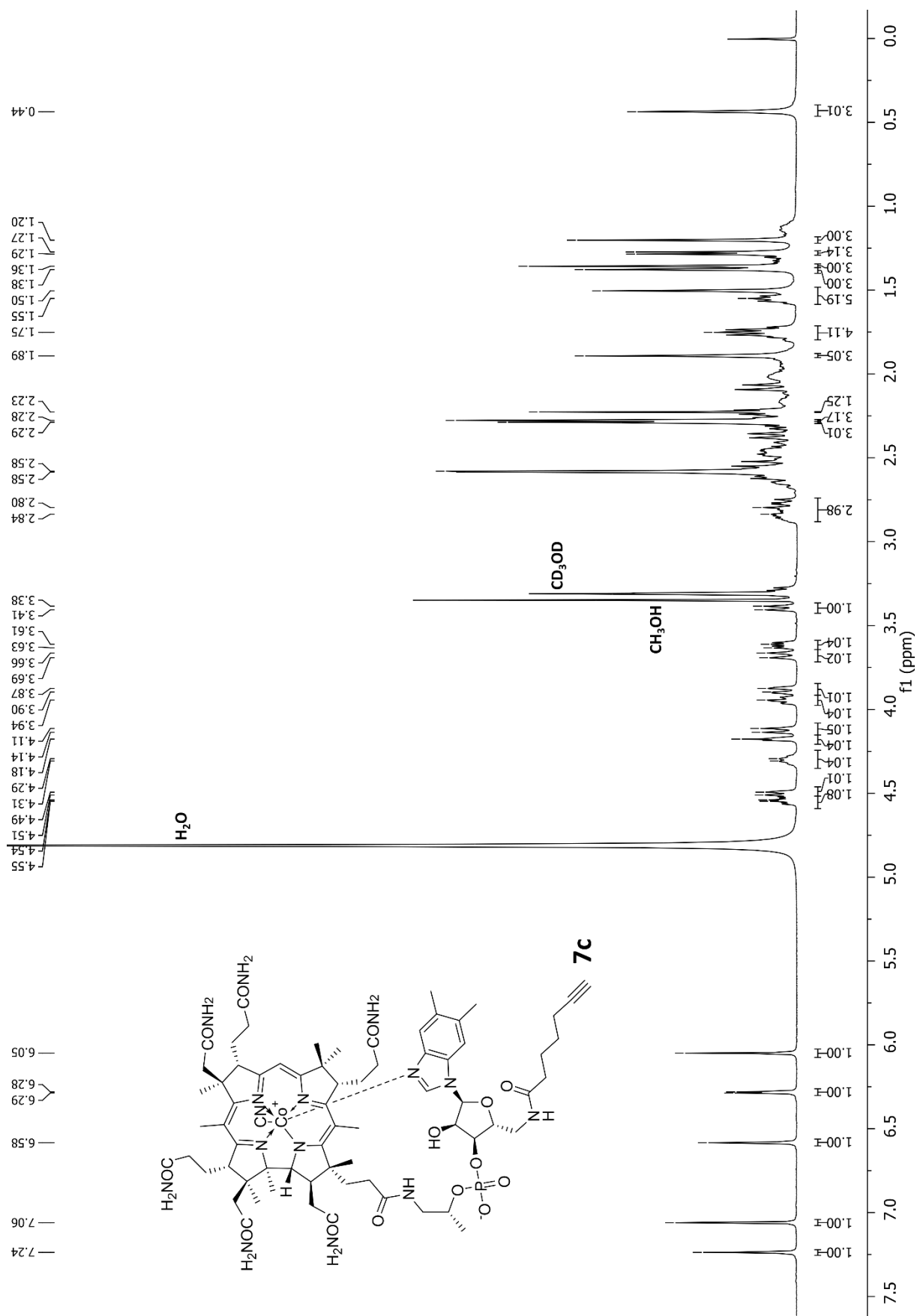


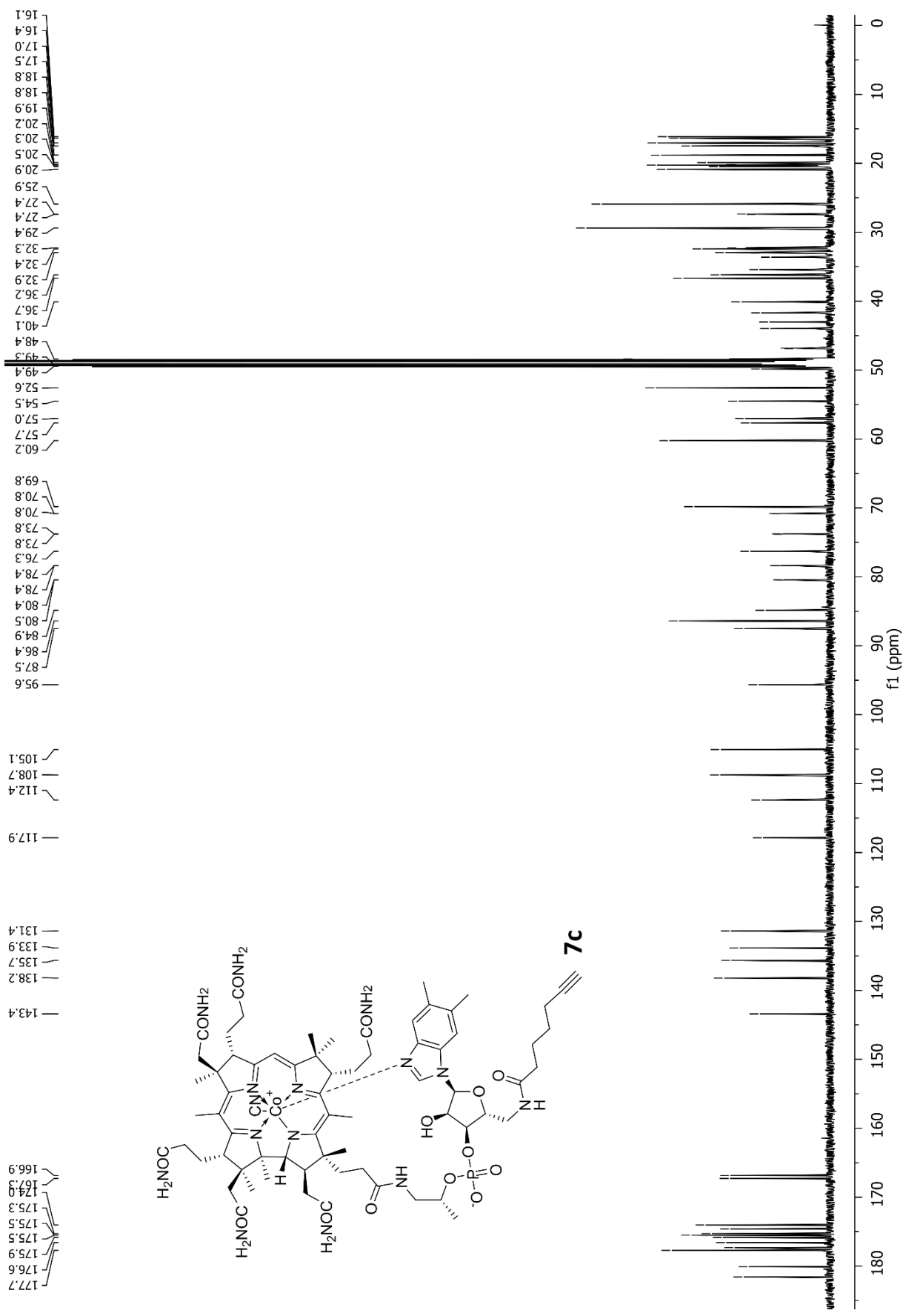
7. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound **7b** in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)



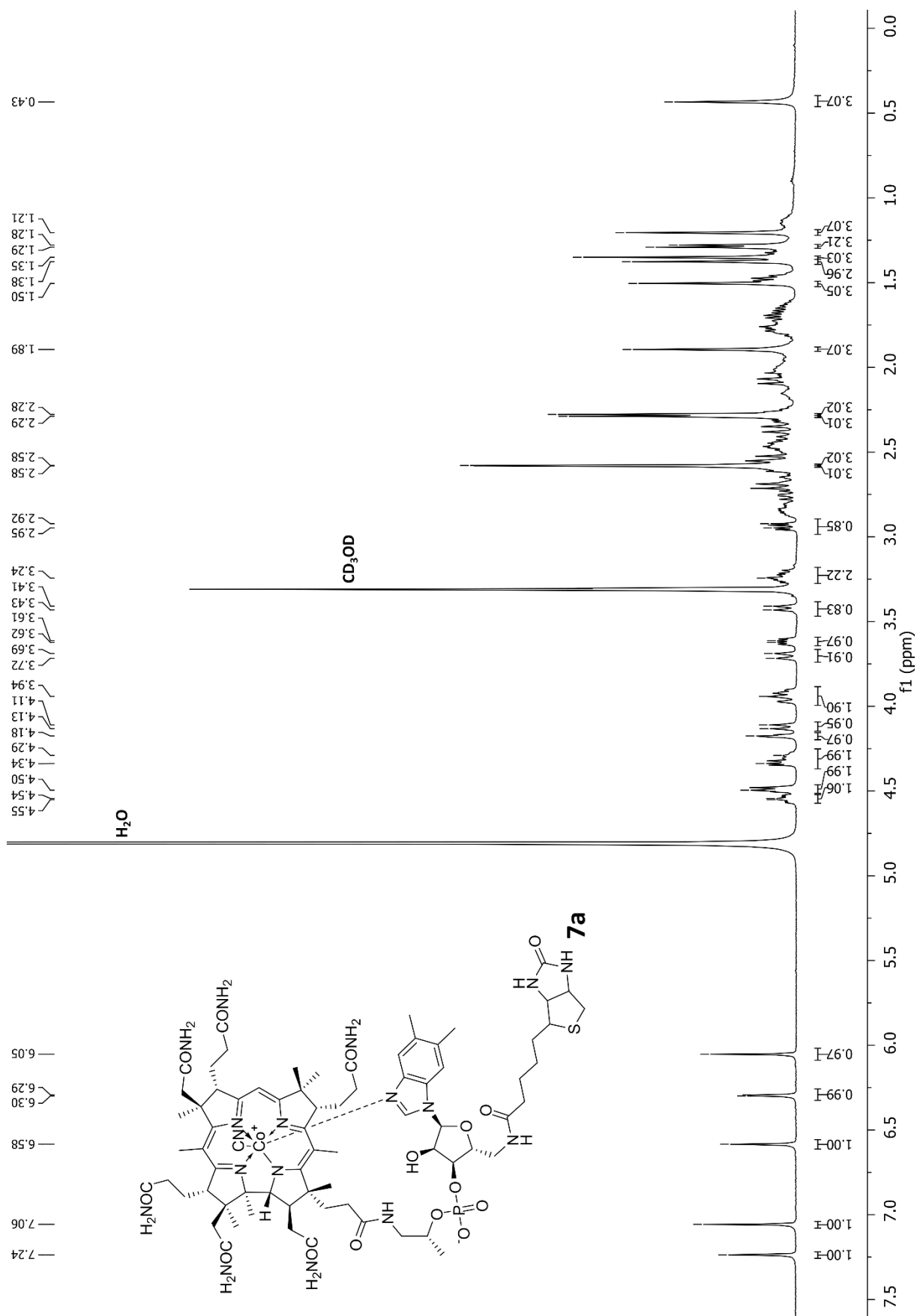


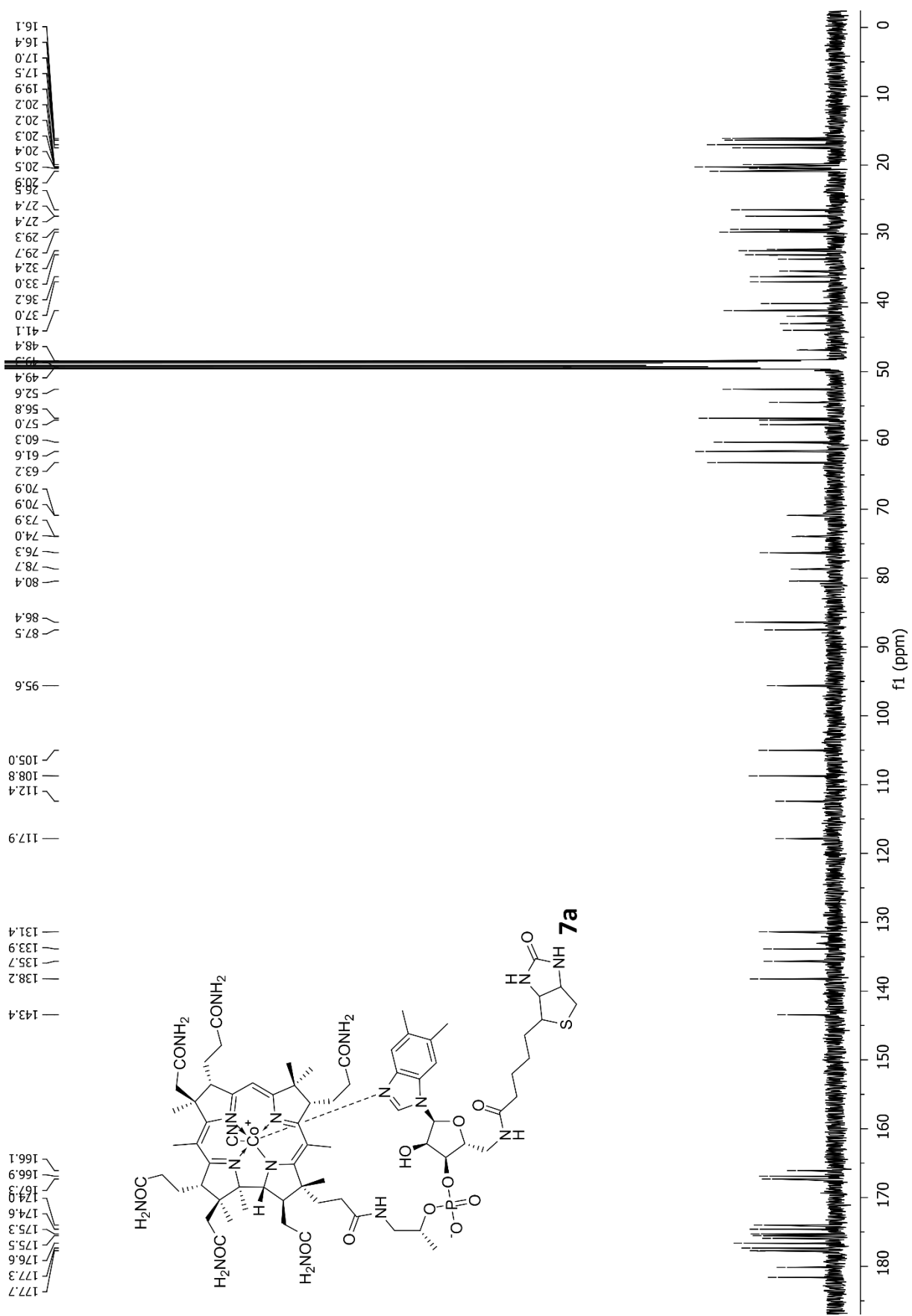
8. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound **7c** in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)



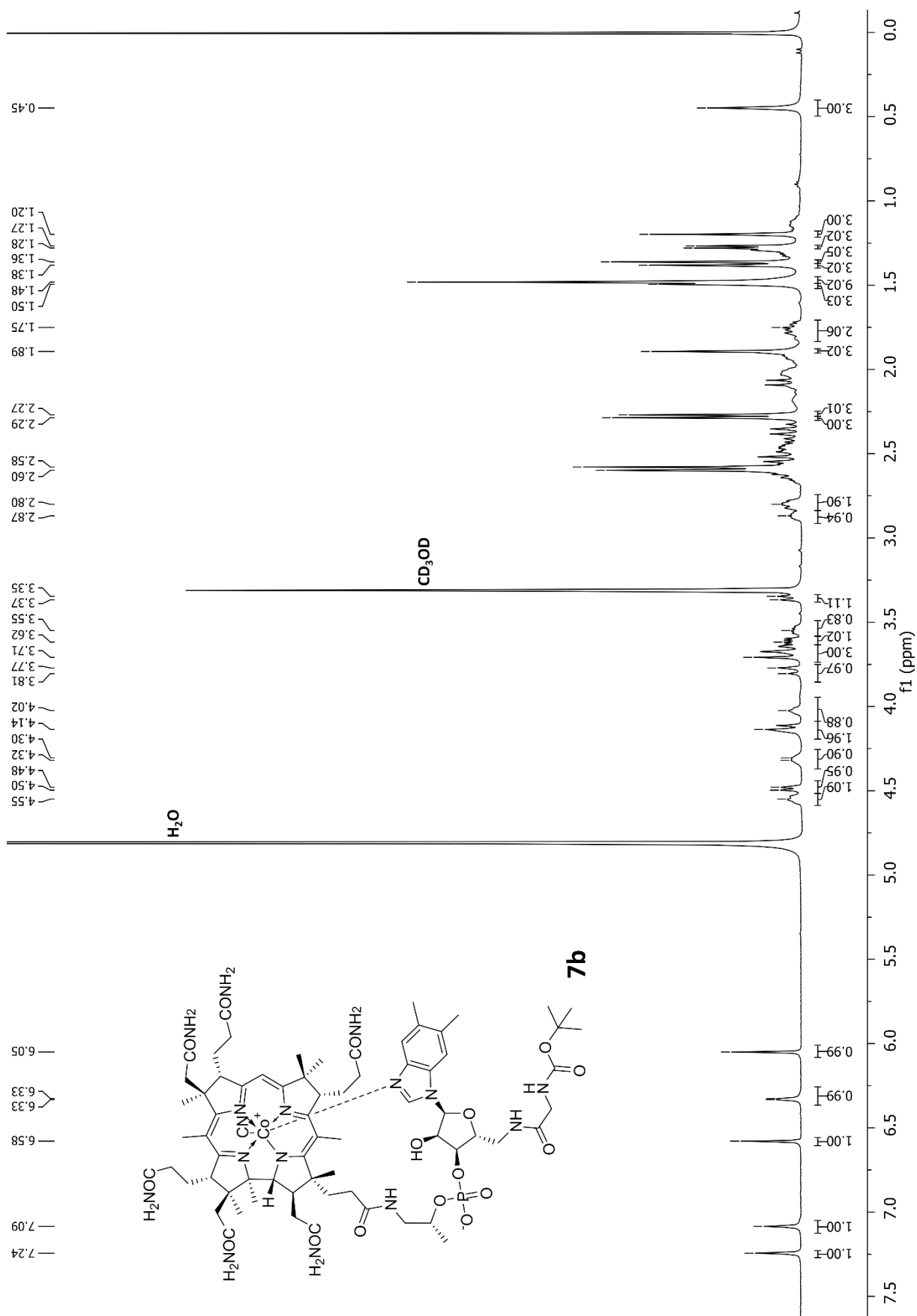


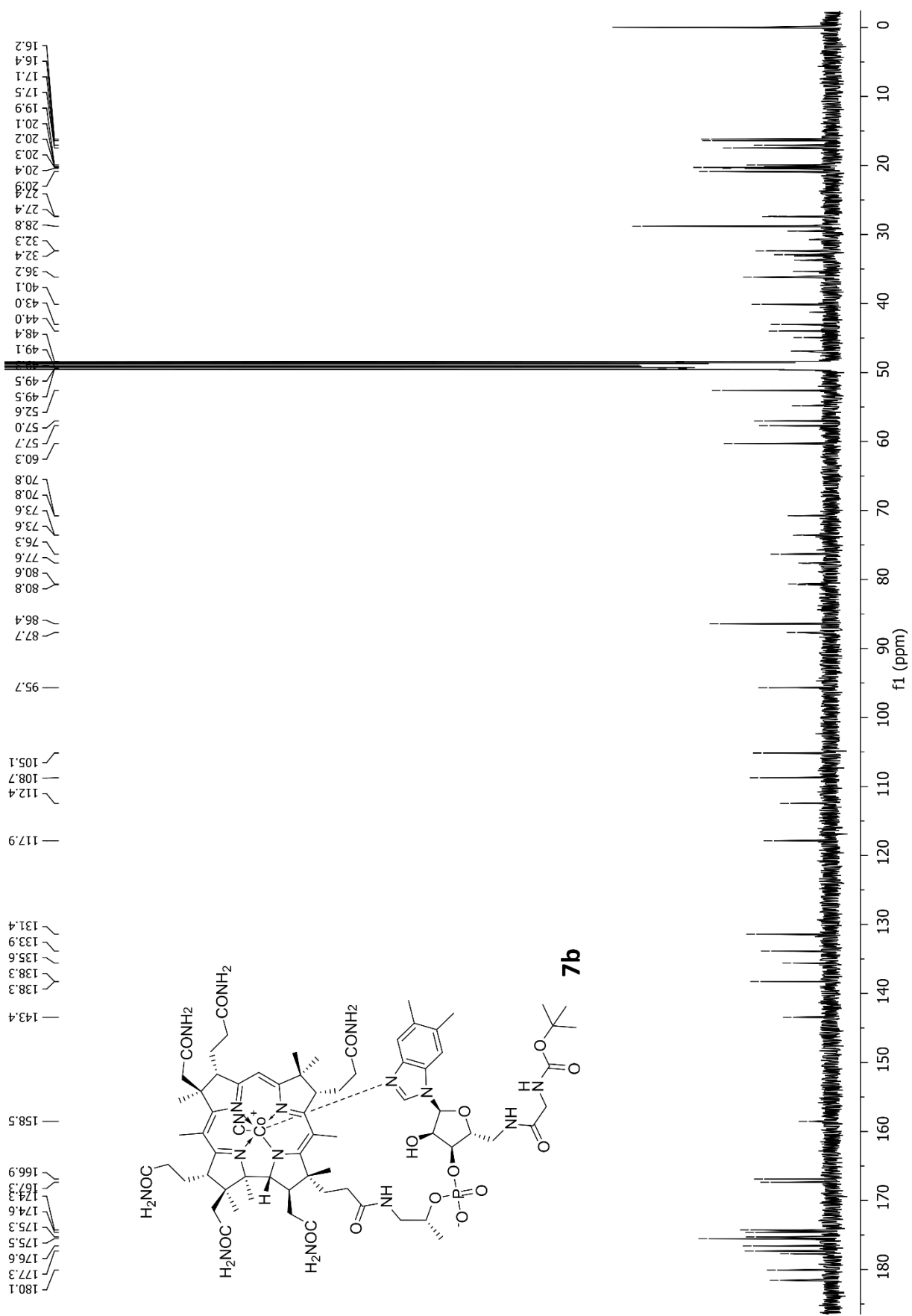
9. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound **7a** (in physiological conditions) in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)



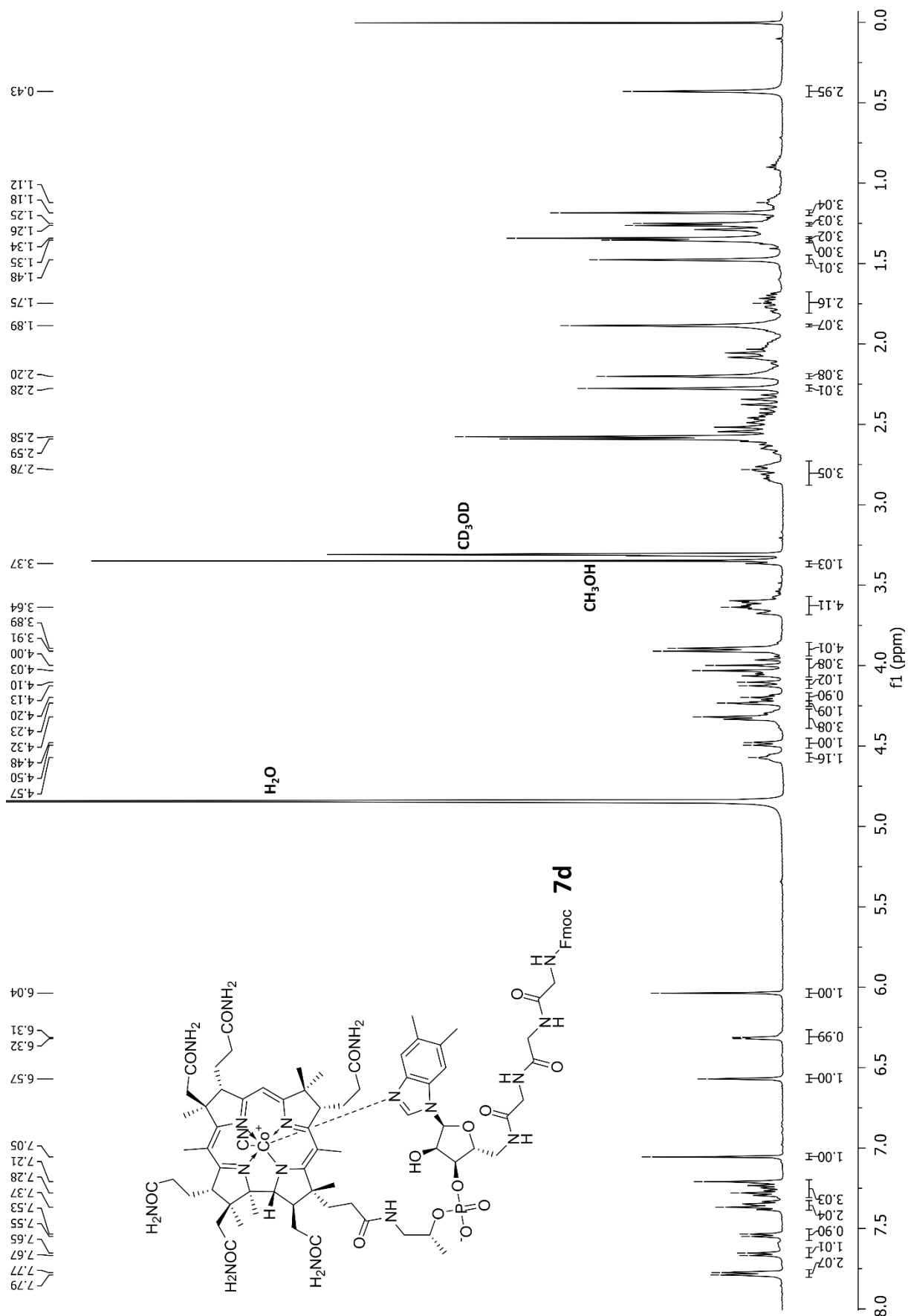


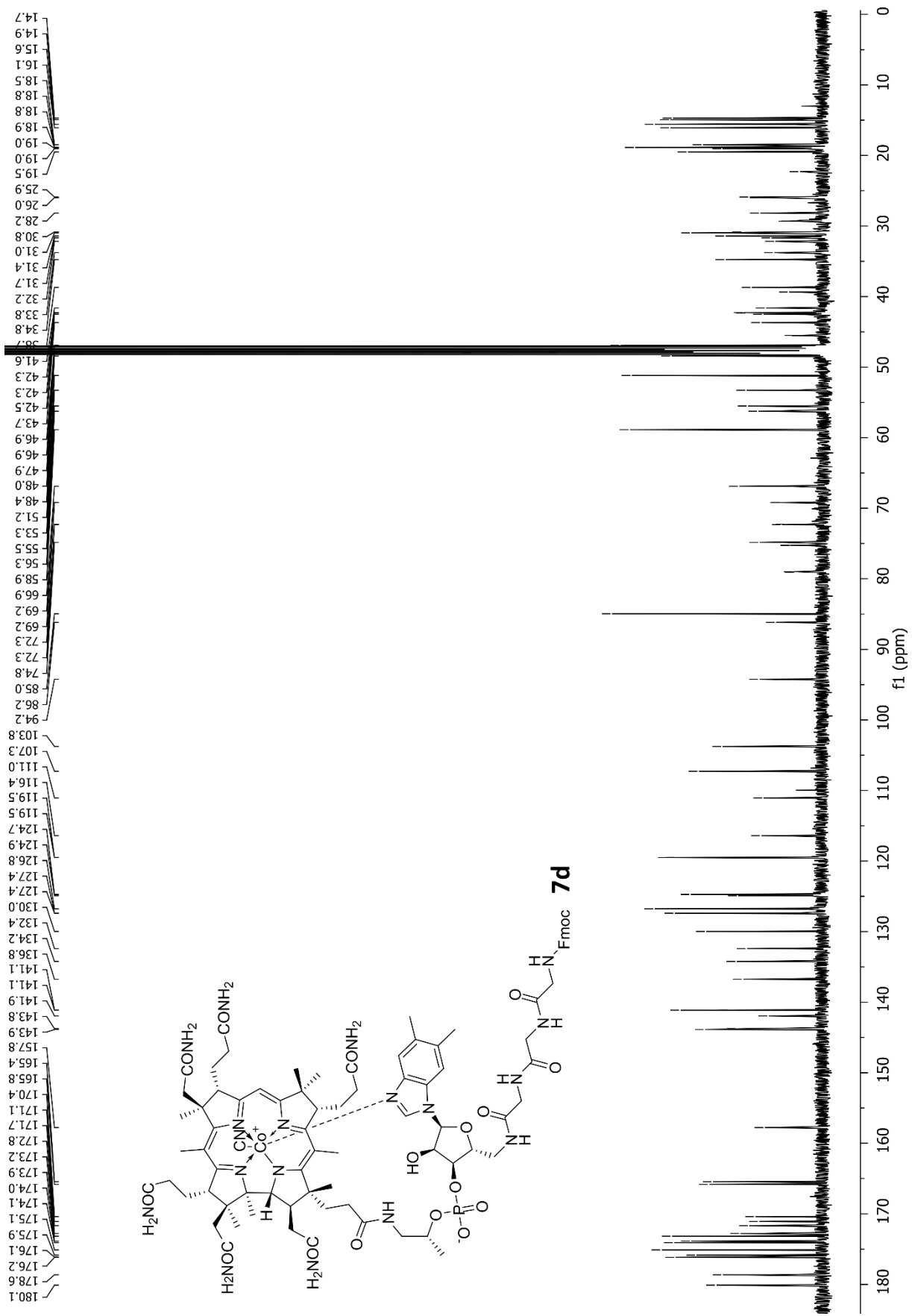
10. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound **7b** (with coupling reagent) in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)



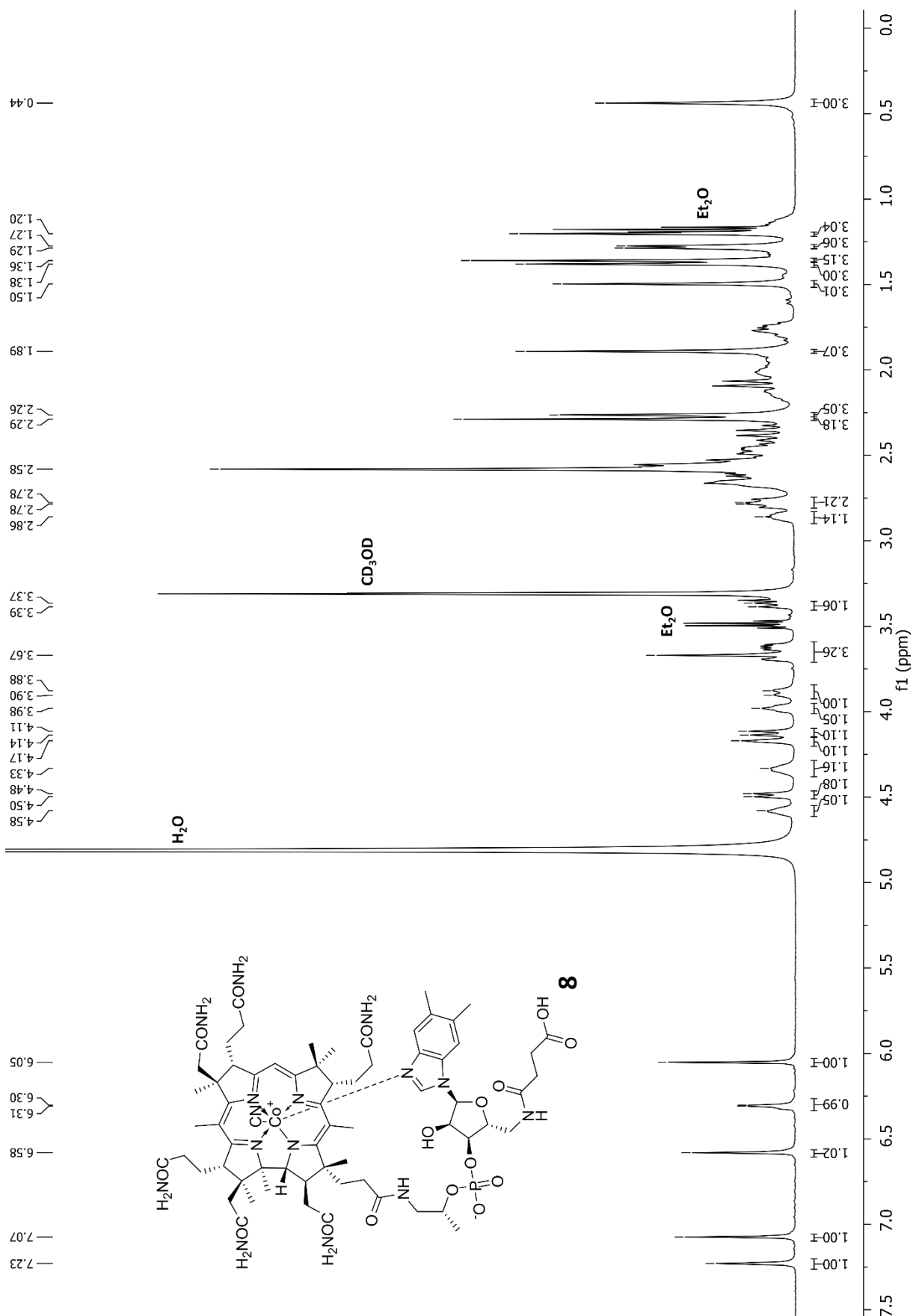


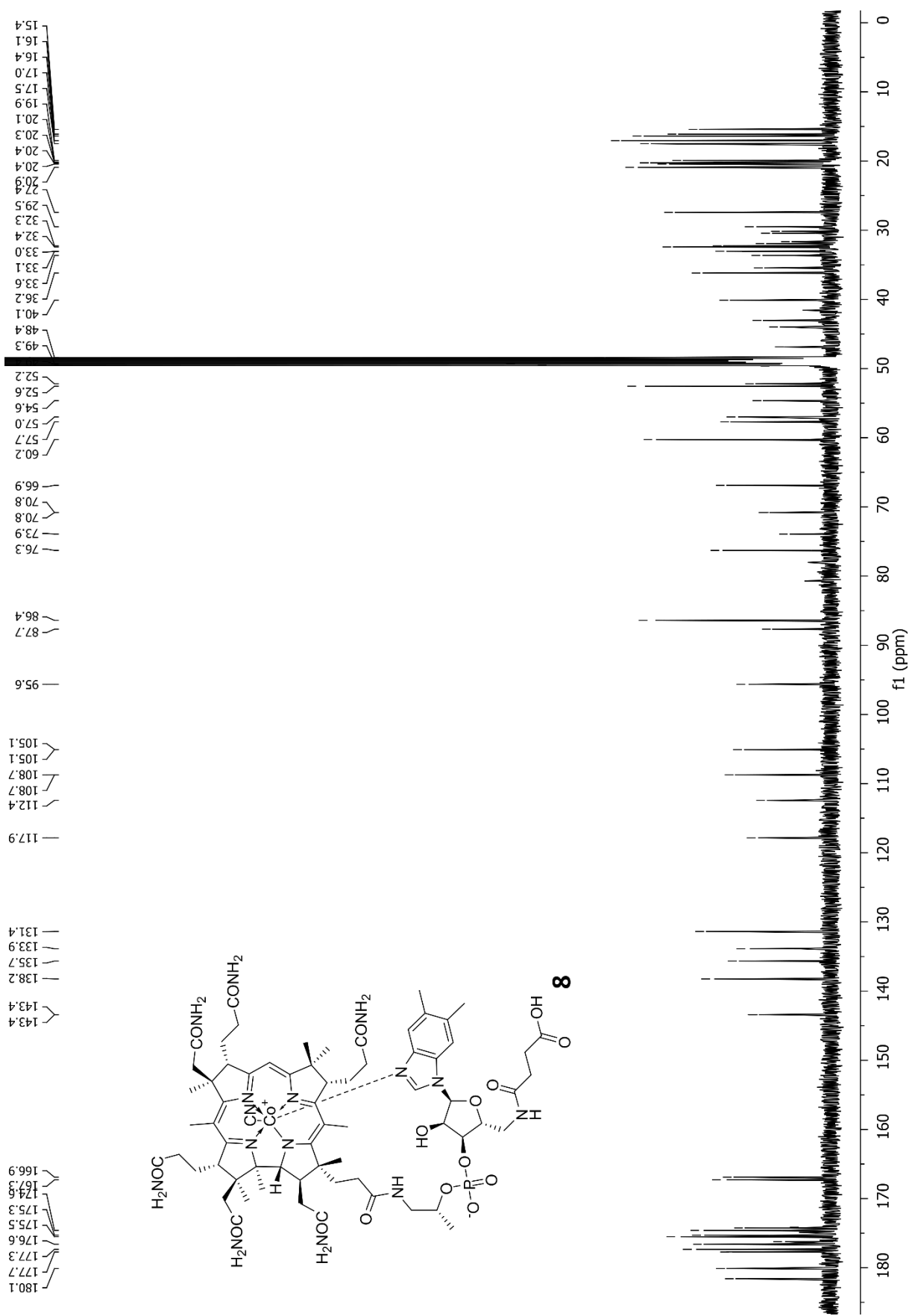
11. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound **7d** (with coupling reagent) in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)



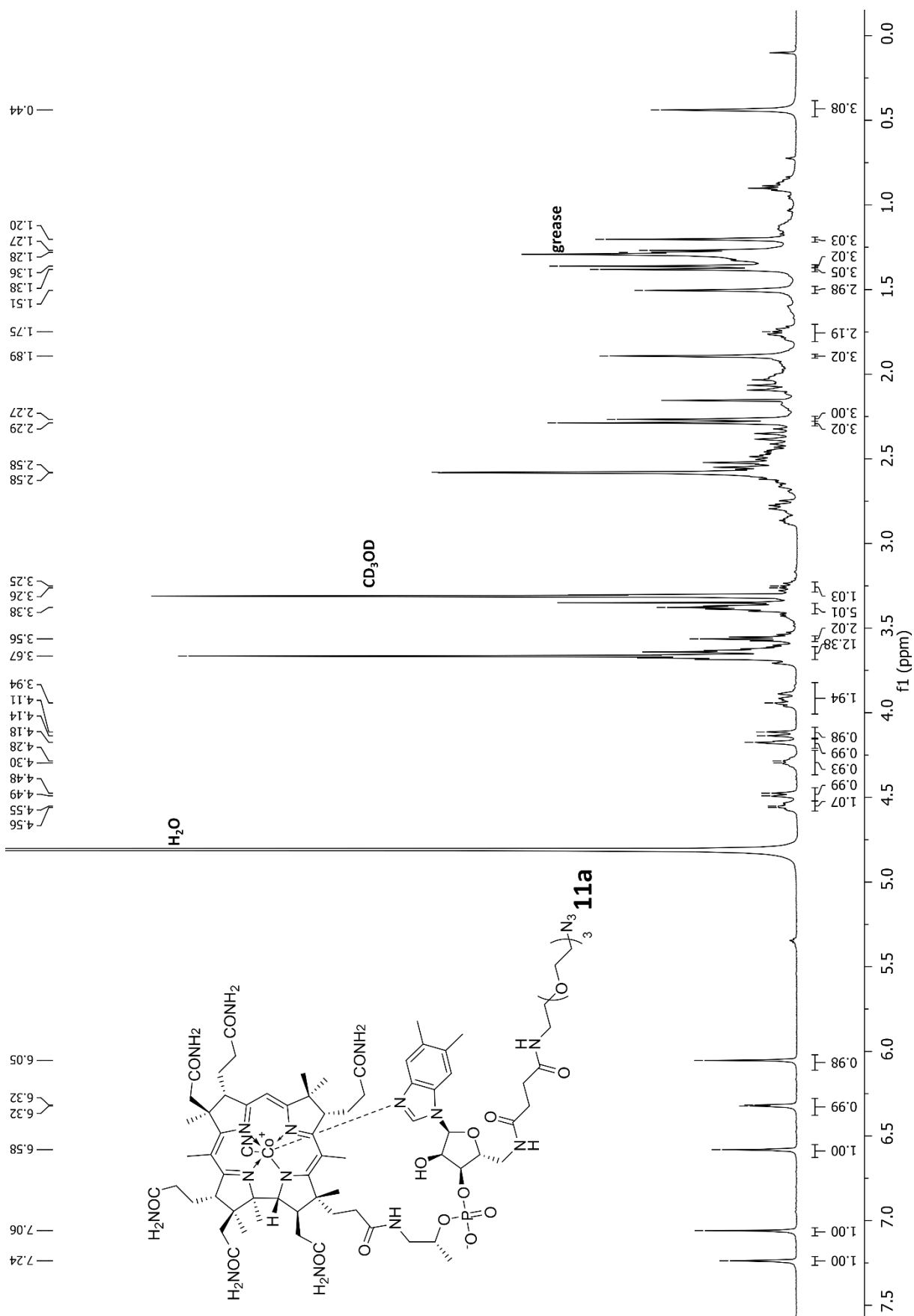


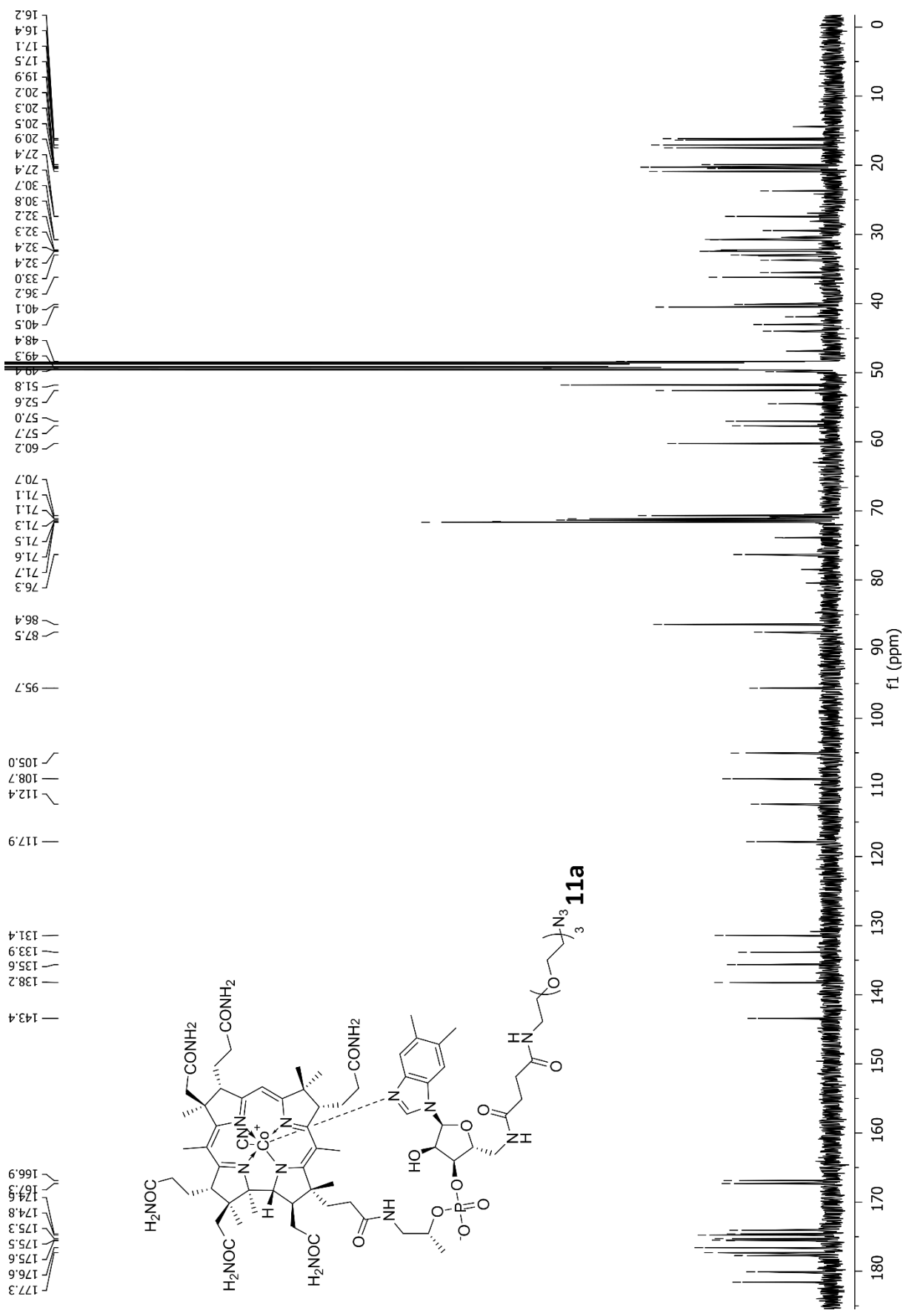
12. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound **8** in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)



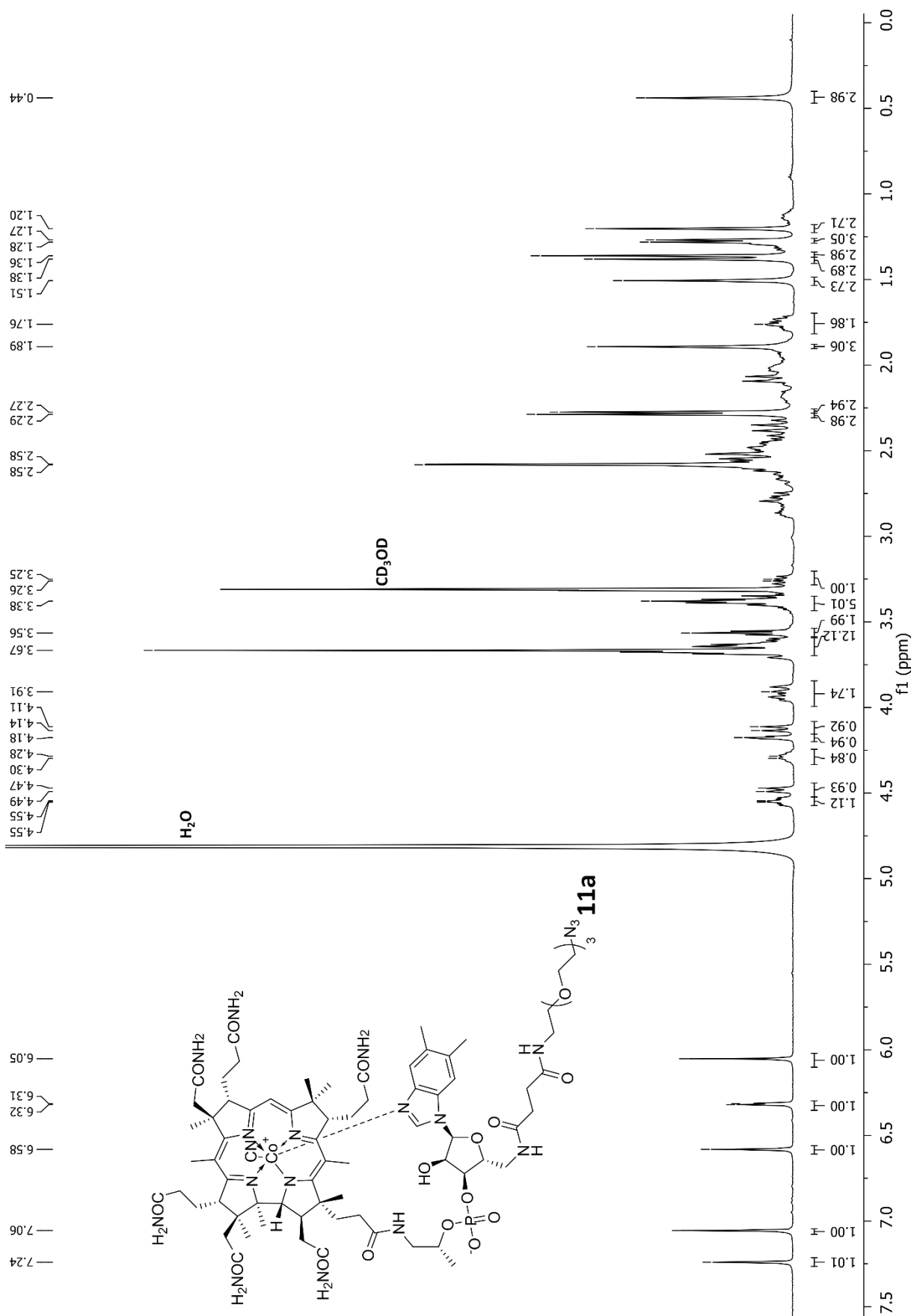


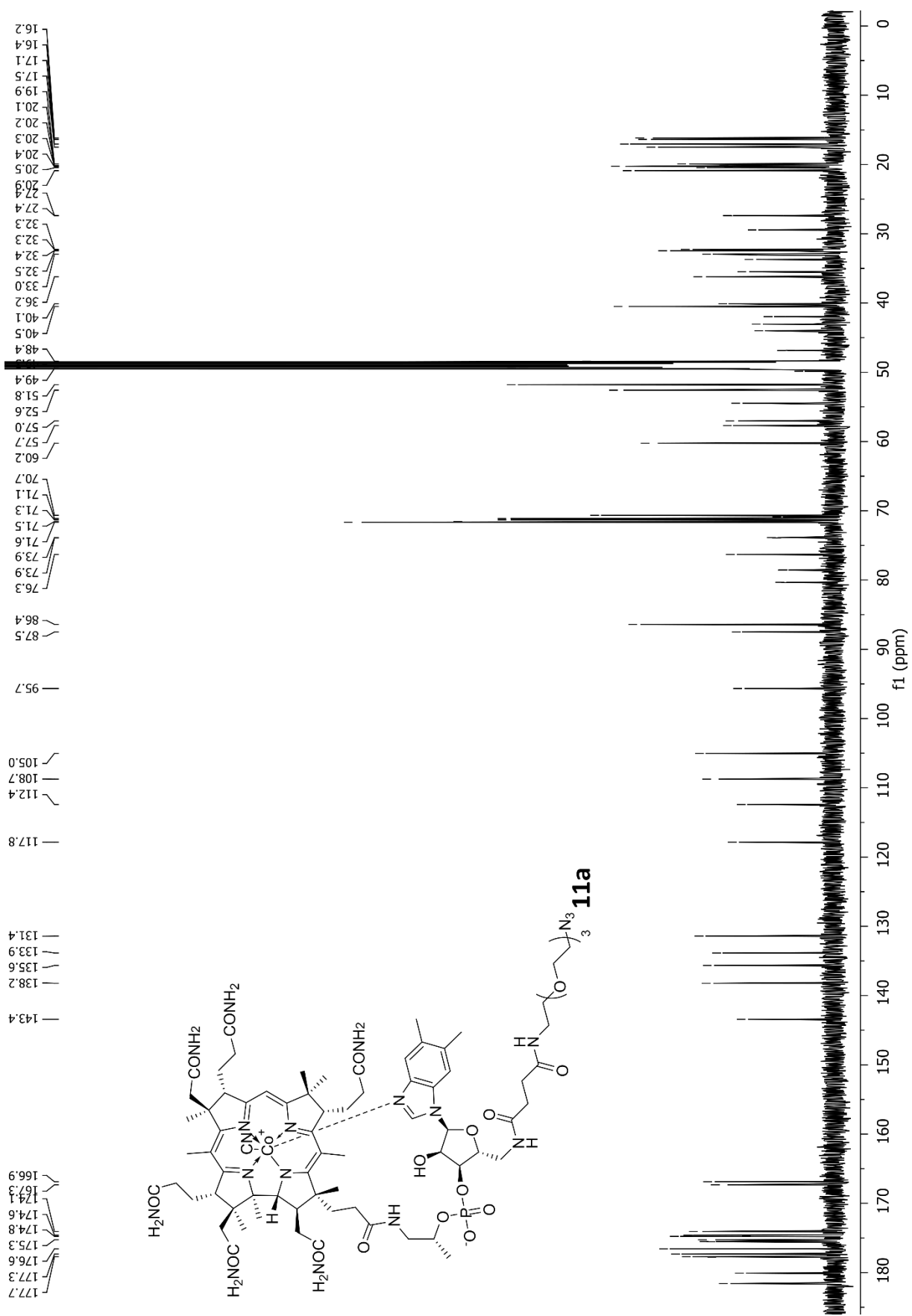
13. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound **11a** (via active ester step) in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)



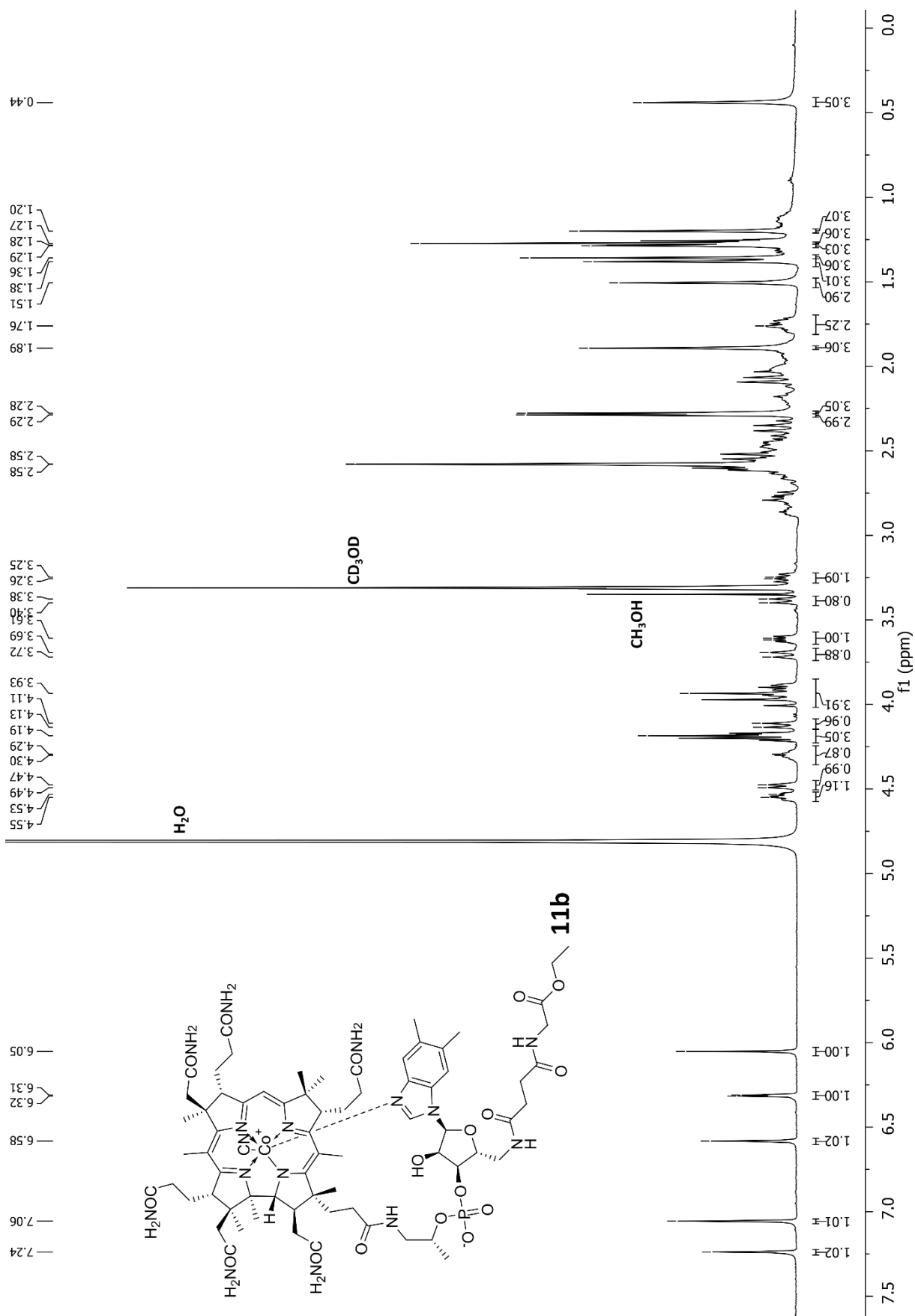


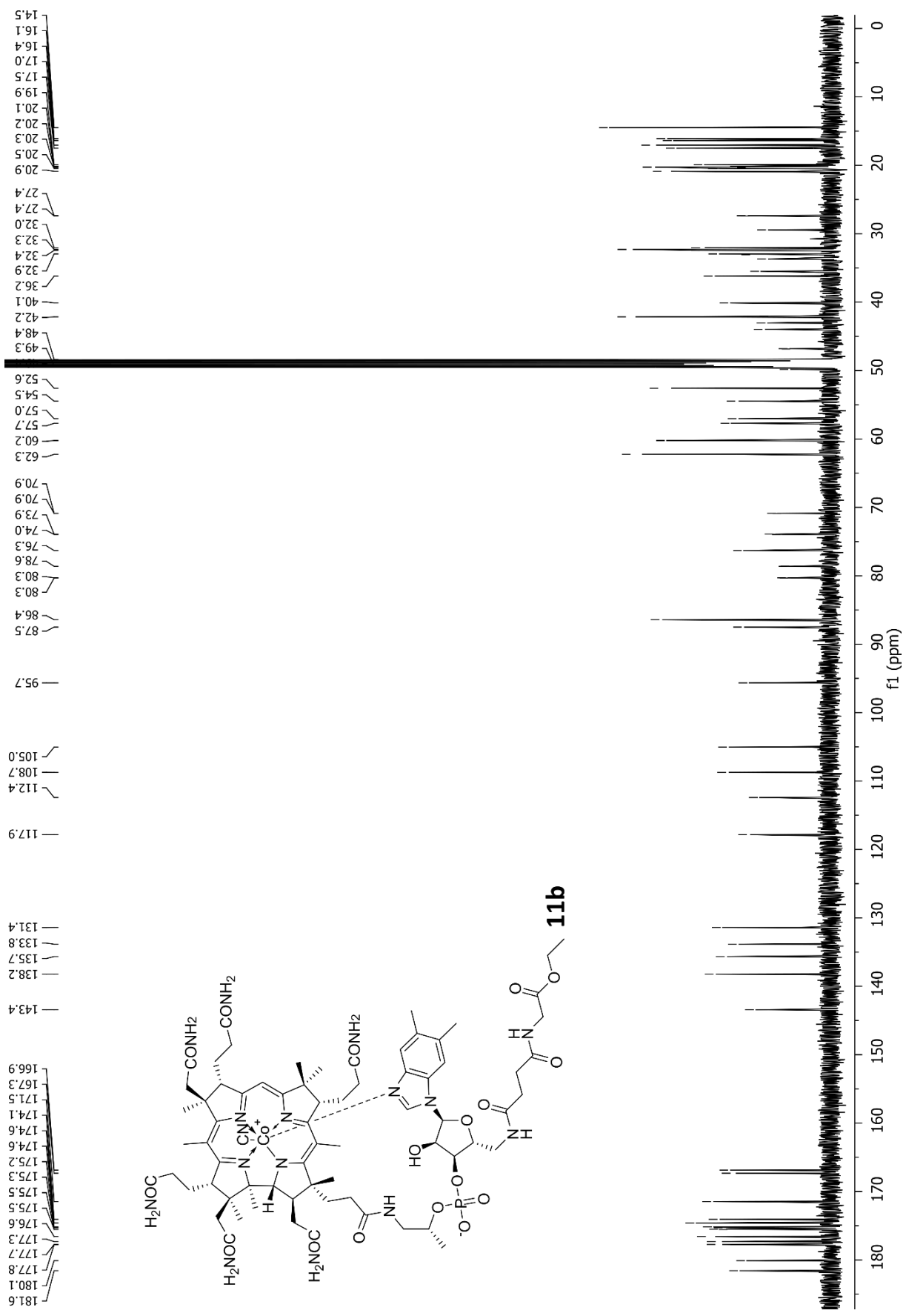
14. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound **11a** in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)



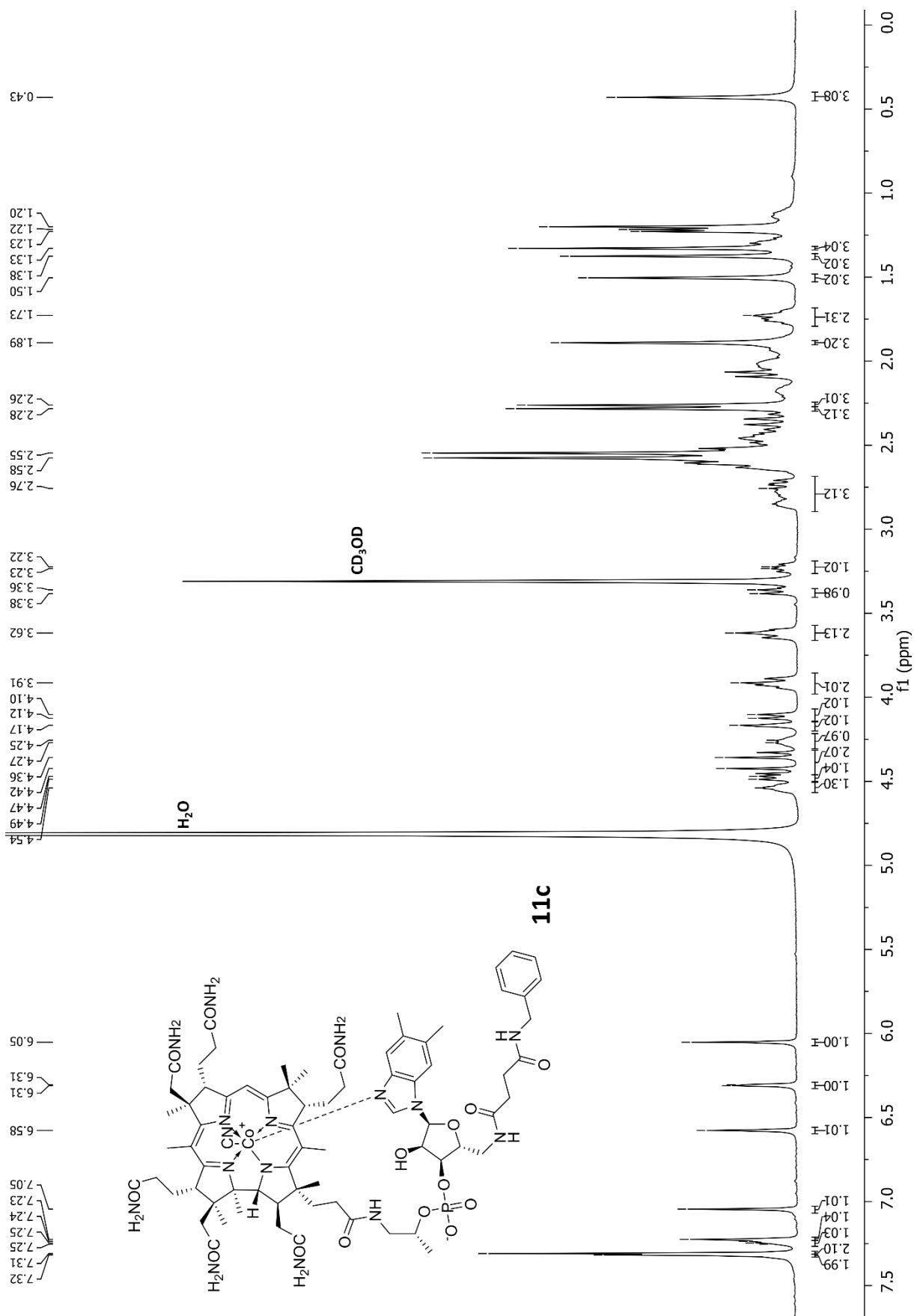


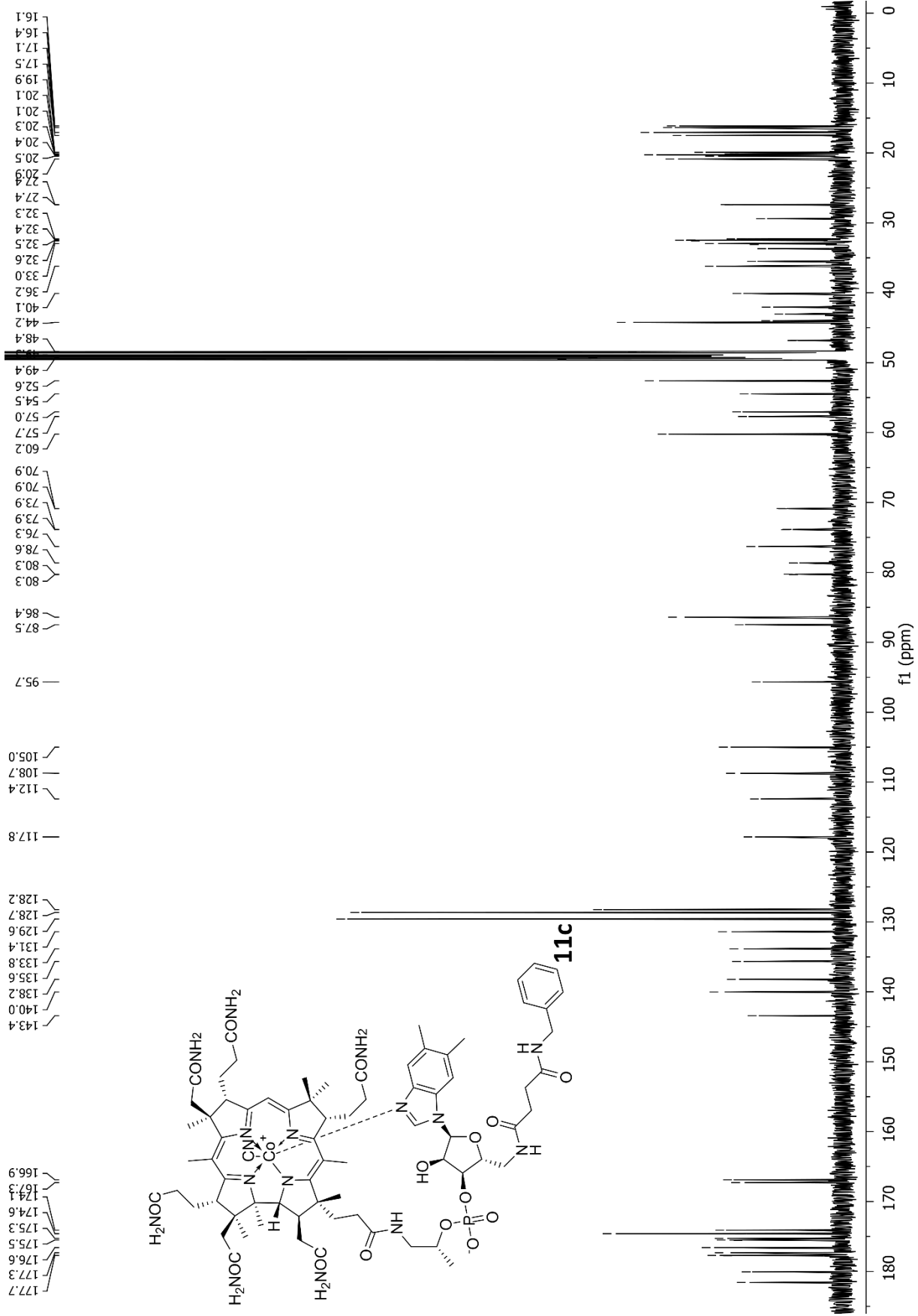
15. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound **11b** in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)





16. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound **11c** in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)





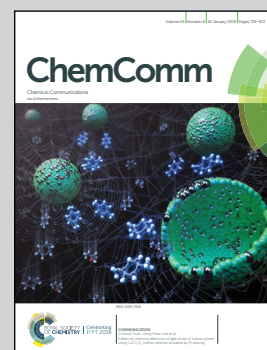


Showcasing research from Professor Dorota Gryko's laboratory from the Institute of Organic Chemistry Polish Academy of Sciences and Professor Joanna Trylska's laboratory from the Centre of New Technologies University of Warsaw, Warsaw, Poland

Vitamin B₁₂ transports modified RNA into *E. coli* and *S. Typhimurium* cells

The widespread emergence of bacterial resistance to existing drugs creates a need to develop novel therapeutic agents. The use of short, modified oligonucleotides as inhibitors of bacterial translation seems a promising strategy but bacteria do not uptake oligonucleotides from their environment. Vitamin B₁₂, an exogenous microelement, proved to be capable of transporting short oligonucleotides into bacterial prokaryotic cells.

As featured in:



See Joanna Trylska, Dorota Gryko *et al.*, *Chem. Commun.*, 2019, 55, 763.



Vitamin B₁₂ transports modified RNA into *E. coli* and *S. Typhimurium* cells†

Maciej Giedyk,^a Agnieszka Jackowska,^a Marcin Równicki,^{bc}
Monika Kolanowska,^{bd} Joanna Trylska^{ib*} and Dorota Gryko^{ib*†a}

Cite this: *Chem. Commun.*, 2019, 55, 763

Received 25th June 2018,
Accepted 19th November 2018

DOI: 10.1039/c8cc05064c

rsc.li/chemcomm

Specifically designed, antisense oligonucleotides are promising candidates for antibacterial drugs. They suppress the correct expression of bacterial genes by complementary binding to essential sequences of bacterial DNA or RNA. The main obstacle in fully utilizing their potential as therapeutic agents comes from the fact that bacteria do not uptake oligonucleotides from their environment. Herein, we report that vitamin B₁₂ can transport oligonucleotides into *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cells. 5'-Aminocobalamin with an alkyne linker and azide-modified oligonucleotides enabled the synthesis of vitamin B₁₂-2'OMeRNA conjugates using an efficient "click" methodology. Inhibition of protein expression in *E. coli* and *S. Typhimurium* cells indicates an unprecedented transport of 2'OMeRNA oligomers into bacterial cells via the vitamin B₁₂ delivery pathway.

The routine use and, most often, overuse of antibiotics has led to the rapid development of bacterial resistance.¹ As a consequence, new antibacterial agents are urgently needed and to this end, antisense oligonucleotides inhibiting gene expression in a sequence-specific way at the translational level are promising candidates.^{2,3} However, bacteria do not uptake oligonucleotides from their environment, which is the limiting factor in their potential use as antibiotics.⁴ Though a variety of vectors including lipids,⁵ polymers,⁶ cell penetrating peptides,⁷ and nanoparticles⁸ have been explored, the combination of hydrophobic phospholipid tails from the cell membrane and the lack of an endocytosis mechanism impedes their effective transport into the bacteria's interior.⁹ Conjugation of cell penetrating

peptides to uncharged nucleic acid analogues (*e.g.* peptide nucleic acids, PNAs) facilitates delivery to various bacterial cells.¹⁰ But for the charged oligonucleotides, even for 2'OMeRNA, only heat shock¹¹ and electroporation¹² allow their introduction into bacterial cells. Thus an appropriate delivery system is yet to be discovered.¹³

The use of vitamin B₁₂ (cobalamin, **1**, Fig. 1) as a drug delivery vehicle into eukaryotic cells is well documented and as such increases the bioavailability of different therapeutics.¹⁴

Not all bacteria produce vitamin B₁₂ (**1**), therefore they develop specific mechanisms for its uptake from their environment.¹⁵ Prokaryotic cells actively transport vitamin B₁₂ (**1**) using a cascade of membrane proteins.¹⁶ In *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, vitamin B₁₂ (**1**) is recognized by a number of bacterial receptors, responsible for its passage into the cytoplasm.^{17,18}

As one of the principal difficulties relating to the application of antisense oligonucleotides as therapeutic agents for bacterial infections concerns their penetration into bacteria, we investigated if vitamin B₁₂ can transport them into Gram-negative bacterial cells via its specific mechanism. Herein, we present the unprecedented delivery of antisense 2'OMeRNA oligomers

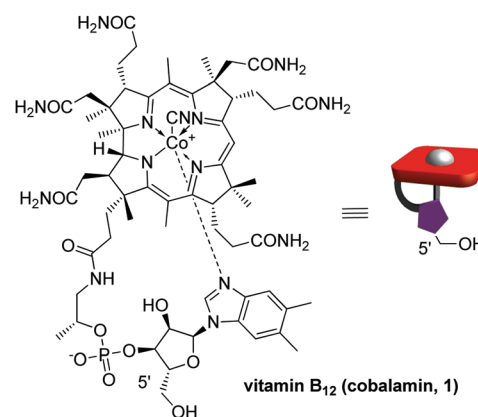


Fig. 1 Vitamin B₁₂ (**1**).

^a Institute of Organic Chemistry Polish Academy of Sciences, Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland. E-mail: dorota.gryko@icho.edu.pl

^b Centre of New Technologies University of Warsaw, Banacha 2c, 02-097 Warsaw, Poland. E-mail: joanna@cent.uw.edu.pl

^c College of Inter-Faculty Individual Studies in Mathematics and Natural Sciences, University of Warsaw, Banacha 2c, 02-097 Warsaw, Poland

^d Genomic Medicine, Medical University of Warsaw, Banacha 1a, 02-097 Warsaw, Poland

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c8cc05064c

Supporting Information for

**Vitamin B₁₂ transports modified RNA into *E. coli*
and *S. Typhimurium* cells**

Maciej Giedyk,^a Agnieszka Jackowska,^a Marcin Równicki,^{bc} Monika Kolanowska,^{bd}
Joanna Trylska,^{*b} and Dorota Gryko^{*a}

^a Institute of Organic Chemistry Polish Academy of Sciences, Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland

^b Centre of New Technologies University of Warsaw, Banacha 2c, 02-097 Warsaw, Poland

^c College of Inter-Faculty Individual Studies in Mathematics and Natural Sciences, University of Warsaw, Banacha 2c, 02-097 Warsaw, Poland

^d Genomic Medicine, Medical University of Warsaw, Banacha 1a, 02-097 Warsaw, Poland

Table of Contents

1. General information	3
2. Biological information	6
3. HPLC conditions	7
4. Preparation of stock solutions	8
5. Synthesis of 5'-azido-2'-deoxycytidine (3a)	9
6. Synthesis of cytidine derivative 3b	10
7. Optimization of the model CuAAC reaction	11
8. Experimental procedures	12
9. Stability of conjugates in bacteria medium	28
10. Relative fluorescence measured after treatment of <i>E. coli</i> and <i>S. Typhimurium</i> cells with vitamin B ₁₂ -2'OMeRNA conjugates 6a, 6b, 6c and vitamin B ₁₂ only	30
11. References	31
12. HPLC chromatograms	32
13. ¹ H, ¹³ C, and ³¹ P NMR spectra	45
14. MS spectra of conjugates B ₁₂ -2'OMeRNA	57

1. General information

All solvents and chemicals were used of reagent grade and were used without further purification. Tested compounds were greater than 95% chemical purity as measured by elemental or HPLC analysis. High resolution mass spectra were recorded on SYNAPT or Waters Q-TOF Premier spectrometers. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at rt on Bruker 400 and 500 MHz instruments with TMS or residual solvent peak as an internal standard. ^{31}P NMR spectra were recorded without the standard. Thin layer chromatography (TLC) was performed using Merck Silica Gel GF254, 0.20 mm thickness and reverse phase-18 modified silica gel coated with fluorescent indicator F254s. DCVC (dry column vacuum chromatography)¹ was performed using Merck Silica Gel 60 H and reverse phase Silica Gel 90 C18 (Fluka). The exact concentrations of solutions of oligonucleotides were determined by Spectrophotometer DeNovix DS-11.

Following compounds were synthesized according to the reported procedures:

N-(Cobalamin-5'-yl)-hept-6-ynamide (**2**)²

5'-Azido-thymidine (**3c**)³

5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-2'-deoxycytidine (**8**)⁴

6-Bromohexyl 2-cyanoethyl diisopropylphosphoramidite⁵

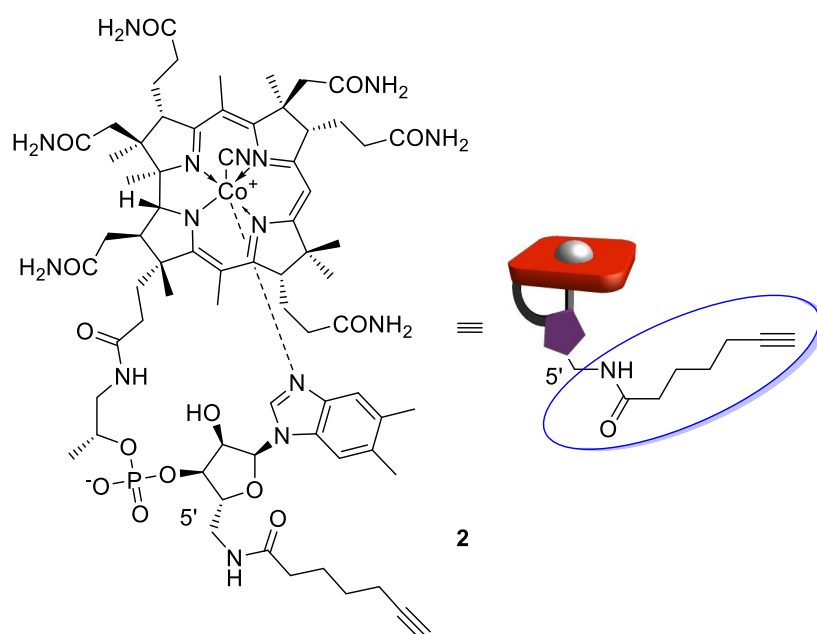


Figure 1. A simplified representation of *N*-(cobalamin-5'-yl)-hept-6-ynamide (**2**).

Following compounds were provided by FutureSynthesis Sp. z o. o.:

5'-N₃-deoxythymidine-CAU CUA GUA UUU CU-3' (**5a**):

MW: 4855.2 g/mol; Molar Ext.coeffic.: 148400 L· mol⁻¹· cm⁻¹

5'-N₃-hexyl-CAU CUA GUA UUU CU-3' (**5b**):

MW: 4730.2 g/mol; Molar Ext.coeffic.: 138900 L·mol⁻¹·cm⁻¹

5'-N₃-deoxythymidine-UUU CUA GUC UCA UA-3' (**5c**):

MW: 4855.2 g/mol; Molar Ext.coeffic.: 148600 L· mol⁻¹· cm⁻¹

R₁ =

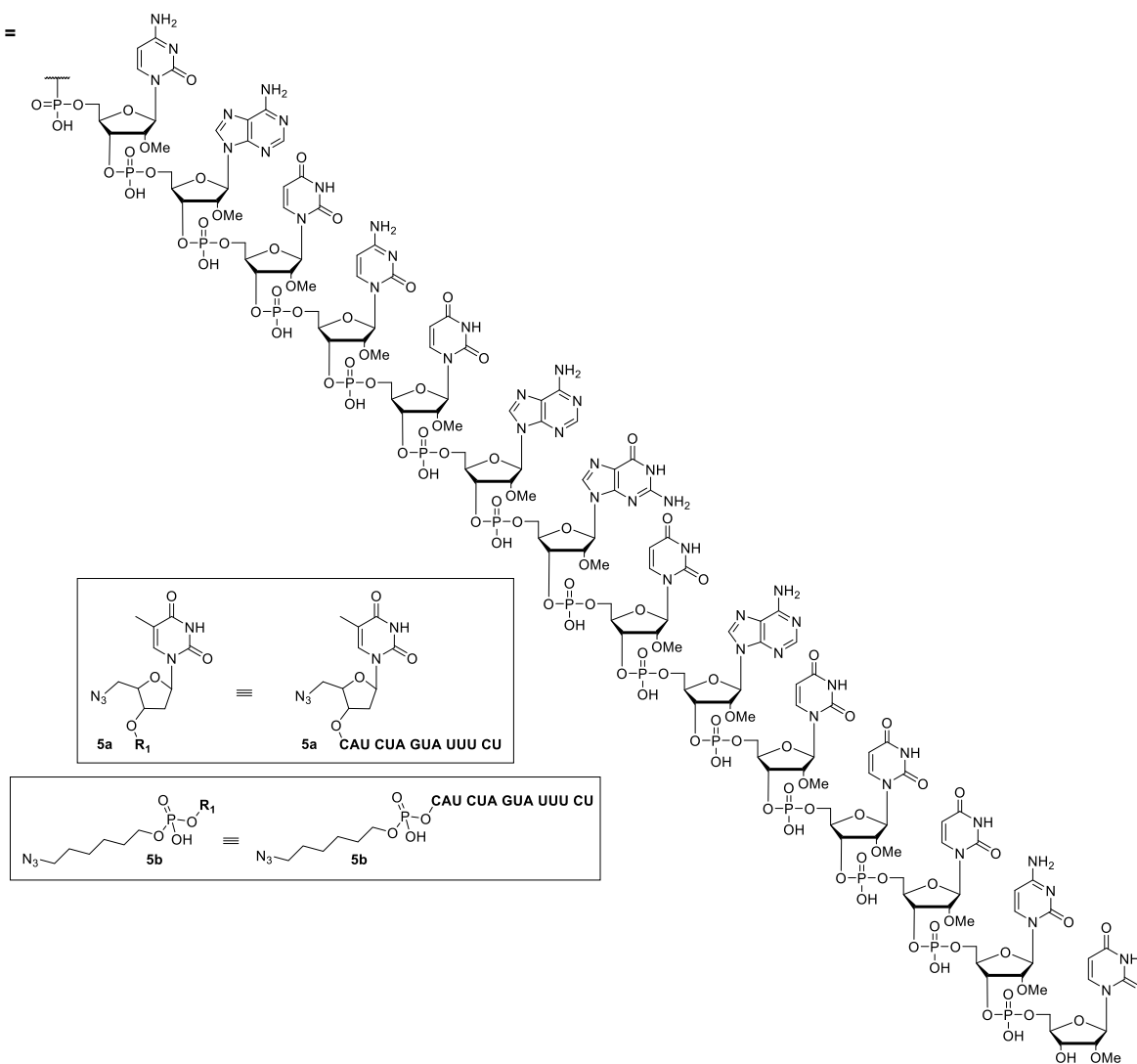


Figure 2. A simplified representation of 2'OMeRNA **5a** and **5b**.

$R_2 =$

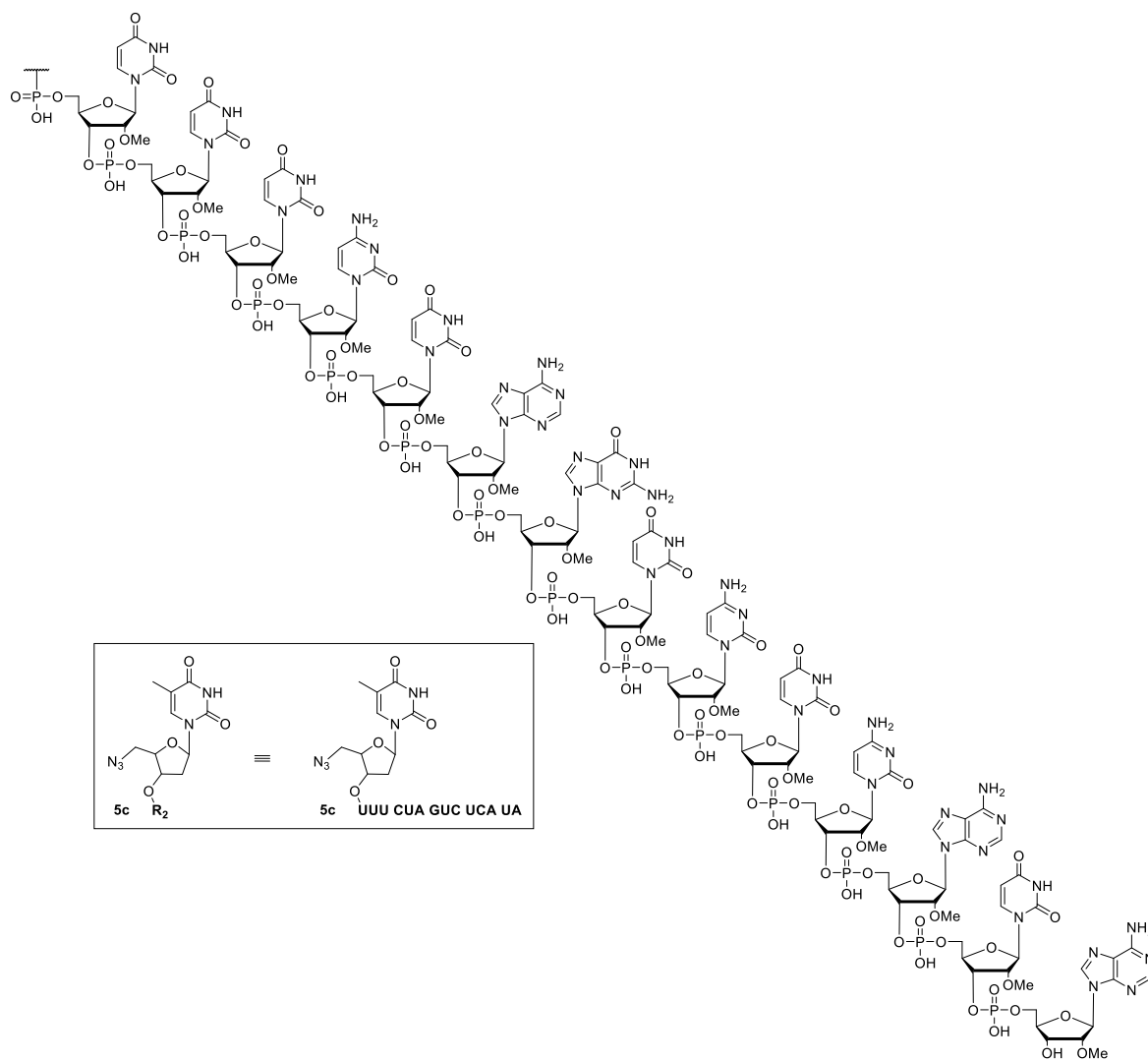


Figure 3. A simplified representation of scrambled 2'OMeRNA **5c**.

2. Biological information

Bacterial strains and determination of the level of fluorescence

To determine if vitamin B₁₂ transports 2'OMeRNA oligomers to bacterial cells we used bacteria carrying a plasmid encoding red fluorescent protein (RFP) as previously described.⁶ *Escherichia coli* K-12 MG1655⁷ and *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium LT2-R⁶ cells encoding the *mrfp1* gene were grown 20 h in Davis Minimal Broth at 37 °C with shaking. Culture was supplemented with kanamycin to prevent plasmid loss. The effect of vitamin B₁₂-2'OMeRNA conjugates on the production of the red fluorescence protein (RFP) was determined using a standard microdilution method at concentration range 0–16 μM. To obtain relative fluorescence values (RFU) the previously described method was used.⁶ Statistical significance was determined using the ANOVA with the probability value of $P \leq 0.05$ without further correction for multiple comparisons.

MTT based colorimetric assay for cytotoxic effect of 2'OMeRNA conjugated to vitamin B₁₂

The cytotoxic effect of 2'OMeRNA conjugated to vitamin B₁₂ was tested on HEK-293 cells. HEK-293 were cultured in DMEM medium with high glucose (Lonza) supplemented with 10% FBS (Biowest) and Penicillin-Streptomycin (50U/ml, Gibco) in 37 °C and 5% CO₂. Cells were seeded 10⁴ per well on 96 well plates. In next 24 hours the 2'OMeRNA oligomers conjugates were added in 16μM concentration. The treatment time was 48 hours. Furthermore 10 μl of 5 mg/ml 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Merck) was added to each well, in order to measure the cytotoxicity effect of tested compounds to HEK-293. 4 hours later cells were incubated overnight in 100 μl of 10% SDS in 0,01 M HCl to solubilize formazan produced from MTT (Tada et al. 1986). The plates were read by Synergy H1MFDG (Biotek) at 590 nm. The obtained results of cells incubated in 2'OMeRNA conjugated to vitamin B₁₂ were compared to results from untreated control cells.⁸

3. HPLC conditions

Following conditions were used for HPLC:

Column A: Kromasil C18, 5 μm , 250 mm \times 4.0 mm; pressure – 20 MPa; flow rate – 1 mL/min; room temperature; detection – UV/vis at wavelengths (λ) of 361 and 267 nm.

Column B: Kromasil Eternity-5-C18, 250 mm \times 4.6 mm; pressure – 10 MPa; flow rate – 1 mL/min; room temperature; detection – UV/vis at wavelengths (λ) of 361 and 267 nm.

Column C: Knauer C18, 5 μm , 250 mm \times 8 mm; pressure – 190 MPa; flow rate – 4.5 mL/min; room temperature; detection – UV/vis at wavelengths (λ) of 267 nm.

HPLC method 1:

Time [min]	H ₂ O + 0.2% TFA [%]	MeCN [%]
Initial	90	10
15	30	70

HPLC method 2:

Time [min]	H ₂ O + 0.2% TFA [%]	MeCN [%]
Initial	90	10
15	30	70
25	30	70

HPLC method 3:

Time [min]	Buffer pH = 7.5 [%]	MeCN [%]
Initial	90	10
13	75	25
15	10	90
17	10	90

HPLC method 4:

Time [min]	Buffer pH = 7.5 [%]	MeCN [%]
Initial	90	10
10	80	20
18	80	20
19	10	90
20	10	90

4. Preparation of stock solutions

10 mM Cu-TBTA complex in DMSO/water (v/v 11:9): Copper(II) sulfate pentahydrate (50 mg, 0.20 mmol) was dissolved in water (10 mL). TBTA ligand (116 mg, 0.22 mmol) was dissolved in DMSO (11 mL). Two solutions were then mixed.

2 M Triethylammonium acetate buffer, pH 7.0: Triethylamine (2.80 mL, 20 mmol) and acetic acid (1.10 mL, 20 mmol) were mixed. Water was added to 10 mL volume, and pH was adjusted to 7.0 with diluted solutions of triethylamine or acetic acid.

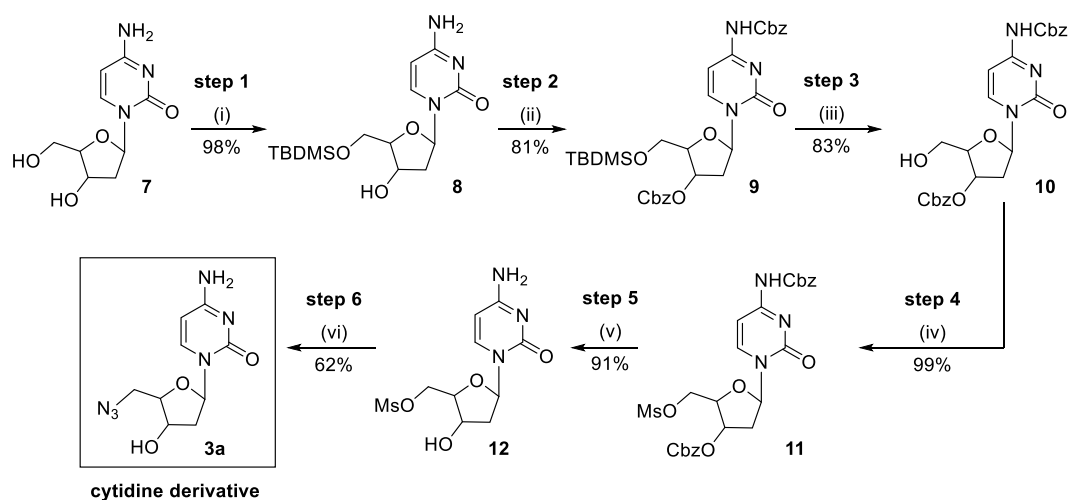
10 mM Ascorbic acid: Ascorbic acid (18 mg, 0.1 mmol) was dissolved in water (10 mL) and the mixture was degassed by bubbling argon and sonication for 15 minutes.

0.1 M Triethylammonium acetate buffer, pH 7.5: Glacial acetic acid (5.6 mL, 97 mmol) and trimethylamine (13.86 mL, 100 mmol) were dissolved in water (950 mL). pH was adjusted to 7.5 with diluted solutions of triethylamine or acetic acid.

5. Synthesis of 5'-azido-2'-deoxycytidine (**3a**)

2'-Deoxycytidine (**7**) was protected in 5' position with TBDMS according to the reported procedure (step 1),²³ followed by double protection of N⁴ and 3' positions with benzyloxycarbonyl group (step 2) and subsequent acidic removal of the silyl group (step 3). Resulting compound **10** displays only moderate solubility in typically used organic solvents (DCM, AcOEt, MeOH). This feature allows to easily monitor the progress of mesylation (step 4) since the initial suspension changes into transparent solution along with the formation of mesylate **11**. Hydrogenation of compound **11** in the presence of Pd/C deprotects both benzyloxycarbonyl groups (step 5). In the last step, 5' mesylate **12** undergoes substitution with the azide anion, yielding desired, model nucleoside **3a**. This approach presents a reliable and relatively high yielding route towards 5'-azide **3a** from commercially available 2'-deoxycytidine (**7**).

Scheme 1. The multistep synthesis of 5'-azido-2'-deoxycytidine (**3a**).^a

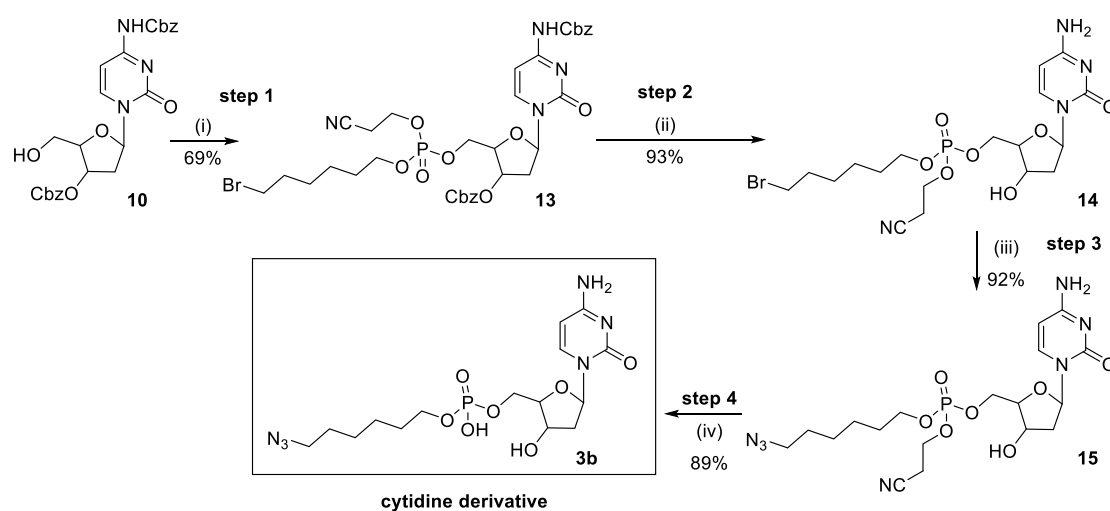


^a(i): 2'-deoxycytidine (**7**) (1 equiv.), TBDMS-Cl (1.1 equiv.), imidazole (1.3 equiv.), pyridine, rt, 9 h; (ii): nucleoside **8** (1 equiv.), Cbz-Cl (4 equiv.), DMAP (6 equiv.), DCM, 0 °C to rt, 20 h; (iii): nucleoside **9**, TFA, H₂O, THF, 0 °C to rt, 20 h; (iv): nucleoside **10** (1 equiv.), MsCl (2 equiv.), Et₃N (2 equiv.), DCM, 0 °C to rt, 15 min.; (v): nucleoside **11**, H₂, Pd/C, EtOH, THF, rt, 30 min; (vi): nucleoside **12** (1 equiv.), NaN₃ (4 equiv.), DMF, 40 °C, 20 h.

6. Synthesis of cytidine derivative 3b

To verify the reactivity of azide located at the terminal C-atom of a labile linker, we synthesized a cytidine analog **3b**. Subjecting 2'-deoxycytidine derivative **10** protected at N⁴ and 3' positions to the standard phosphoramidite method of nucleotide synthesis allowed for phosphate **13** decorated with bromine at the terminus of the hexyl chain (Scheme 2, step 1). At this point, no attempts were made to identify and separate potential diastereoisomers. After removal of Cbz protecting groups (step 2) bromide **14** was used as a substrate in nucleophilic substitution with -N⁻ to afford azide **15** (step 3). The last step involved basic deprotection of the phosphate group (step 4) which led to desired product **3b** in overall yield (steps 1-4) of 53%.

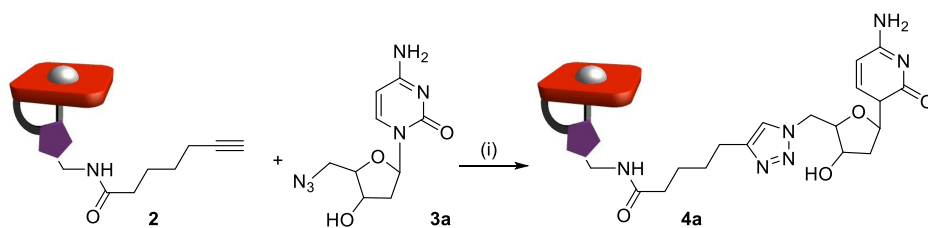
Scheme 2. The multistep synthesis of cytidine derivative **3b**.^a



^a(i): N⁴-3'-O-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (**10**) (1 equiv.), 6-Bromohexyl-2-cyanoethyl diisopropylphosphoramidite⁵ (1.2 equiv.), 4,5-dicyanoimidazole (3 equiv.), dry DCM, dry MeCN, rt, 4 h; (ii): nucleotide **13**, H₂, Pd/C, EtOH, THF, rt, 15 min; (iii): nucleotide **14** (1 equiv.) NaN₃ (5 equiv.), dry DMF, rt, 2 h; (iv): nucleotide **15**, Et₃N, MeOH, rt, 30 min.

7. Optimization of the model CuAAC reaction

Table 1. Optimization of the model CuAAC reaction conditions directed at high yield and low concentration of 5'-azido-2'-deoxycytidine (**3a**).^a

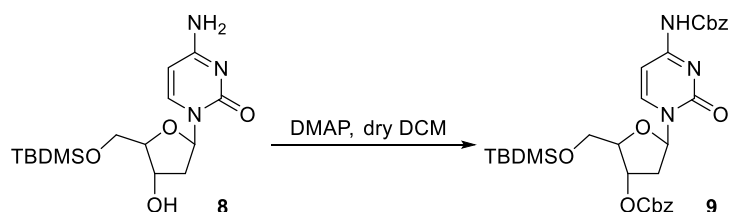


no	catalyst (concentration)	reducing agent	solvent	azide 3a [mM]	time [h]	yield [%]
1	CuSO ₄ -TBTA (0.5 mM)	AA	buffer/DMSO 1 : 1	20	48	44
2	CuSO ₄ -TBTA (1.5 mM)	AA	buffer /DMSO 1 : 1	20	4	92
3	CuSO ₄ -TBTA (3.0 mM)	AA	buffer /DMSO 1 : 1	20	4	89
4	CuSO ₄ -TBTA (1.5 mM)	AA	buffer /DMSO 4 : 1	20	4	74
5	CuSO ₄ -TBTA (1.5 mM)	AA	buffer /DMSO 11 : 1	20	4	62
6	CuSO ₄ (1.5 mM)	AA	buffer /DMSO 1 : 1	20	4	64
7	CuSO ₄ (1.5 mM)	AA	buffer	20	4	67
8	CuI-TBTA (1.5 mM)	-	buffer /DMSO 1 : 1	20	4	90
9	CuI (1.5 mM)	-	buffer /DMSO 1 : 1	20	4	62
10	CuOAc (1.5 mM)	-	buffer /DMSO 1 : 1	20	4	41
11	CuSO ₄ -TBTA (0.15 mM)	AA	buffer /DMSO 1 : 1	2	4	76
12	CuSO ₄ -TBTA (0.03 mM)	AA	buffer /DMSO 1 : 1	0.4	4	traces
13	CuSO ₄ -TBTA (0.15 mM)	AA	buffer /DMSO 1 : 1	2	20	84
14	CuSO ₄ -TBTA (0.08 mM)	AA	buffer /DMSO 1 : 1	1	20	61
15	CuSO ₄ -TBTA (0.15 mM)	AA	buffer /DMSO 1 : 1	1	20	96
16 ^b	CuSO ₄ -TBTA (0.15 mM)	AA	buffer /DMSO 1 : 1	0.5	20	95

^a(i): azide **3a**, alkyne **2** (1 equiv.), solvent (0.5 ml), buffer pH = 7.0 (2 M), rt; L-ascorbic acid (AA) is used in an equimolar amount to the catalyst. ^b2 equiv. of alkyne **2** were used.

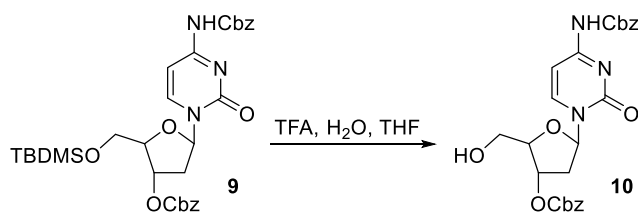
8. Experimental procedures

5'-O-*tert*-Butyldimethylsilyl-N⁴-3'-O-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (**9**)



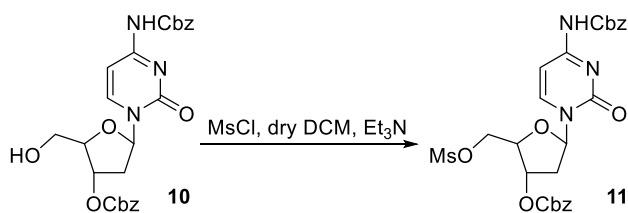
A Schlenk flask equipped with a stirring bar was charged with 5'-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2'-deoxycytidine (**8**, 340 mg, 1.0 mmol) and DMAP (730 mg, 6.0 mmol). Dry DCM (12.5 mL) was added under an Ar atmosphere and the reaction mixture was cooled down to 0 °C. Benzyl chloroformate (570 μ L, 4.0 mmol) was added dropwise and the resulting mixture was allowed to warm-up to room temperature and stirred for 20 h. Then it was diluted with DCM (50 mL) and washed consecutively with cold 1.0 M HCl_{aq} (10 mL), water (20 mL), and brine (20 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified using DCVC, normal phase, gradually from 0% to 2% MeOH (v/v) in DCM to afford product **9** as a white solid (493 mg, 81%). R_f 0.62, 1:30 MeOH in DCM (normal phase). *t_R* (reverse phase-HPLC, column A, method 2): 16.73 min. m.p. 47-48 °C. Anal. calcd for C₃₁H₃₉N₃O₈Si: C 61.06, H 6.45, N 6.89, found: C 61.12, H 6.51, N 7.00. HRMS ESI calcd for C₃₁H₃₉N₃O₈SiNa [M+Na]⁺ 632.2404, found: 632.2399. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 8.24 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.45 – 7.30 (m, *J* = 2.5 Hz, 10H), 7.18 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.32 (dd, *J* = 7.8, 5.7 Hz, 1H), 5.26 – 5.11 (m, 5H), 4.33 – 4.21 (m, *J* = 1.9 Hz, 1H), 3.91 (ddd, *J* = 31.3, 11.4, 2.2 Hz, 2H), 2.82 (dd, *J* = 14.1, 5.4 Hz, 1H), 2.13 (ddd, *J* = 14.1, 7.8, 6.2 Hz, 1H), 0.89 (s, 9H), 0.10 (s, 3H), 0.09 (s, 3H). ¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 162.3, 154.9, 154.6, 152.4, 144.2, 135.1, 134.9, 128.8, 128.8, 128.5, 128.4 (signals from phenyl rings overlap), 94.7, 87.3, 85.7, 78.7, 70.1, 68.0, 63.5, 39.7, 26.0, 18.3, -5.4, -5.5.

***N*⁴-3'-*O*-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (**10**)**



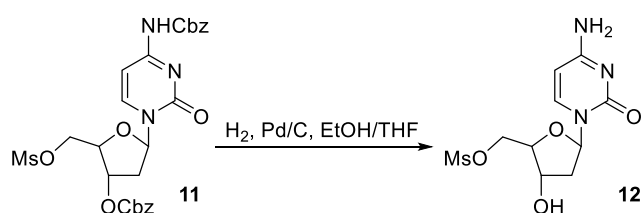
A round-bottomed flask equipped with a stirring bar was charged with 5'-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-*N*⁴-3'-*O*-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (**9**, 914 mg, 1.5 mmol). The substrate was dissolved in THF (8 mL). The solution was cooled down to 0 °C and aqueous TFA solution (2 mL, v/v 50%) was added. The resulting mixture was allowed to warm-up to room temperature and then stirred for 20 h. During this time precipitation of white solid was observed. The suspension was quenched with saturated NaHCO_{3aq} (20 mL) and extracted with AcOEt (4 x 50 mL). Combined organic layers were washed with H₂O (20 mL), dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified using DCVC, normal phase, gradually from 3% to 5% MeOH in DCM (v/v) to afford product **10** as a white solid (616 mg, 83%). *R*_f 0.39, 1:30 MeOH in DCM (normal phase); *R*_f 0.31, 1:3 H₂O in MeOH (reverse phase). *t*_R (reverse phase-HPLC, column A, method 2): 15.02 min. m.p. 188-189 °C. Anal. calcd for C₂₅H₂₅N₃O₈: C 60.60, H 5.09, N 8.48, found: C 60.85, H 4.86, N 8.58. HRMS ESI calcd for C₂₅H₂₅N₃O₈Na [M+Na]⁺ 518.1539, found: 518.1531. ¹H NMR ((CD₃)₂SO, 400 MHz) δ 10.81 (s, 1H), 8.26 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.50 – 7.21 (m, 10H), 7.05 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.10 (dd, *J* = 7.9, 5.9 Hz, 1H), 5.32 – 5.00 (m, *J* = 5.1 Hz, 6H), 4.21 – 4.08 (m, *J* = 1.7 Hz, 1H), 3.63 (s, 2H), 2.61 – 2.49 (m, 1H), 2.34 – 2.12 (m, 1H). ¹³C NMR ((CD₃)₂SO, 101 MHz) δ 163.4, 154.6, 154.2, 153.6, 145.0, 136.4, 135.7, 129.0, 128.91, 128.90, 128.7, 128.6, 128.4, 95.0, 86.7, 85.7, 79.1, 69.7, 67.0, 61.6, 38.6.

5'-Methanesulfonyl-N⁴-3'-O-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (**11**)



A Schlenk flask equipped with a stirring bar was charged with N⁴-3'-O-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (**10**, 250 mg, 0.5 mmol). Dry DCM (20 mL) and triethylamine (140 μ L, 1 mmol) were added under an Ar atmosphere forming a suspension. The reaction mixture was cooled down to 0 °C and methanesulfonyl chloride (77 μ L, 1 mmol) was added dropwise. The resulting mixture was allowed to warm-up to room temperature and stirred for 15 min. Cloudy mixture gradually transformed into transparent solution, indicating the reaction progress. After that it was diluted with DCM (30 mL) and washed consecutively with water (10 mL), saturated NH₄Cl_{aq} (10 mL), saturated NaHCO_{3aq} (10 mL), and brine (10 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified using DCVC, normal phase, gradually from 0% to 2% MeOH in DCM (v/v) to afford product **11** as a thick, transparent oil (284 mg, 99%). R_f 0.58, 1:30 MeOH in DCM (normal phase). *t_R* (reverse phase-HPLC, column A, method 2): 16.27 min. Anal. calcd for C₂₆H₂₇N₃O₁₀S: C 54.45, H 4.74, N 7.33, found: C 54.43, H 4.81, N 7.38. HRMS ESI calcd for C₂₆H₂₇N₃O₁₀SNa [M+Na]⁺ 596.1315, found: 596.1309. ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.98 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.50 – 7.13 (m, *J* = 25.2, 12.7 Hz, 11H), 6.23 (dd, *J* = 7.9, 5.8 Hz, 1H), 5.31 – 5.06 (m, *J* = 14.5, 9.9 Hz, 5H), 4.53 (ddd, *J* = 14.9, 11.3, 3.2 Hz, 2H), 4.42 – 4.27 (m, *J* = 3.0 Hz, 1H), 3.05 (s, 3H), 2.90 – 2.72 (m, *J* = 10.0 Hz, 1H), 2.21 (dt, *J* = 14.7, 7.3 Hz, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃, 101 MHz) δ 162.5, 154.6, 154.4, 152.2, 143.8, 135.0, 134.6, 128.8, 128.69, 128.65, 128.6, 128.4, 128.3, 95.2, 87.3, 82.4, 77.3, 70.3, 68.4, 68.0, 38.3, 37.7.

5'-Methanesulfonyl-2'-deoxycytidine (**12**)

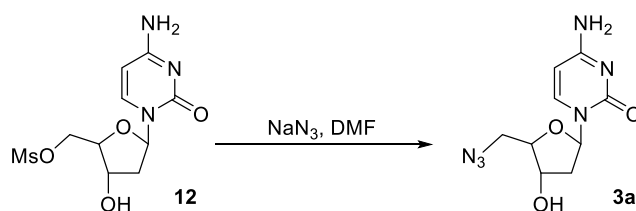


To a Schlenk flask equipped with a stirring bar palladium on carbon (10 wt. %, 50 mg) was added. It was then closed with a septum with two needles and purged with Ar for 10 min. followed by hydrogen for an additional 10 min. in order to activate the catalyst.

Attention: Hydrogen is highly flammable. No oxygen can be present in the flask as it may cause rapid ignition in the presence of Pd/C. Therefore initial purging with argon is absolutely necessary!

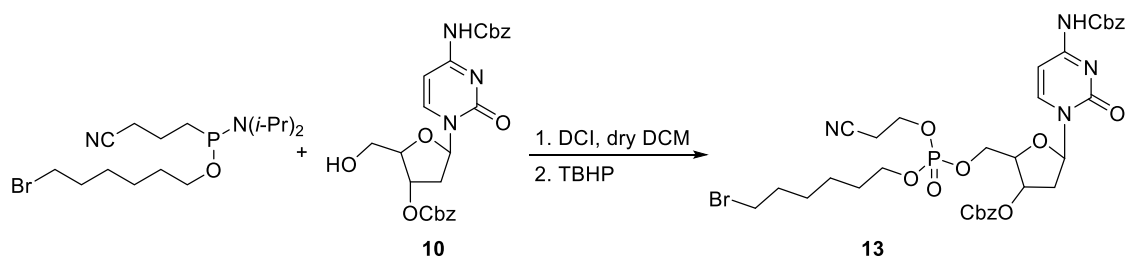
In a separate flask 5'-methanesulfonyl-*N*⁴-3'-*O*-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (**11**, 143 mg, 0.25 mmol) was dissolved in THF/EtOH (20 mL, v/v 1:3) and the resulting solution was purged with Ar for 15 min. It was added drop-wise to the activated Pd/C under a hydrogen atmosphere. The solution was purged with hydrogen for 30 min. It was then filtered through cotton wool and concentrated *in vacuo*. The residue was purified using DCVC, normal phase, gradually from 10% to 20% MeOH in DCM (v/v) to afford product **12** as a thick, transparent oil (69 mg, 91%). *R*_f 0.34, 1:6 MeOH in DCM (normal phase). *t*_R (reverse phase-HPLC, column A, method 1): 3.92 min. HRMS ESI calcd for C₁₀H₁₅N₃O₆S Na [M+Na]⁺ 328.0579, found: 328.0567. ¹H NMR ((CD₃)₂SO, 400 MHz) δ 7.57 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.18 (d, *J* = 15.9 Hz, 2H), 6.19 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H), 5.72 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 5.45 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 4.43 – 4.24 (m, *J* = 27.6, 11.0 Hz, 2H), 4.24 – 4.13 (m, *J* = 8.7 Hz, 1H), 4.01 – 3.86 (m, *J* = 6.5 Hz, 1H), 3.19 (s, 3H), 2.17 – 1.92 (m, 2H). ¹³C NMR ((CD₃)₂SO, 101 MHz) δ 166.0, 155.4, 141.3, 94.8, 85.6, 83.8, 70.7, 70.1, 49.1, 37.2

5'-Azido-2'-deoxycytidine (**3a**)



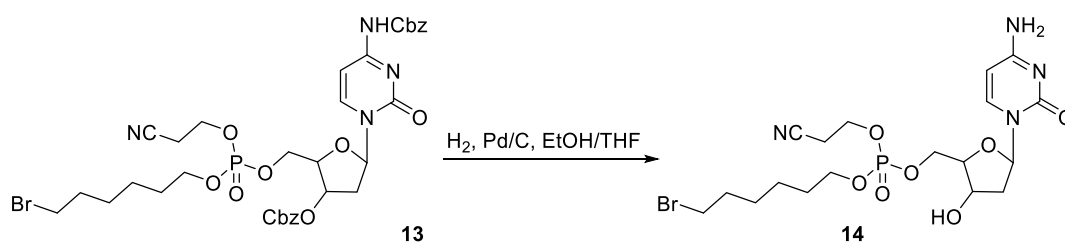
A Schlenk flask equipped with a stirring bar was charged with 5'-methanesulfonyl-2'-deoxycytidine (**12**, 76 mg, 0.25 mmol) and sodium azide (65 mg, 1 mmol). Dry DMF (10 mL) was then added under an Ar atmosphere and the reaction mixture was stirred at 40 °C for 20 h. The solvent was removed under reduced pressure. The residue was purified using DCVC, normal phase, 10% MeOH (v/v) in DCM to afford product **3a** as a white solid (39 mg, 62%). R_f 0.58, 1:6 MeOH in DCM (normal phase). t_R (reverse phase-HPLC, column A, method 1): 4.48 min. m.p. 175-177 °C. Anal. calcd for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_3$: C 42.86, H 4.80, N 33.32, found: C 42.87, H 4.88, N 33.10. HRMS ESI calcd for $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_3\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 275.0869, found: 275.0863. ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 7.75 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.24 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 5.91 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.29 (dt, $J = 6.8, 4.2$ Hz, 1H), 3.97 (dd, $J = 9.0, 4.0$ Hz, 1H), 3.69 – 3.48 (m, 2H), 2.41 – 2.28 (m, 1H), 2.23 – 2.09 (m, $J = 13.7$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (CD_3OD , 101 MHz) δ 166.2, 156.7, 140.8, 94.8, 86.0, 84.9, 71.0, 52.0, 39.9.

5'-(6-Bromohex-1-yloxy-2-cyanoethoxy)phosphoryl-*N*⁴-3'-*O*-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (13)



A Schlenk flask equipped with a stirring bar was charged with 6-bromohexyl-2-cyanoethyl diisopropylphosphoramidite⁴ (113 mg, 0.3 mmol) and dried under vacuum for 3 h. Dry DCM (10 mL) and dry MeCN (5 mL) were added under an Ar atmosphere, followed by *N*⁴-3'-*O*-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (**10**, 124 mg, 0.25 mmol) and 4,5-dicyanoimidazole (89 mg, 0.75 mmol), which were dried under vacuum for 3 h prior to use. The reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h. It was then cooled to 0 °C and *tert*-butyl hydroperoxide solution in decane (5.5 M, 270 μ L, 1.5 mmol) was added. The resulting mixture was allowed to warm-up to room temperature and stirred for 2 h. It was diluted with DCM (30 mL) and washed consecutively with 10% Na₂SO₃aq (10 mL) and brine (10 mL). The organic layer was dried over Na₂SO₄, filtered and concentrated *in vacuo*. The residue was purified using DCVC, reverse phase, gradually from 66% to 75% MeOH in water (v/v) to afford product **13** as a thick, colorless oil (136 mg, 69%). *R*_f 0.44, 1:40 MeOH in DCM (normal phase); *R*_f 0.30, 1:3 H₂O in MeOH (reverse phase); *t*_R (reverse phase-HPLC, column A, method 2): 18.35 min. Anal. Calcd for C₃₄H₄₀BrN₄O₁₁P: C 51.59, H 5.09, N 7.08, found: C 51.45, H 5.31, N 6.82. HRMS ESI calcd for C₃₄H₄₀BrN₄O₁₁PNa [M+Na]⁺ 813.1512, found: 813.1508. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 8.17 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.61 – 7.09 (m, 11H), 6.26 – 6.12 (m, 1H), 5.33 – 5.26 (m, *J* = 4.0, 2.7 Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 5.20 (s, 2H), 4.47 – 4.33 (m, *J* = 13.9, 7.3 Hz, 3H), 4.27 (dt, *J* = 7.3, 5.9 Hz, 2H), 4.13 (dd, *J* = 13.7, 6.5 Hz, 2H), 3.41 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 2.87 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.81 – 2.68 (m, *J* = 14.6, 8.3 Hz, 1H), 2.39 – 2.23 (m, *J* = 14.5 Hz, 1H), 1.89 – 1.76 (m, *J* = 14.0 Hz, 2H), 1.75 – 1.62 (m, 2H), 1.51 – 1.34 (m, 4H). ¹³C NMR (CD₃OD, 101 MHz) δ 163.7, 156.0, 154.4, 144.0, 135.7, 135.3, 128.3, 128.26, 128.25, 128.1, 128.0, 127.9, 117.1, 95.7, 87.6, 83.4, 83.3, 77.4, 69.7, 68.74, 68.67, 67.2, 62.9, 62.8, 48.0, 47.8, 47.6, 47.4, 47.2, 37.9, 32.9, 32.3, 29.7, 29.6, 27.2, 24.2, 18.8, 18.7. ³¹P NMR (CD₃OD, 162 MHz) δ 1.88, 1.93.

5'-(6-Bromohex-1-yloxy-2-cyanoethoxy)phosphoryl-2'-deoxycytidine (**14**)

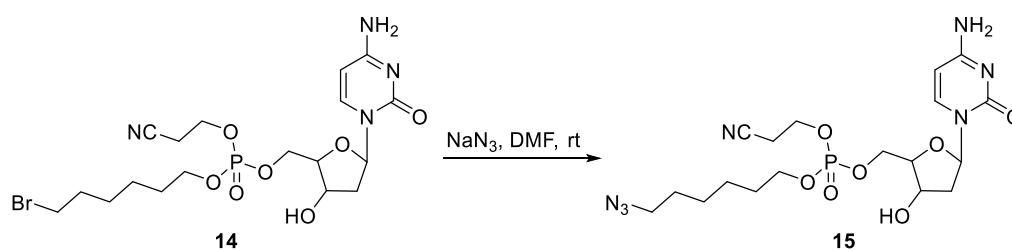


In a Schlenk flask palladium on carbon (10 wt. %, 25 mg) and a stirring bar were placed. It was then equipped with a septum, two needles and purged with Ar for 10 min. followed by hydrogen for an additional 10 min. in order to activate the catalyst.

Attention: Hydrogen is highly flammable. No oxygen can be present in the flask as it may cause rapid ignition in the presence of Pd/C. Therefore initial purging with argon is absolutely necessary!

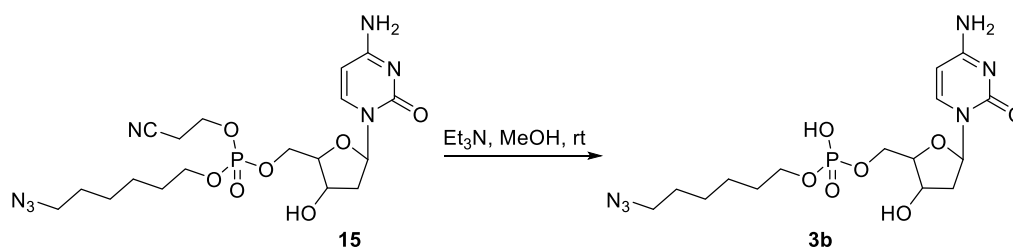
In a separate flask 5'-(6-bromohex-1-yloxy-2-cyanoethoxy)phosphoryl-*N*⁴-3'-*O*-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (**13**, 80 mg, 0.1 mmol) was dissolved in THF/EtOH (10 mL, v/v 1:3) and the resulting solution was purged with Ar for 15 min. It was added drop-wise to the activated Pd/C under a hydrogen atmosphere. The solution was purged with hydrogen for 30 min. It was then filtered through cotton wool and concentrated *in vacuo*. The residue was purified using DCVC, normal phase, gradually from 5% to 10% MeOH in DCM (v/v) to afford product **14** as a thick, colorless oil (49 mg, 93%). *R*_f 0.39, 1:6 MeOH in DCM (normal phase); *t*_R (reverse phase-HPLC, column A, method 1): 10.13 min. Anal. Calcd for C₁₈H₂₈BrN₄O₇P: C 41.31, H 5.39, N 10.71, found: C 41.28 H 5.55 N 10.64. HRMS ESI calcd for C₁₈H₂₉BrN₄O₇P [M+H]⁺ 523.0957, found: 523.0950. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 7.76 (dd, *J* = 7.5, 2.0 Hz, 1H), 6.26 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 5.92 (dd, *J* = 7.5, 2.0 Hz, 1H), 4.41 – 4.22 (m, 5H), 4.18 – 4.05 (m, 3H), 3.49 – 3.38 (m, *J* = 11.2, 4.5 Hz, 2H), 2.93 – 2.83 (m, *J* = 10.2, 5.5 Hz, 2H), 2.45 – 2.33 (m, *J* = 16.8, 8.9 Hz, 1H), 2.19 – 2.08 (m, 1H), 1.91 – 1.78 (m, 2H), 1.77 – 1.66 (m, 2H), 1.54 – 1.35 (m, 4H). ¹³C NMR (CD₃OD, 101 MHz) δ 166.2, 156.7, 140.8, 117.1, 94.8, 86.2, 84.8, 84.7, 70.3, 68.6, 68.5, 67.4, 62.74, 62.69, 40.2, 32.9, 32.3, 29.7, 29.6, 27.2, 24.2, 18.8, 18.7. ³¹P NMR (CD₃OD, 162 MHz) δ 1.88, 1.90.

5'-(6-Azidohex-1-yloxy-2-cyanoethoxy)phosphoryl-2'-deoxycytidine (**15**)



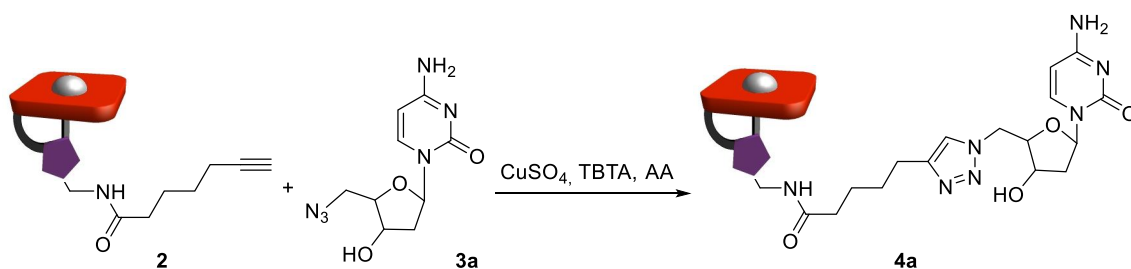
A Schlenk flask equipped with a stirring bar was charged with 5'-(6-bromohex-1-yloxy-2-cyanoethoxy)phosphoryl-2'-deoxycytidine (**14**, 42 mg, 0.08 mmol) and sodium azide (26 mg, 0.4 mmol). Dry DMF (2 mL) was added under an Ar atmosphere and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The solvent was removed under reduced pressure at 30 °C. The residue was purified using DCVC, normal phase, gradually from 5% to 20% MeOH in DCM (v/v) to afford product **15** as a thick, colorless oil (36 mg, 92%). R_f 0.25, 1:6 MeOH in DCM (normal phase); t_R (reverse phase-HPLC, column A, method 1): 9.73 min. HRMS ESI calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_7\text{PNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 508.1686, found: 508.1672. ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz) δ 7.77 (dd, $J = 7.5, 1.8$ Hz, 1H), 6.27 (t, $J = 6.6$ Hz, 1H), 5.95 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.45 – 4.20 (m, 5H), 4.14 (dd, $J = 13.8, 6.5$ Hz, 2H), 4.10 – 4.02 (m, $J = 8.5, 4.2$ Hz, 1H), 3.30 – 3.20 (m, 2H), 2.95 – 2.84 (m, 2H), 2.44 – 2.30 (m, 1H), 2.15 (dt, $J = 13.6, 6.7$ Hz, 1H), 1.80 – 1.66 (m, 2H), 1.63 – 1.52 (m, $J = 14.6, 7.4$ Hz, 2H), 1.48 – 1.33 (m, 4H). ^{13}C NMR (CD_3OD , 101 MHz) δ 166.1, 156.8, 140.9, 117.1, 95.0, 86.2, 84.9, 84.8, 70.3, 68.62, 68.55, 67.42, 67.36, 62.8, 62.7, 50.9, 40.1, 29.74, 29.67, 28.3, 25.9, 24.7, 18.8, 18.7. ^{31}P NMR (CD_3OD , 162 MHz) δ 1.90, 1.94.

5'-(6-Azidohex-1-yloxy)phosphoryl-2'-deoxycytidine (**3b**)



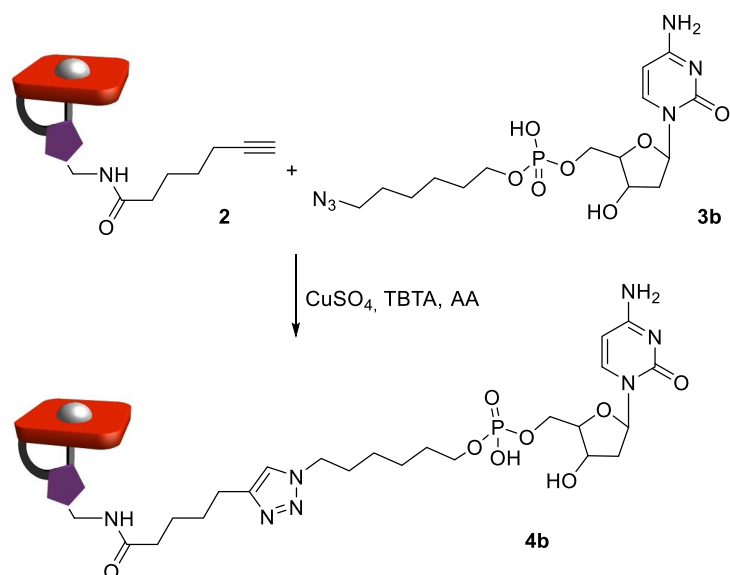
A round-bottomed flask equipped with a stirring bar was charged with 5'-(6-azidohex-1-yloxy-2-cyanoethoxy)phosphoryl-2'-deoxycytidine (**15**, 24 mg, 0.05 mmol). MeOH (2 mL) was added followed by Et₃N (0.5 mL). The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. The solvent and amine were removed under reduced pressure and the residue was purified using DCVC, normal phase: 1) first 50 mL of 15% MeOH in DCM + 0.5% TFA (v/v) was used as an eluent, 2) then the chromatography was continued with MeOH in DCM, gradually from 25% to 50% to afford product **3b** as a white solid (19 mg, 89%). R_f 0.36, 2:3 MeOH in DCM (normal phase); t_R (reverse phase-HPLC, column A, method 1): 7.35 min. m.p. 134-136 °C. HRMS ESI calcd for C₁₅H₂₅N₆O₇PNa [M+Na]⁺ 455.1420, found: 455.1411. ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 8.31 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.23 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 6.11 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.51 – 4.43 (m, 1H), 4.16 – 3.98 (m, *J* = 15.8 Hz, 3H), 3.88 (q, *J* = 6.4 Hz, 2H), 3.27 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.44 – 2.34 (m, *J* = 13.6, 9.8 Hz, 1H), 2.32 – 2.21 (m, *J* = 13.2 Hz, 1H), 1.71 – 1.53 (m, 4H), 1.49 – 1.33 (m, 4H). ¹³C NMR (CD₃OD, 101 MHz) δ 160.9, 148.9, 144.5, 93.7, 86.9, 86.8, 86.6, 70.7, 65.3, 65.2, 64.4, 51.0, 40.5, 30.33, 30.25, 28.4, 26.1, 25.1. ³¹P NMR (CD₃OD, 162 MHz) δ 0.05.

Nucleoside-vitamin B₁₂ conjugate **4a**



A round-bottomed flask equipped with a stirring bar was charged with 5'-azido-2'-deoxycytidine (**3a**, 2.5 mg, 0.01 mmol) and *N*-(cobalamin-5'-yl)-hept-6-ynamide (**2**, 29 mg, 0.02 mmol). DMSO (9.84 mL) was added, followed by water (8.6 mL), triethylammonium acetate buffer stock solution (2 M, 1 mL), Cu-TBTA (10 mM in DMSO/water: v/v 11:9) stock solution (300 μ L) and ascorbic acid stock solution (10 mM, 300 μ L). The reaction mixture was stirred for 20 h at room temperature. It was then concentrated under reduced pressure, transferred to Falcon tube, and acetone/hexane (50 mL, v/v 1:1) was added. The mixture was centrifuged and a colorless supernatant was decanted. Acetone (50 mL) was added and the suspension was sonicated and centrifuged once more. Solid precipitate was purified using DCVC, reverse phase, gradually from 10% to 20% MeCN in water (v/v) to afford product **4a** as a purple solid (17 mg, 95%). R_f 0.44, 1:3 MeCN in H₂O (reverse phase); t_R (reverse phase-HPLC, column B, method 1): 6.73 min. Anal. calcd for C₇₉H₁₀₉CoN₂₁O₁₇P · 8H₂O: C 51.04, H 6.78, N 15.82, found: C 50.94, H 6.76, N 15.89. HRMS ESI calcd for C₇₉H₁₀₉CoN₂₁O₁₇PNa [M+Na]⁺ 1736.7278, found: 1736.7258. UV-Vis (H₂O) λ_{max} (nm) (ϵ , L mol⁻¹ cm⁻¹) 551 (7.3 × 10³), 517 (6.6 × 10³), 362 (2.3 × 10⁴), 274 (1.9 × 10⁴). ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.84 (s, 1H), 7.40 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.29 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 6.20 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 5.87 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 4.71 (qd, J = 14.5, 5.1 Hz, 2H), 4.59 – 4.44 (m, 2H), 4.35 (dd, J = 10.6, 4.9 Hz, 1H), 4.30 (dd, J = 14.7, 7.6 Hz, 1H), 4.20 (dd, J = 9.6, 4.7 Hz, 1H), 4.18 – 4.15 (m, 1H), 4.12 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 3.94 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 3.85 (d, J = 13.3 Hz, 1H), 3.66 (d, J = 13.9 Hz, 1H), 3.61 (dd, J = 10.6, 5.0 Hz, 1H), 3.39 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 2.89 – 1.84 (m, 26H), 2.58 (s, 6H), 2.28 (s, 3H), 2.27 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 1.82 – 1.64 (m, 6H), 1.50 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.27 (d, J = 5.8 Hz, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.33 – 1.04 (m, 3H), 0.43 (s, 3H). ¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz) δ 181.6, 180.1, 177.7, 177.3, 176.6, 175.9, 175.5, 175.3, 174.6, 174.0, 167.6, 167.3, 166.9, 158.1, 149.0, 143.4, 142.5, 138.2, 135.7, 133.9, 131.4, 124.6, 117.8, 112.5, 108.7, 105.1, 96.3, 95.7, 87.7, 87.6, 86.4, 85.6, 80.5, 78.3, 76.3, 73.8, 72.4, 70.8, 60.3, 57.7, 57.0, 54.5, 52.6, 52.5, 49.4, 48.4, 46.9, 44.0, 43.0, 41.6, 40.6, 40.1, 36.9, 36.2, 35.4, 33.7, 33.1, 32.9, 32.4, 32.3, 30.0, 29.5, 27.41, 27.35, 26.2, 26.0, 20.9, 20.5, 20.4, 20.3, 19.9, 17.5, 17.0, 16.4, 16.1.

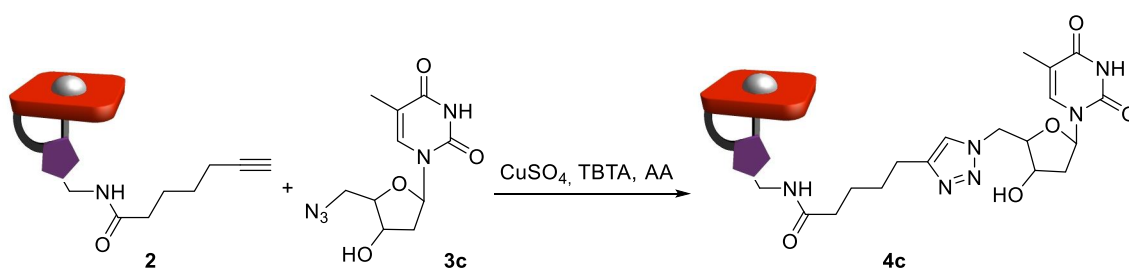
Nucleotide-vitamin B₁₂ conjugate **4b**



A round-bottomed flask equipped with a stirring bar was charged with 5'-(6-azidohex-1-yloxy)phosphoryl-2'-deoxycytidine (**3b**, 2.2 mg, 0.005 mmol) and *N*-(cobalamin-5'-yl)-hept-6-ynamide (**2**, 14.6 mg, 0.01 mmol). DMSO (5 mL) was added, followed by water (4.28 mL), triethylammonium acetate buffer stock solution (2 M, 500 μ L), Cu-TBTA (10 mM in DMSO/water: v/v 11:9) stock solution (150 μ L) and ascorbic acid stock solution (10 mM, 150 μ L). The reaction mixture was stirred for 20 h at room temperature. It was then concentrated under reduced pressure, transferred to Falcon tube, and acetone/hexane (50 mL, v/v 1:1) was added. The mixture was centrifuged and a colorless supernatant was decanted. Acetone (50 mL) was added and the suspension was sonicated and centrifuged once more. Solid precipitate was purified using DCVC, reverse phase: 1) first 30 mL of 10% MeCN in water + 0.5% TFA (v/v) was used as an eluent, 2) then the chromatography was continued with MeCN in water, gradually from 15% to 20% to afford product **4b** as a purple solid (7.4 mg, 78%). R_f 0.43, 1:3 MeCN in H₂O (reverse phase); t_R (reverse phase-HPLC, column B, method 1): 7.03 min. Anal. Calcd for C₈₅H₁₂₂CoN₂₁O₂₁P₂ · 9H₂O: C 49.63, H 6.86, N 14.30, found: C 49.27, H 6.72, N 13.91. HRMS ESI calcd for C₈₅H₁₂₂CoN₂₁O₂₁P₂Na₂ [M+2Na]²⁺ 1939.7716, found: 969.8898. UV-Vis (H₂O) λ_{max} (nm) (ϵ , L mol⁻¹ cm⁻¹) 550 (6.7 × 10³), 516 (6.1 × 10³), 361 (2.1 × 10⁴), 277 (1.9 × 10⁴). ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 8.28 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.30 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 6.24 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 6.11 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 6.05 (s, 1H), 4.60 – 4.54 (m, 1H), 4.54 – 4.49 (m, 1H), 4.49 – 4.44 (m, 1H), 4.36 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 4.34 – 4.26 (m, 1H), 4.18 (t, J = 3.4 Hz, 1H), 4.12 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 4.11 – 4.00 (m, 3H), 3.96 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 3.91 – 3.81 (m, 3H), 3.72 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 3.65 (d, J = 13.9 Hz, 1H), 3.61 (dd, J = 10.7, 5.1 Hz, 1H), 3.38 (d, J = 11.0 Hz, 1H), 2.90 – 1.85 (m, 27H), 2.57 (s, 6H), 2.28 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 1.82 – 1.68 (m, 5H), 1.66 – 1.58 (m, 2H), 1.50 (s, 3H), 1.44 (m, 2H), 1.40 – 1.23 (m, 5H), 1.37 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.26 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.12 (m, 1H), 0.44 (s, 3H). ¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz) δ 181.7, 180.1, 177.8, 177.7, 177.4, 176.6, 176.0, 175.6, 175.4, 174.7, 174.1, 167.3, 166.9, 162.8, 148.9, 145.7, 143.4, 138.3, 135.7, 133.9, 131.5, 123.3, 117.9, 112.5, 108.8, 105.1, 95.7, 95.3, 88.3, 88.2, 88.0, 87.7,

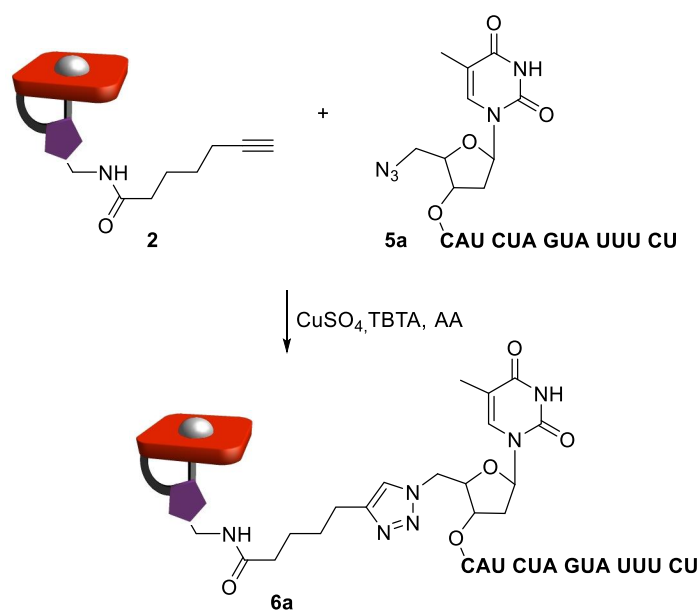
86.5, 80.63, 80.59, 78.2, 76.4, 73.92, 73.86, 72.2, 70.9, 68.9, 66.62, 66.57, 65.92, 65.87, 60.3, 57.7, 57.1, 54.7, 52.6, 51.2, 49.5, 49.3, 49.2, 48.5, 46.93, 46.89, 44.1, 43.1, 41.9, 41.6, 40.1, 36.9, 36.3, 35.5, 33.8, 33.1, 33.0, 32.5, 32.3, 31.7, 31.6, 31.3, 30.2, 29.6, 27.5, 27.4, 27.2, 26.5, 26.4, 26.3, 26.1, 20.9, 20.51, 20.46, 20.33, 20.29, 20.27, 20.0, 17.5, 17.2, 16.4, 16.2. ^{31}P NMR (CD_3OD , 202 MHz) δ 0.29, 0.06.

Nucleoside-vitamin B₁₂ conjugate **4c**



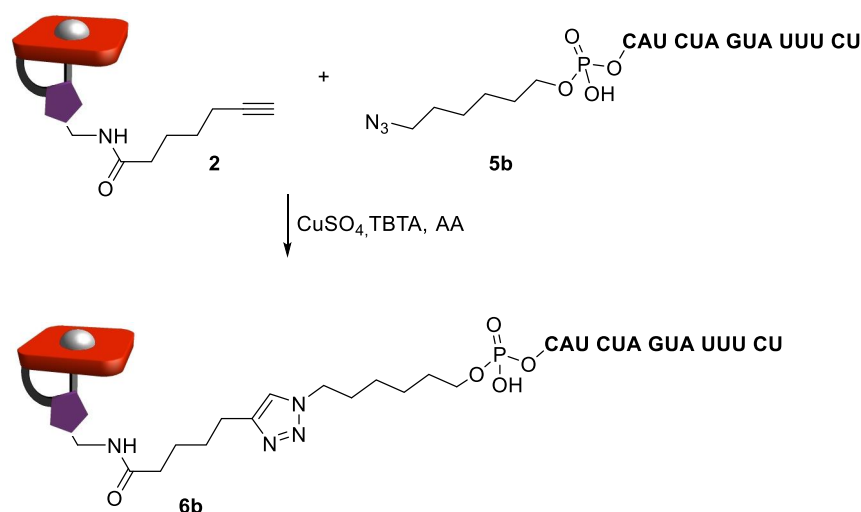
A round-bottomed flask equipped with a stirring bar was charged with 5'-azido-thymidine (**3c**, 5.4 mg, 0.02 mmol) and *N*-(cobalamin-5'-yl)-hept-6-ynamide (**2**, 29 mg, 0.02 mmol). DMSO (470 μ L) was added, followed by water (380 μ L), Triethylammonium acetate buffer stock solution (2 M, 50 μ L), Cu- TBTA (10 mM in DMSO/water: v/v 11:9) stock solution (50 μ L) and freshly prepared ascorbic acid solution (10 mM, 50 μ L). The reaction mixture was stirred for 48 h at room temperature. It was then concentrated under reduced pressure, transferred to Falcon tube, and acetone/hexane (50 mL, v/v 1:1) was added. The mixture was centrifuged and a colorless supernatant was decanted. Acetone (50 mL) was added and the suspension was sonicated and centrifuged once more. Solid precipitate was purified using DCVC, reverse phase, gradually from 10% to 20% MeCN in water (v/v) to afford product **4c** as a purple solid (12 mg, 69%). R_f 0.18, 1:4 MeCN in H₂O (reverse phase); t_R (reverse phase-HPLC, column B, method 1): 7.23 min. Anal. calcd for C₈₀H₁₁₀CoN₂₀O₁₈P·9H₂O: C 50.79, H 6.82, N 14.81, found: C 50.80, H 6.81, N 14.90. HRMS ESI calcd for C₈₀H₁₀₉CoN₂₀O₁₈P [M-H]⁻ 1727.7298, found: 1727.7280. UV-Vis (H₂O) λ_{max} (nm) (ϵ , L mol⁻¹ cm⁻¹) 548 (7.8×10^3), 518 (6.9×10^3), 362 (2.4×10^4), 274 (2.0×10^4). ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 7.83 (s, 1H), 7.23 (d, $J = 16.4$ Hz, 2H), 7.05 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.27 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 6.20 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H), 6.04 (s, 1H), 4.76 – 4.61 (m, 2H), 4.55 – 4.45 (m, 2H), 4.43 – 4.36 (m, 1H), 4.35 – 4.24 (m, 1H), 4.22 – 4.07 (m, 3H), 3.98 – 3.89 (m, 1H), 3.82 (dd, $J = 13.5, 2.0$ Hz, 1H), 3.66 (d, $J = 14.1$ Hz, 1H), 3.61 (dd, $J = 10.6, 5.2$ Hz, 1H), 3.39 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 2.91 – 1.61 (m, 35H), 2.58 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.35 (s, 3H), 1.26 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.42 – 1.07 (m, 3H), 0.43 (s, 3H). ¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz) δ 181.6, 180.1, 177.73, 177.71, 177.3, 176.6, 175.9, 175.52, 175.51, 175.3, 174.6, 174.0, 167.3, 166.9, 166.2, 152.2, 149.0, 143.4, 138.2, 138.0, 135.7, 133.8, 131.4, 124.5, 117.8, 112.5, 112.0, 108.7, 105.1, 95.7, 87.5, 86.6, 86.4, 85.5, 80.6, 80.5, 78.2, 78.1, 76.3, 73.82, 73.77, 72.4, 70.77, 70.75, 60.3, 57.7, 57.0, 54.5, 52.6, 52.4, 49.4, 48.4, 46.89, 46.85, 44.0, 43.1, 41.5, 40.1, 39.6, 36.9, 36.2, 35.4, 33.7, 33.1, 32.9, 32.4, 32.3, 30.0, 29.5, 27.39, 27.35, 26.2, 26.0, 20.9, 20.5, 20.4, 20.3, 20.23, 20.21, 19.9, 17.5, 17.1, 16.4, 16.2, 12.5.

2'OMeRNA-vitamin B₁₂ conjugate **6a**



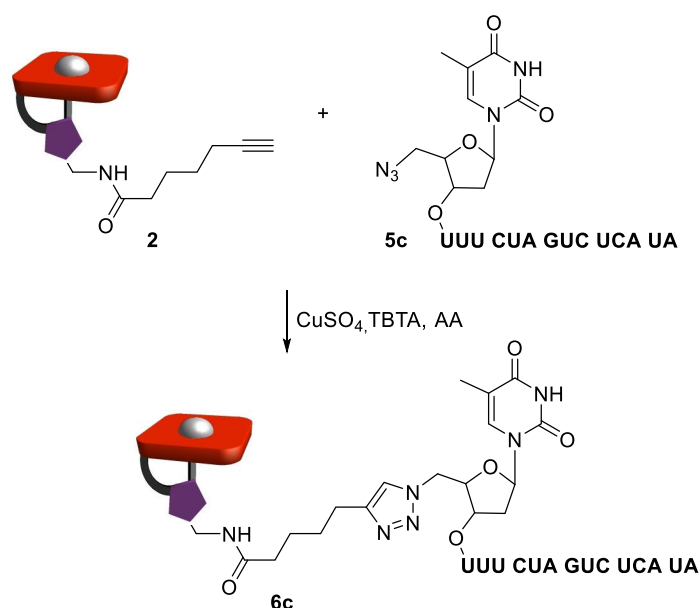
Solution A: *N*-(cobalamin-5'-yl)-hept-6-ynamide (**2**, 2.3 mg, 1.6 μmol) was dissolved in distilled water (320 μL) to afford 5 mM solution. **Solution B:** 2'OMeRNA oligonucleotide **5a** (5'-N₃-deoxythymidine-CAU CUA GUA UUU CU-3', 8 mg, 1.6 μmol) was dissolved in distilled water (500 μL). The exact concentration of the solution was determined by NanoDrop UV-Vis Spectroscopy to be 14580 ng / μL . To a 1.5 mL Eppendorf tube equipped with a stirring bar DMSO (197 μL), distilled water (28 μL) and triethylammonium acetate buffer stock solution (2 M, 20 μL) were added. They were followed by solution **A** (80 μL) and solution **B** (63 μL). Cu-TBTA (10 mM in DMSO/water: v/v 11:9) stock solution (6 μL) and ascorbic acid stock solution (10 mM, 6 μL) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature. After 1.5 h, 3 h and 4.5 h portions of ascorbic acid stock solution (10 mM, 3 x 6 μL) were added. After 20 h the HPLC analysis indicated 97% conversion. The reaction mixture was diluted with distilled water (4.5 mL) and purified using preparative reverse phase-HPLC, column C, method 3. The eluate was freeze-dried to afford product **6a** as a pink solid. t_{R} (reverse phase-HPLC, column C, method 3): 11.22 min. MS ESI calcd for C₂₂₄H₂₉₈CoN₆₃O₁₂₀P₁₅ [M-H]⁻ 6316.65, found: 6318.50.

2'OMeRNA-vitamin B₁₂ conjugate **6b**



Solution A: *N*-(cobalamin-5'-yl)-hept-6-ynamide (**2**, 2.3 mg, 1.6 μmol) was dissolved in distilled water (320 μL) to afford 5 mM solution. **Solution B:** 2'OMeRNA oligonucleotide **5b** (5'-N₃-hexyl-CAU CUA GUA UUU CU-3', 8 mg, 1.6 μmmol) was dissolved in distilled water (500 μL). The exact concentration of the solution was determined by NanoDrop UV-Vis Spectroscopy to be 19943 ng / μL. To a 1.5 mL Eppendorf tube equipped with a stirring bar DMSO (197 μL), distilled water (37 μL) and triethylammonium acetate buffer stock solution (2 M, 20 μL) were added. They were followed by solution **A** (80 μL) and solution **B** (54 μL). Cu-TBTA (10 mM in DMSO/water: v/v 11:9) stock solution (6 μL) and ascorbic acid stock solution (10 mM, 6 μL) were added. The reaction mixture was stirred at 45 °C. After 1.5 h and 3 h portions of ascorbic acid stock solution (10 mM, 3 x 6 μL) were added. After 24 h the HPLC measurement indicated 71% conversion. The reaction mixture was diluted with distilled water (4.5 mL) and purified using preparative reverse phase-HPLC, column C, method 4. The eluate was freeze-dried to afford product **6b** as a pink solid. *t_R* (reverse phase-HPLC, column C, method 4): 10.45 min.

Scrambled 2'OMeRNA-vitamin B₁₂ conjugate **6c**

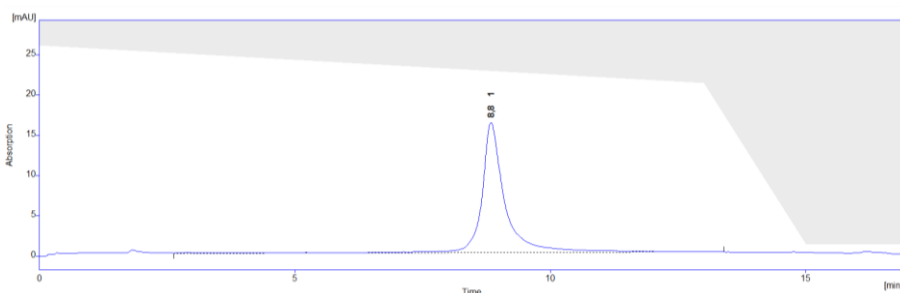


Solution A: *N*-(cobalamin-5'-yl)-hept-6-ynamide (**2**, 2.3 mg, 1.6 μmol) was dissolved in distilled water (320 μL) to afford 5 mM solution. **Solution B:** 2'OMeRNA oligonucleotide **5c** (5'-N₃-deoxythymidine-UUU CUA GUC UCA UA-3', 8 mg, 1.6 μmmol) was dissolved in distilled water (500 μL). The exact concentration of the solution was determined by NanoDrop UV-Vis Spectroscopy to be 17801 ng / μL. To a 1.5 mL Eppendorf tube equipped with a stirring bar DMSO (197 μL), distilled water (29 μL) and triethylammonium acetate buffer stock solution (2 M, 20 μL) were added. They were followed by solution **A** (80 μL) and solution **B** (62 μL). Cu-TBTA (10 mM in DMSO/water: v/v 11:9) stock solution (6 μL) and ascorbic acid stock solution (10 mM, 6 μL) were added. The reaction mixture was stirred at 45 °C. After 1.5 h and 3 h portions of ascorbic acid stock solution (10 mM, 2 x 6 μL) were added. After 48 h the HPLC analysis indicated 80% conversion. The reaction mixture was diluted with distilled water (4.5 mL) and purified using preparative reverse phase-HPLC, column C, method 3. The eluate was freeze-dried to afford product **6c** as a pink solid. *t_R* (reverse phase-HPLC, column C, method 3): 11.72 min. MS ESI calcd for C₂₂₄H₂₉₈CoN₆₃O₁₂₀P₁₅ [M-H]⁻ 6316.65, found: 6318.00.

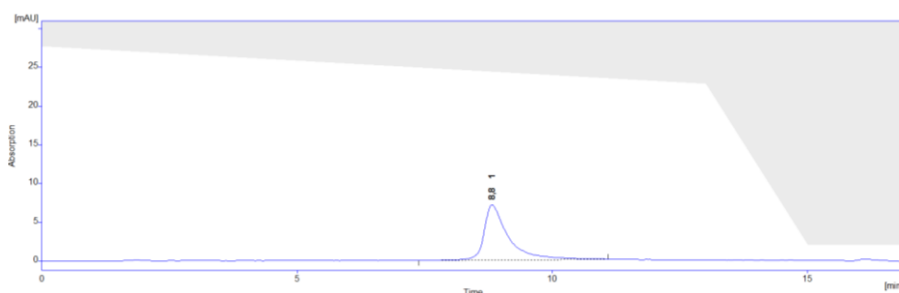
9. Stability of conjugates in bacteria medium

The stability tests were performed in a qualitative manner. Prior to the addition to the bacterial medium, the purity of a conjugate was ensured by HPLC analysis. Then the conjugate was added to the bacterial medium (50 μM concentration of a conjugate in the media). After 24 h a sample was taken and analysed by HPLC. As no decomposition was observed, quantitative experiments were not required.

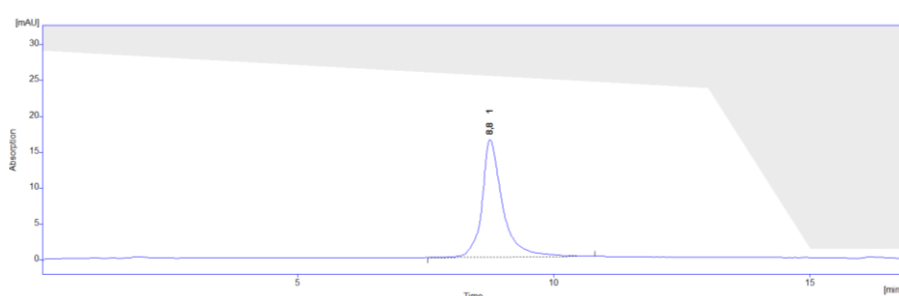
2'OMeRNA-vitamin B₁₂ conjugate **6a** (pure compound before the addition to bacteria medium)



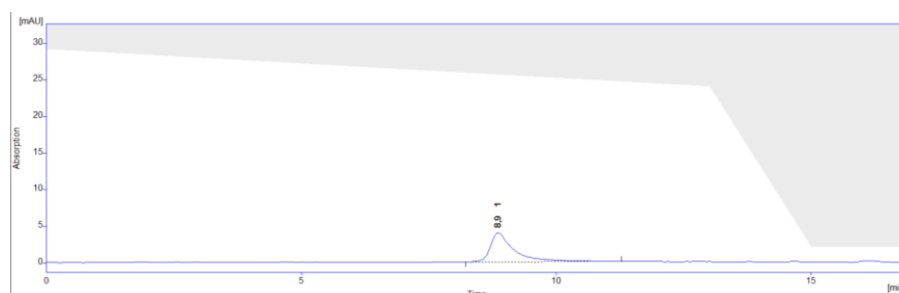
2'OMeRNA-vitamin B₁₂ conjugate **6a** after 24 h in bacteria medium



2'OMeRNA-vitamin B₁₂ conjugate **6c** (pure compound before the addition to bacteria medium)

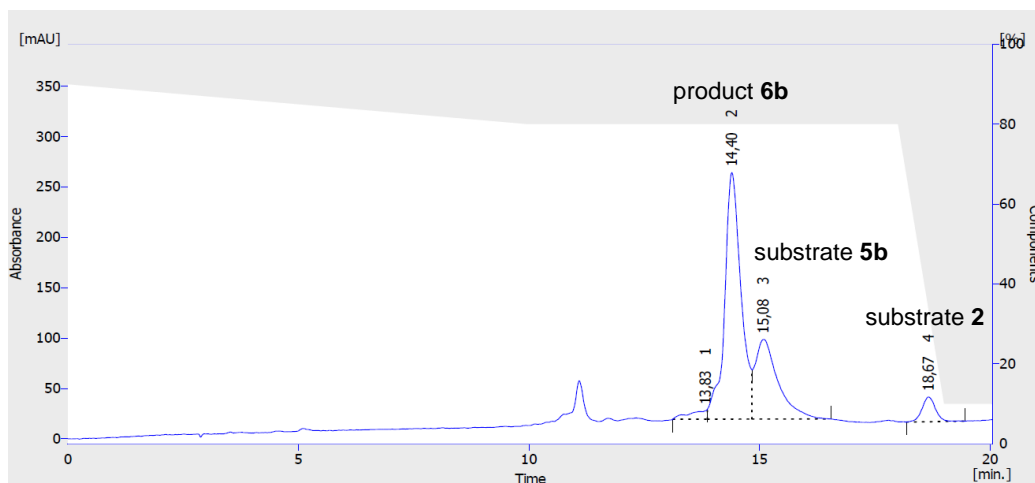


2'OMeRNA-vitamin B₁₂ conjugate **6c** after 24 h in bacteria medium



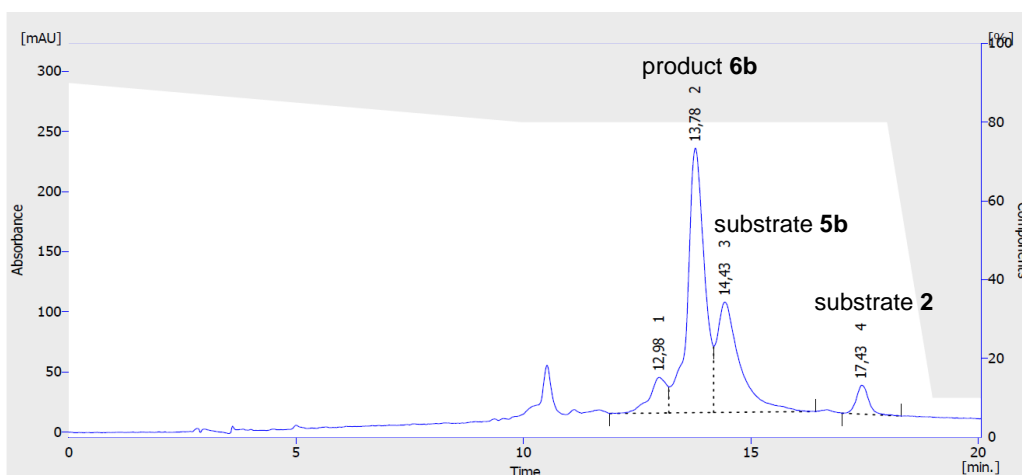
Vitamin B₁₂-hexyl-2'OMeRNA conjugate 6b

After purification, conjugate **6b** was analysed by ESI MS and the signal at $m/z = 6193.50$ corresponds to a pseudomolecular ion $[M-H]^-$, but RP-HPLC (column A, method 4) analysis showed that during the freeze-drying procedure its purity decreased to 75%. Nevertheless, the stability test in bacteria medium was performed. Conjugates **6b** was added at 50 μM concentrations to Davis Minimal Broth.⁹ Following overnight incubation at 37 °C with shaking, RP-HPLC analysis was performed. The resulting chromatogram did not show any important differences before and after incubation. Therefore, this conjugate was considered stable in the presence of the tested medium.



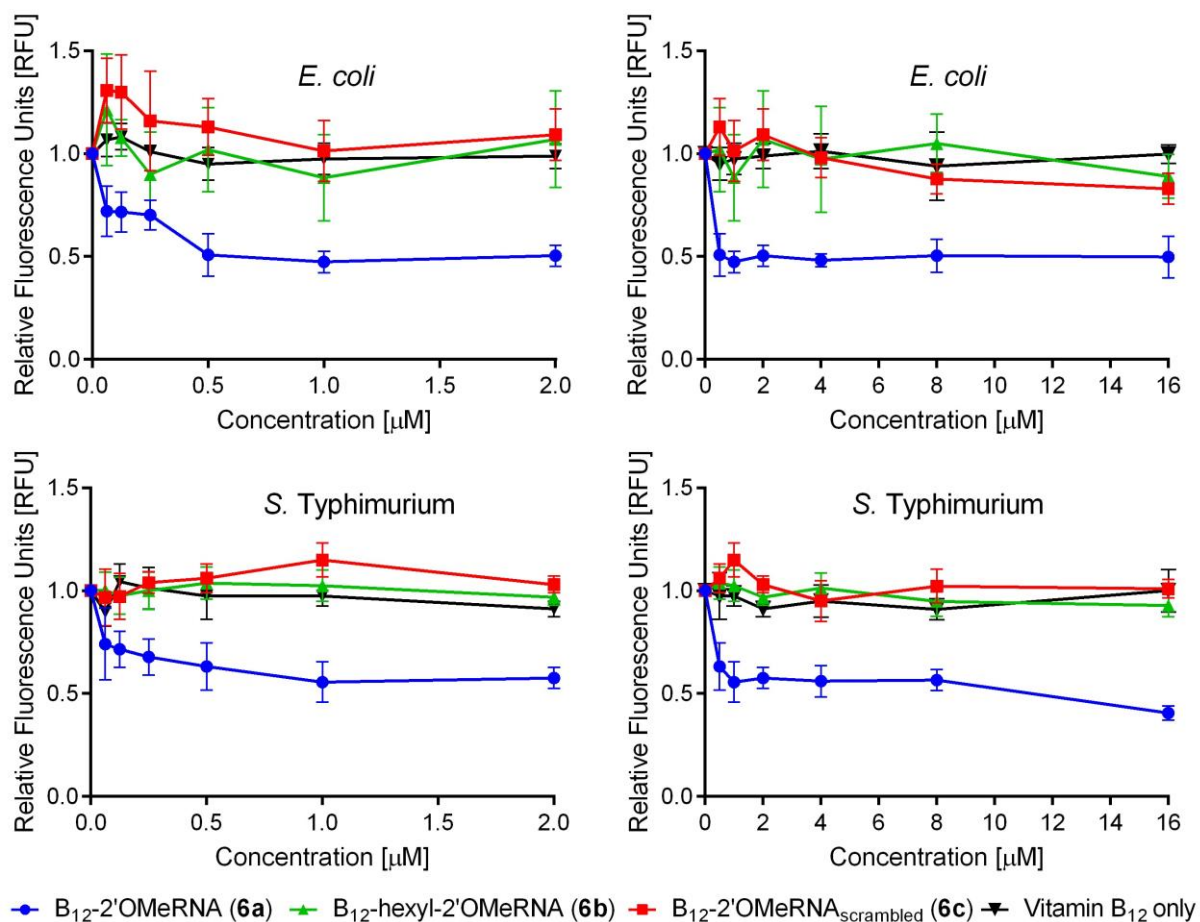
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	13,833	239,666	8,509	2,5	2,4	0,43	856
2	14,400	6058,605	244,938	63,3	68,6	0,37	856
3	15,083	2778,944	79,085	29,0	22,1	0,55	903
4	18,667	499,526	24,548	5,2	6,9	0,32	931
Total		9576,741	357,079	100,0	100,0		

Vitamin B₁₂-hexyl-2'OMeRNA conjugate 6b after 24 h in bacteria medium



	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	12,983	781,729	29,666	7,6	8,1	0,40	987
2	13,783	5780,549	220,073	56,0	60,2	0,38	995
3	14,433	3307,602	91,722	32,0	25,1	0,55	973
4	17,433	461,408	24,121	4,5	6,6	0,28	722
Total		10331,289	365,582	100,0	100,0		

10. Relative fluorescence measured after treatment of *E. coli* and *S. Typhimurium* cells with vitamin B₁₂-2'OMeRNA conjugates **6a, **6b**, **6c** and vitamin B₁₂ only**



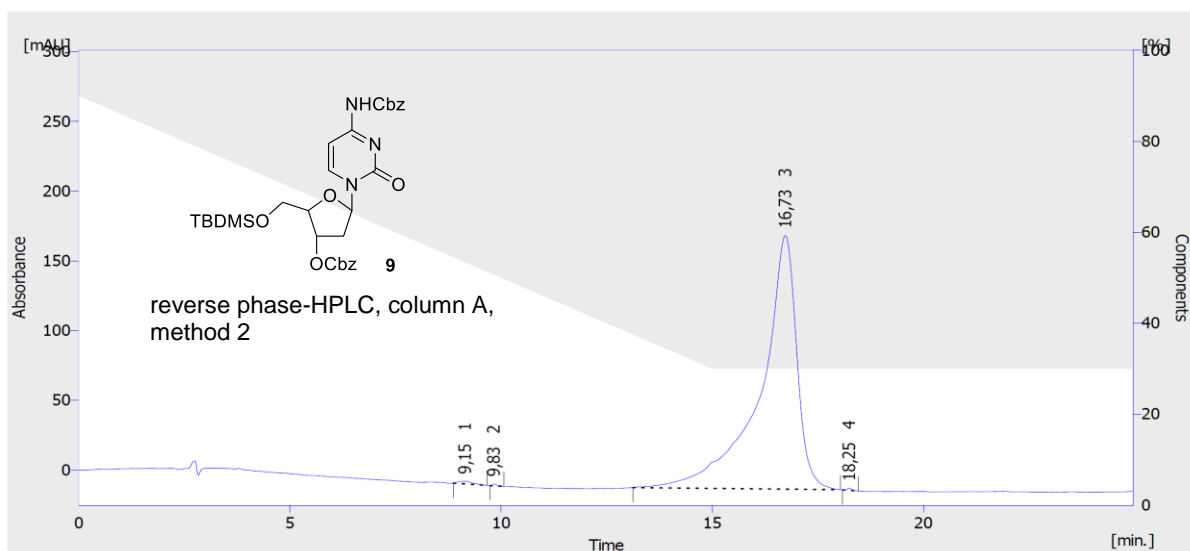
Left graphs show data for finer concentrations in the 0 – 2 μM range and right graphs up to 16 μM concentrations. Error bars represent standard errors from three independent biological experiments. The differences between the conjugate **6a** and **6b**, **6c** or vitamin B₁₂ only are significant with $P \leq 0.05$ (determined with ANOVA method without correction for multiple comparisons). The level of fluorescence of cells treated with vitamin B₁₂-hexyl-2'OMeRNA (**6b**) was not reduced, which might stem from the fact that: the compound was obtained as a mixture, was not stable in cells, its three dimensional structure prevented efficient interactions with the vitamin B₁₂ membrane receptors or the mRNA target.

11. References

- (1) D. S. Pedersen, C. Rosenbohm, *Synthesis (Stuttg)*. **2001**, 2001 (16), 2431.
- (2) A. Jackowska, M. Chromiński, M. Giedyk, D. Gryko, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, 16, 936.
- (3) I. Van Daele, H. Munier-Lehmann, M. Froeyen, J. Balzarini, S. Van Calenbergh, *J. Med. Chem.* **2007**, 50 (22), 5281.
- (4) S. Debarge, J. Balzarini, A. R. Maguire, *J. Org. Chem.* **2011**, 76 (1), 105.
- (5) J. Lietard, A. Meyer, J.-J. Vasseur, F. Morvan, *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48 (50), 8795.
- (6) M. Równicki, M. Wojciechowska, A. J. Wierzba, J. Czarnecki, D. Bartosik, D. Gryko, J. Trylska, *Sci. Rep.* **2017**, 7 (1), 7644.
- (7) M. S. Guyer, R. R. Reed, J. A. Steitz, K. B. Low, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1981**, 45, 135.
- (8) H. Tada, O. Shiho, K. Kuroshima, M. Koyama, K. Tsukamoto, *J Immunol Methods.* **1986**, 6;93(2), 157.
- (9) B. D. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1949**, 35 (1), 1.

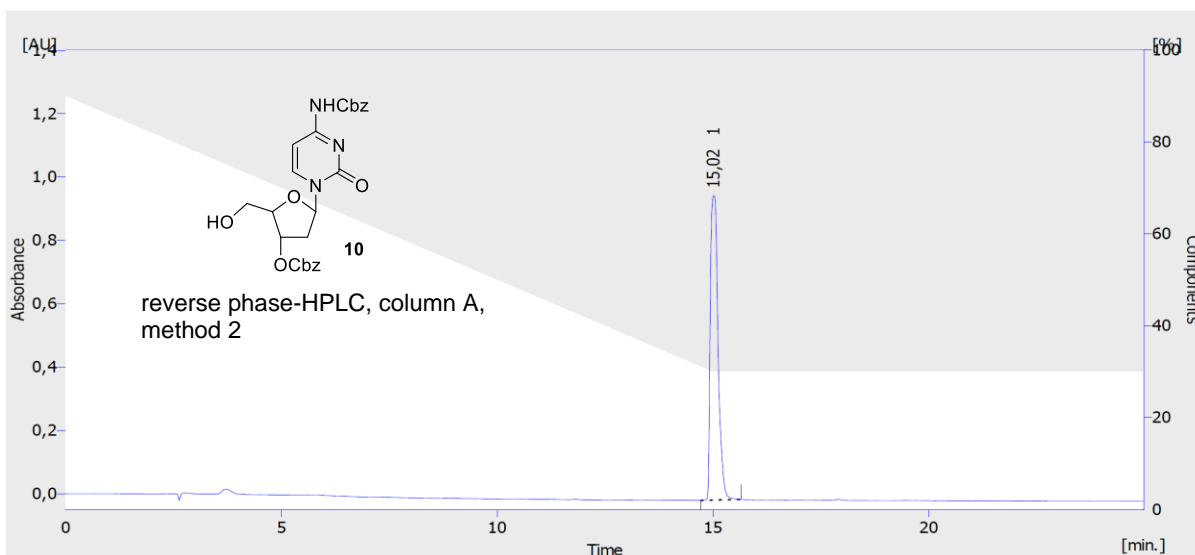
12. HPLC chromatograms

5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-N⁴-3'-*O*-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (9)



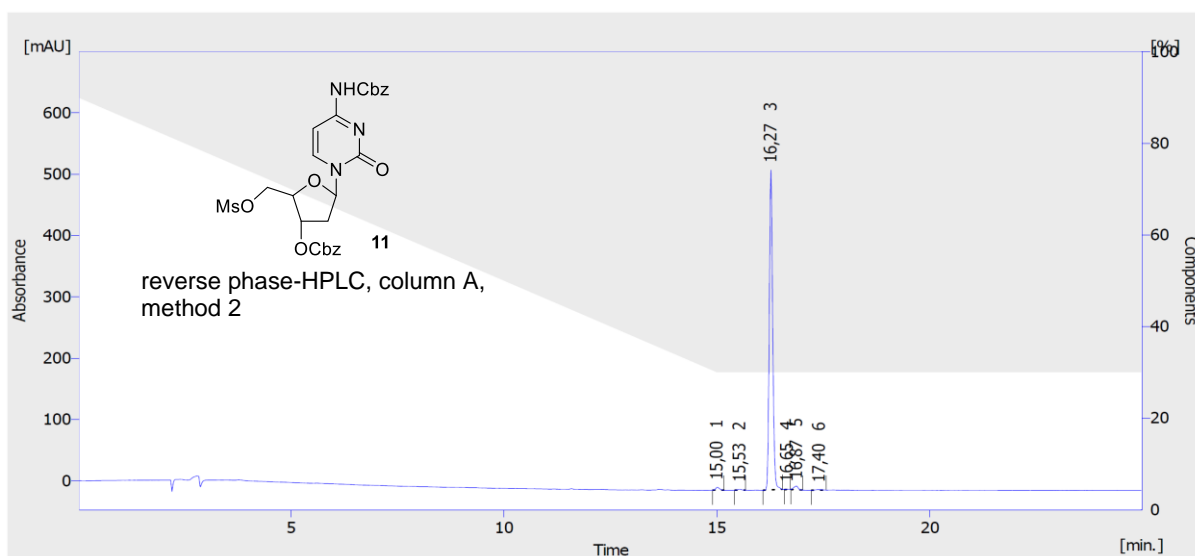
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	9,150	46,473	1,988	0,4	1,1	0,38	995
2	9,833	10,035	1,443	0,1	0,8	0,12	997
3	16,733	10937,983	182,003	99,4	97,3	0,70	491
4	18,250	11,544	1,656	0,1	0,9	0,12	1000
	Total	11006,035	187,089	100,0	100,0		

N⁴-3'-*O*-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (10)



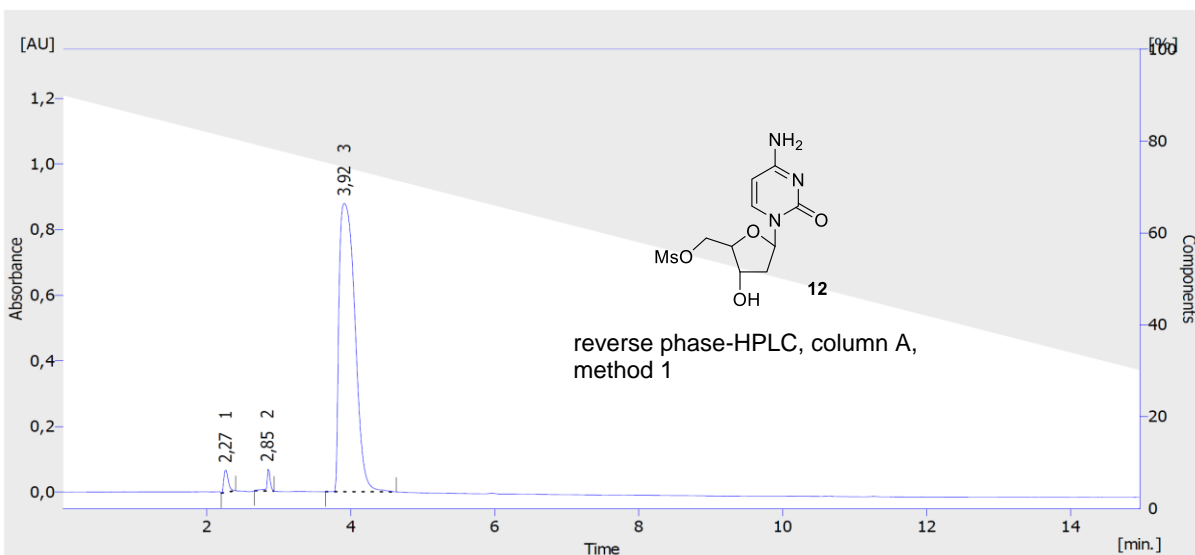
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	15,017	11998,984	962,307	100,0	100,0	0,20	459
	Total	11998,984	962,307	100,0	100,0		

5'-Methanesulfonyl-N⁴-3'-O-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (11)



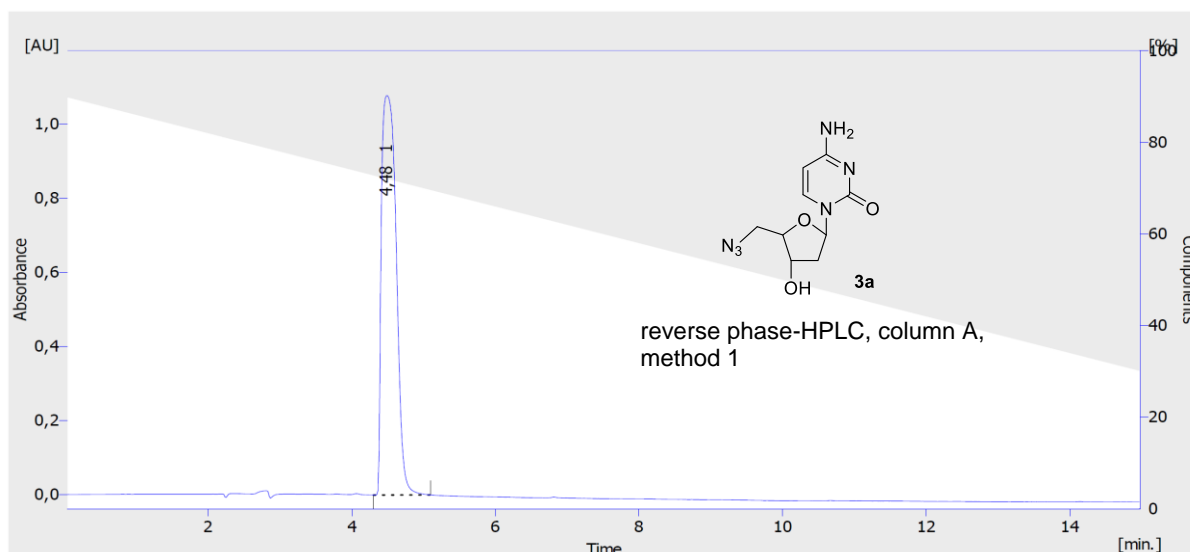
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	15,000	27,399	4,495	0,9	0,8	0,10	998
2	15,533	7,751	1,223	0,3	0,2	0,12	1000
3	16,267	2927,720	521,286	97,0	97,5	0,10	498
4	16,650	3,194	0,781	0,1	0,1	0,08	1000
5	16,867	43,015	6,173	1,4	1,2	0,13	799
6	17,400	7,855	0,711	0,3	0,1	0,22	1000
	Total	3016,933	534,670	100,0	100,0		

5'-Methanesulfonyl-2'-deoxycytidine (12)



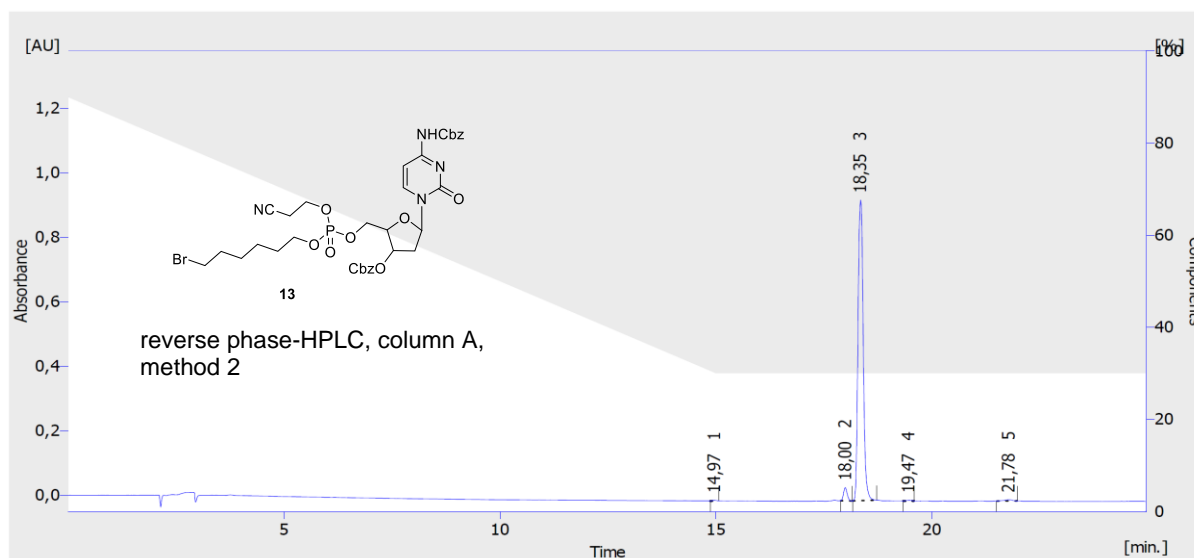
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	2,267	291,103	68,003	2,1	6,7	0,10	302
2	2,850	209,602	67,062	1,5	6,6	0,05	828
3	3,917	13430,950	879,191	96,4	86,7	0,27	744
	Total	13931,655	1014,255	100,0	100,0		

5'-Azido-2'-deoxytidine (3a)



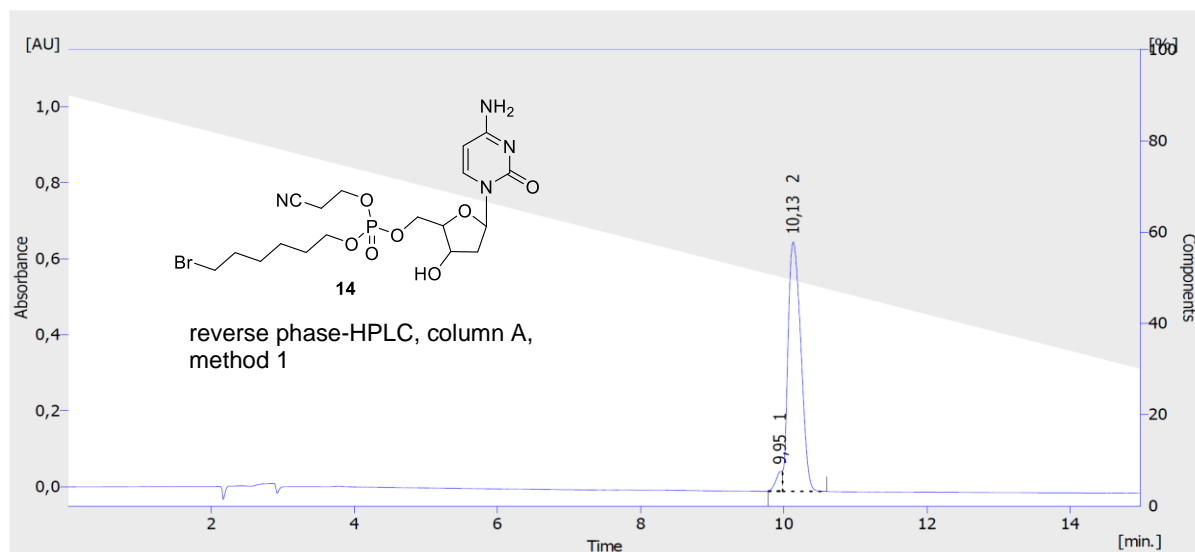
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	4,483	12808,952	898,168	100,0	100,0	0,27	762
	Total	12808,952	898,168	100,0	100,0		

5'-(6-bromohex-1-yloxy-2-cyanoethoxy)phosphoryl-N⁴-3'-O-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (13)



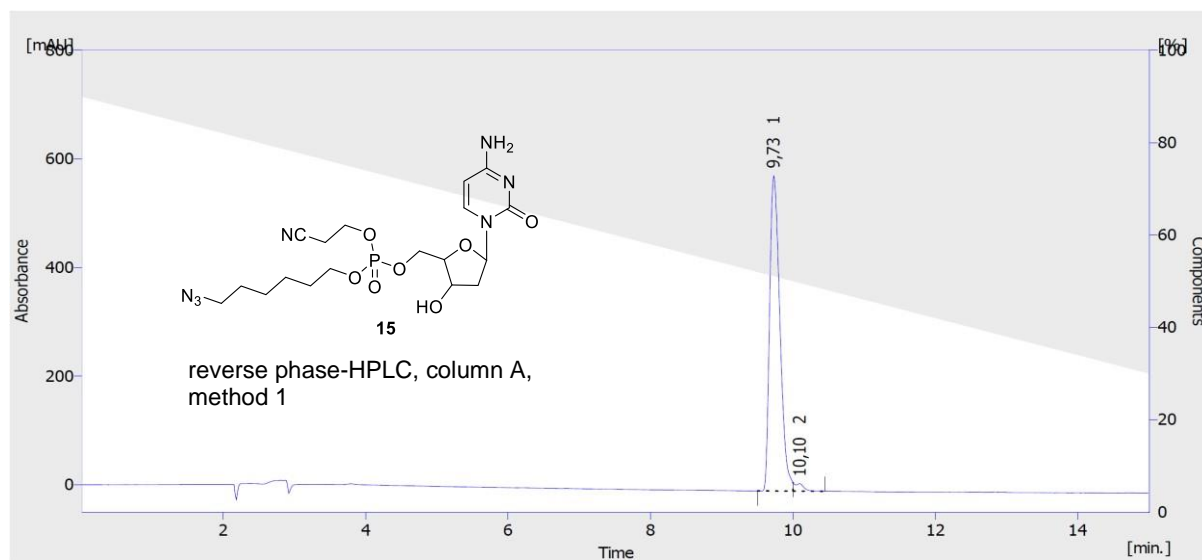
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	14,967	10,393	1,761	0,1	0,2	0,12	1000
2	18,000	237,242	40,898	3,0	4,2	0,10	881
3	18,350	7711,331	932,325	96,1	95,1	0,13	500
4	19,467	14,866	1,796	0,2	0,2	0,15	989
5	21,783	51,240	3,727	0,6	0,4	0,22	699
	Total	8025,071	980,507	100,0	100,0		

5'-(6-bromohex-1-yloxy-2-cyanoethoxy)phosphoryl-2'-deoxycytidine (14)



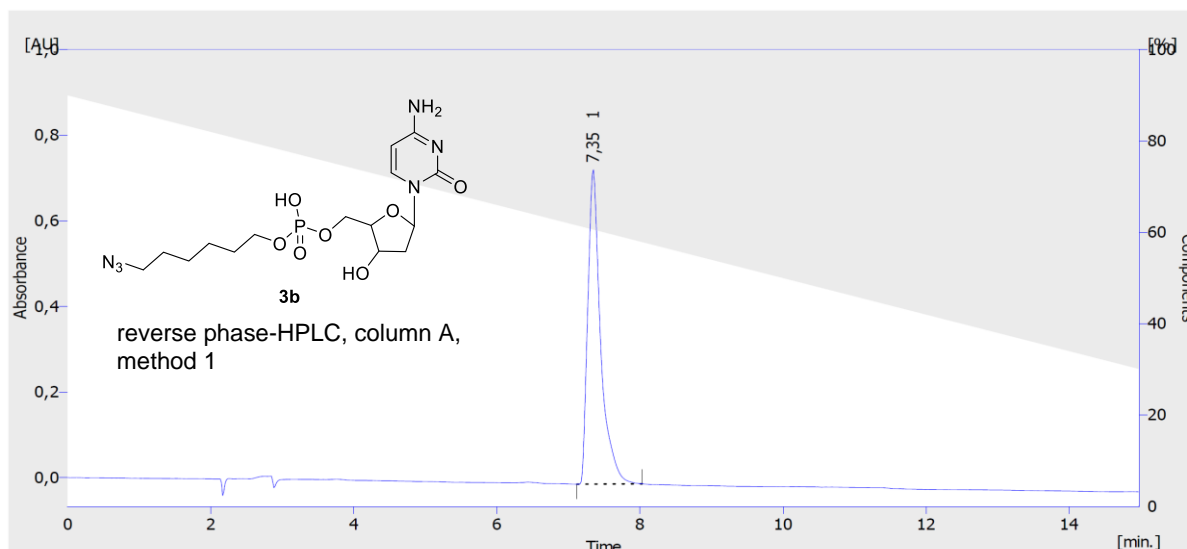
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	9,950	299,004	51,853	3,5	7,3	0,10	744
2	10,133	8172,340	656,444	96,5	92,7	0,23	796
	Total	8471,344	708,297	100,0	100,0		

5'-(6-azidohex-1-yloxy-2-cyanoethoxy)phosphoryl-2'-deoxycytidine (15)



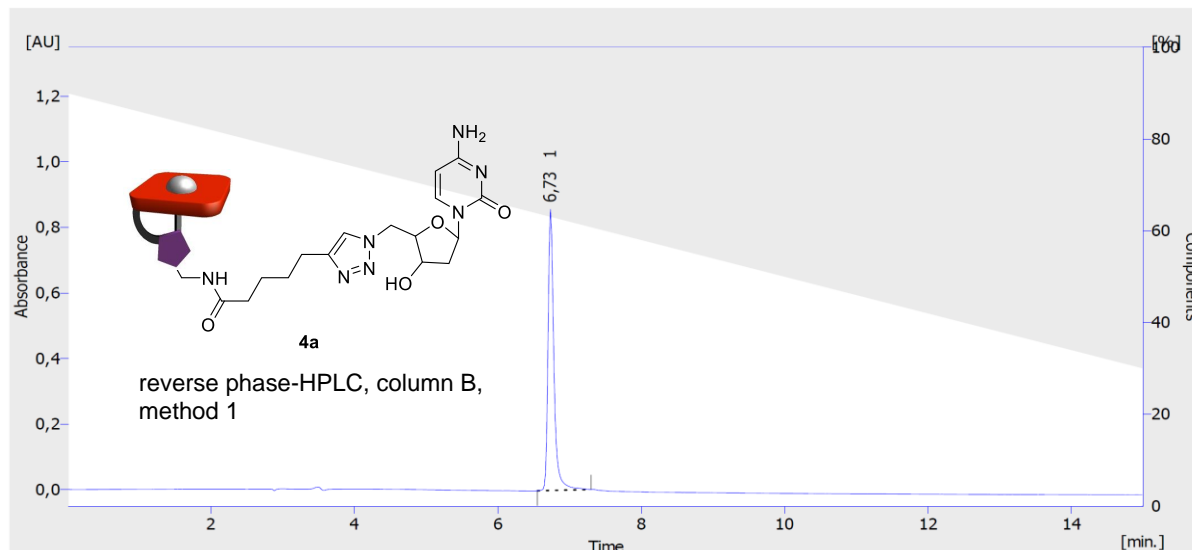
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	9,733	5812,349	580,791	97,7	97,7	0,18	832
2	10,100	138,450	13,784	2,3	2,3	0,17	770
	Total	5950,800	594,576	100,0	100,0		

5'-(6-azidohex-1-yloxy)phosphoryl-2'-deoxycytidine (3b)



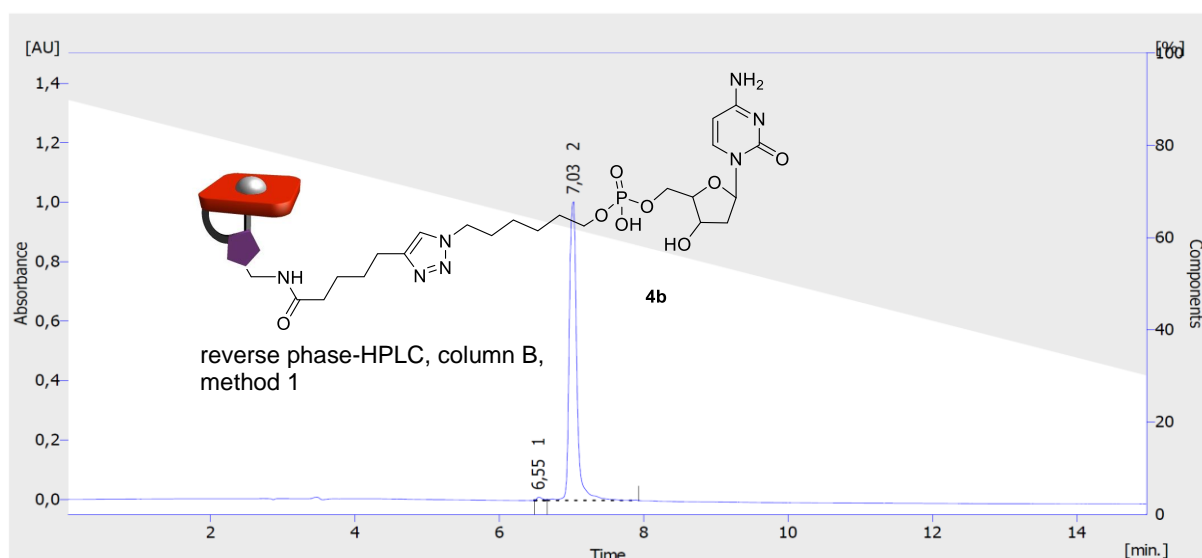
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	7,350	7653,302	612,135	100,0	100,0	0,20	692
	Total	7653,302	612,135	100,0	100,0		

Nucleoside-vitamin B₁₂ conjugate 4a



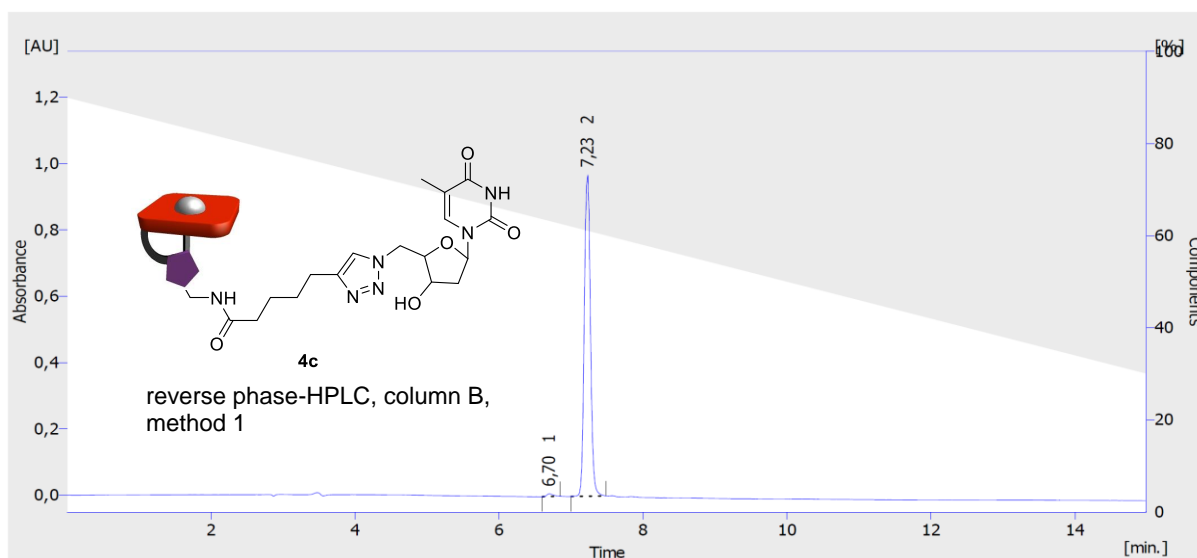
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	6,733	4857,770	857,980	100,0	100,0	0,10	604
	Total	4857,770	857,980	100,0	100,0		

Nucleoside-vitamin B₁₂ conjugate 4b



	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	6,550	60,816	11,422	0,8	1,1	0,08	952
2	7,033	7253,234	1004,825	99,2	98,9	0,12	379
	Total	7314,050	1016,247	100,0	100,0		

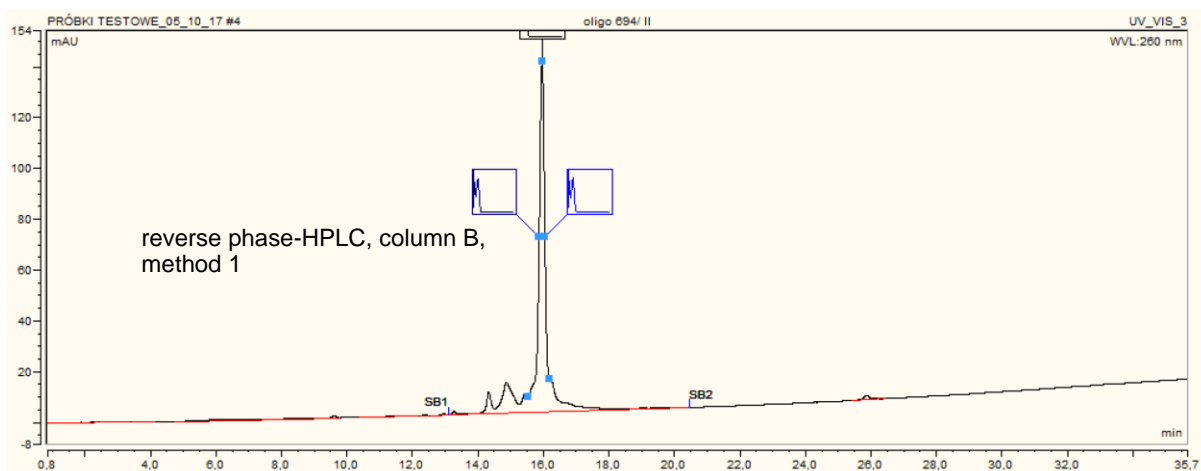
Nucleoside-vitamin B₁₂ conjugate 4c



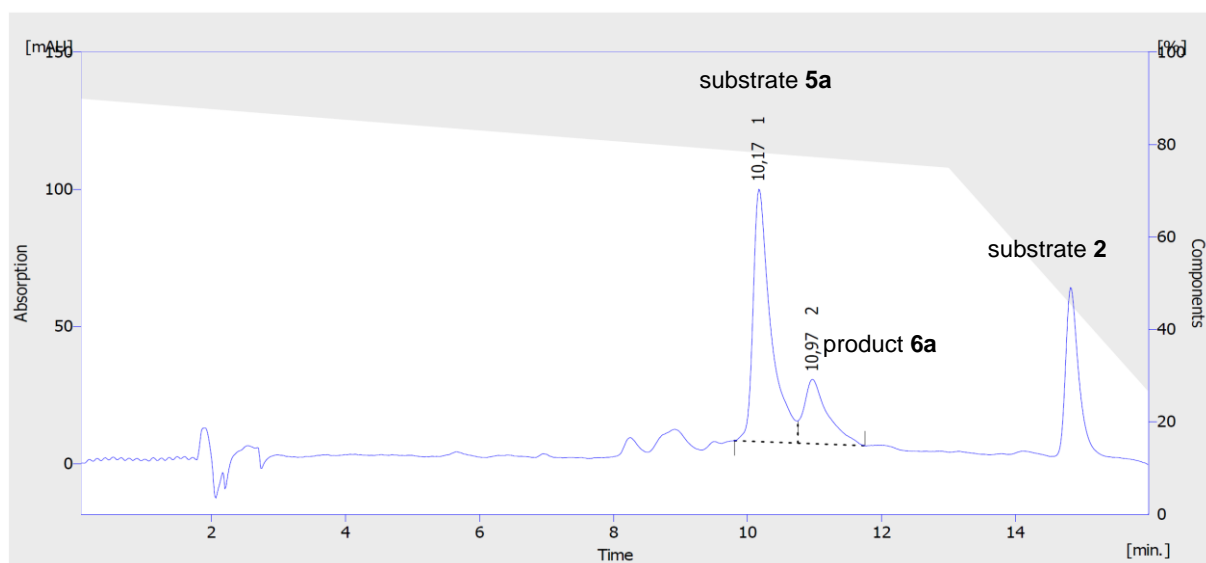
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	6,700	50,251	8,521	0,9	0,9	0,12	949
2	7,233	5739,435	968,627	99,1	99,1	0,12	582
	Total	5789,686	977,148	100,0	100,0		

2'OMeRNA-vitamin B₁₂ conjugate 6a

Substrate 5a:

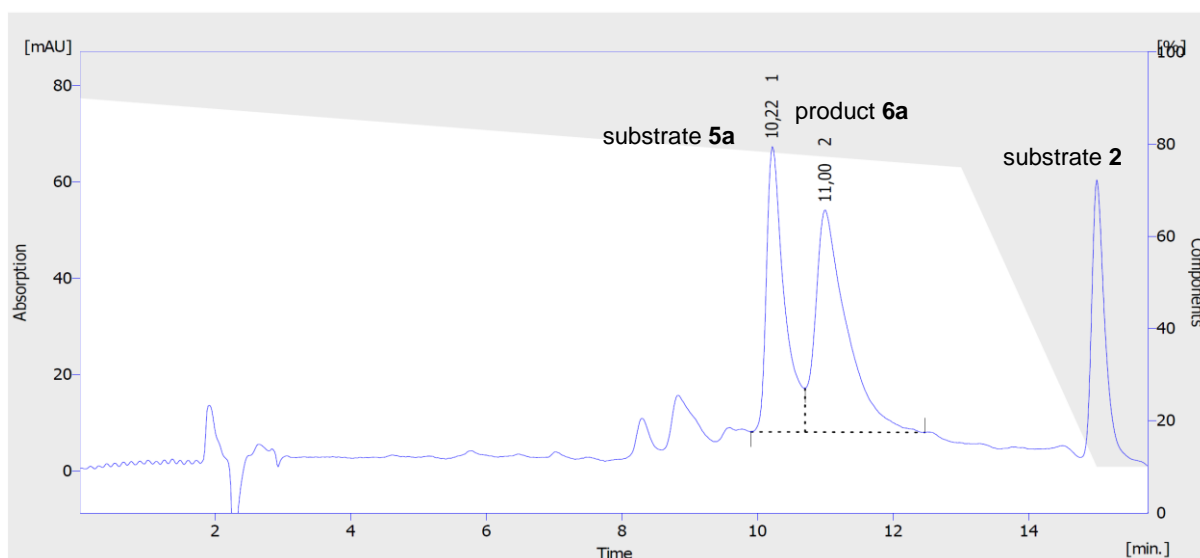


After 1.5 h:



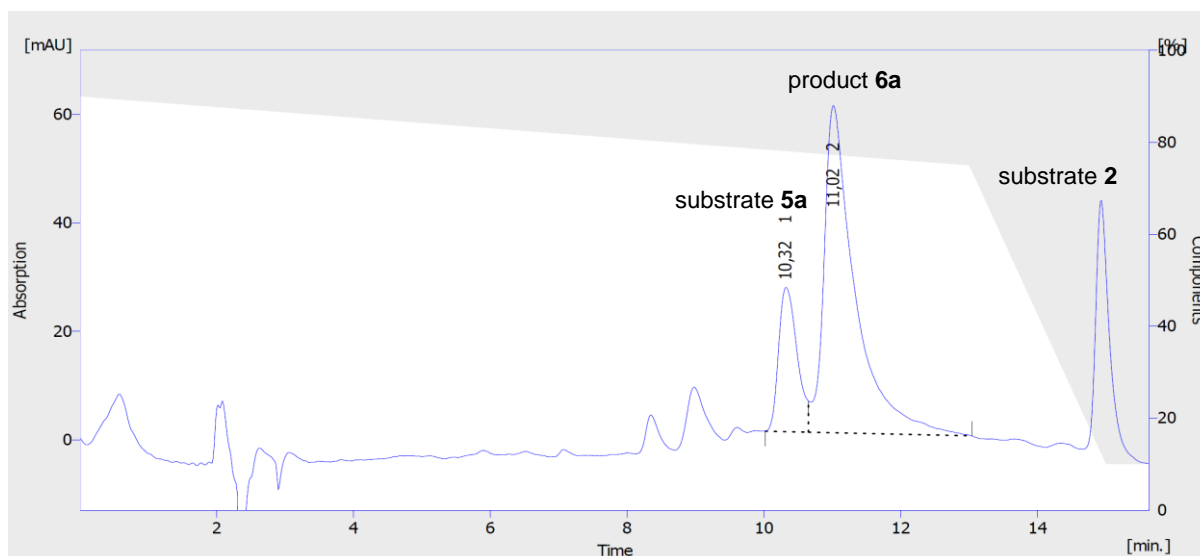
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	10,167	1713,674	92,052	74,6	79,7	0,27	916
2	10,967	584,849	23,476	25,4	20,3	0,37	918
	Total	2298,523	115,529	100,0	100,0		

After 3 h:



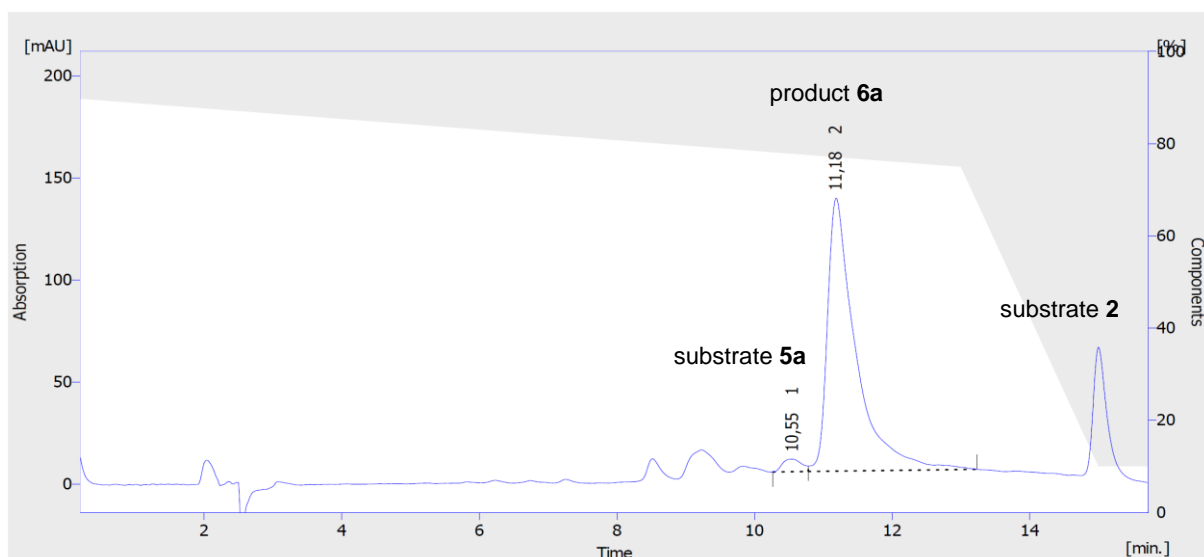
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	10,217	1087,028	59,241	42,2	56,2	0,27	954
2	11,000	1489,490	46,115	57,8	43,8	0,47	856
	Total	2576,518	105,356	100,0	100,0		

After 4.5 h:



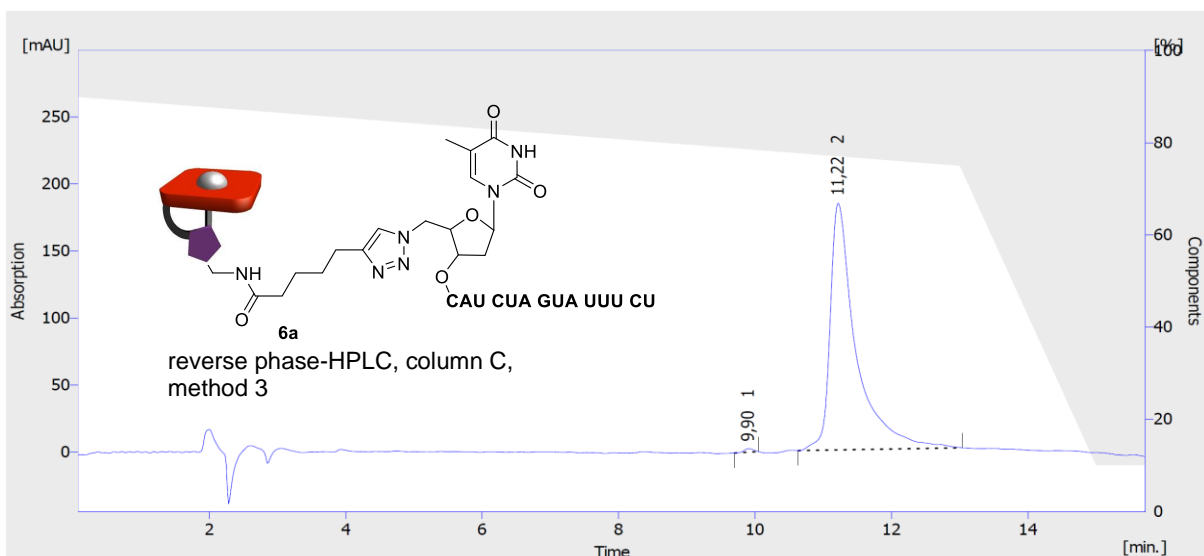
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	10,317	498,018	26,618	20,6	30,6	0,30	988
2	11,017	1919,819	60,373	79,4	69,4	0,43	950
	Total	2417,837	86,991	100,0	100,0		

After 20 h:



	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	10,550	120,430	6,177	3,0	4,4	0,37	996
2	11,183	3869,033	133,833	97,0	95,6	0,40	242
	Total	3989,463	140,010	100,0	100,0		

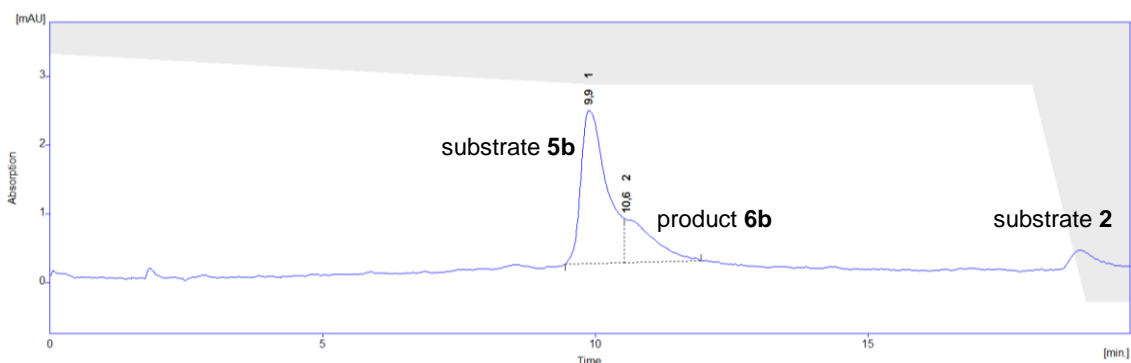
Purified product 6a:



	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	9,900	20,019	2,221	0,5	1,4	0,18	734
2	11,217	4067,330	153,404	99,5	98,6	0,35	529
	Total	4087,349	155,625	100,0	100,0		

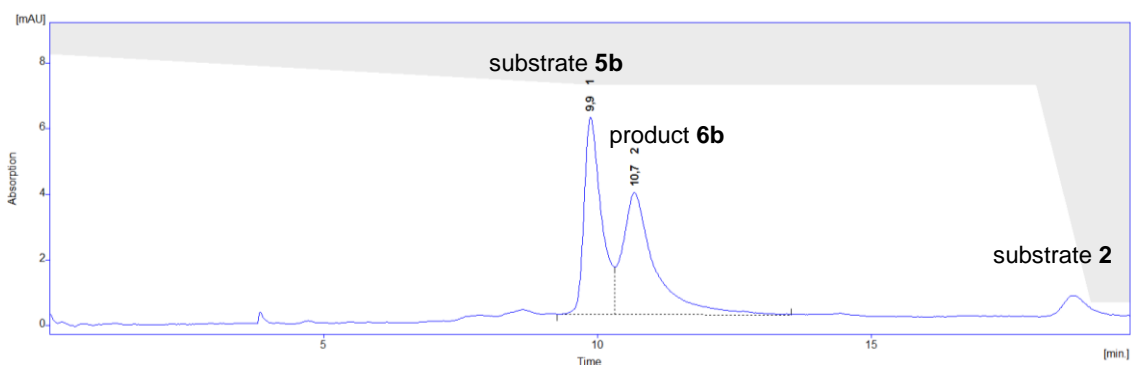
2'OMeRNA-vitamin B₁₂ conjugate 6b

After 1.5 h:



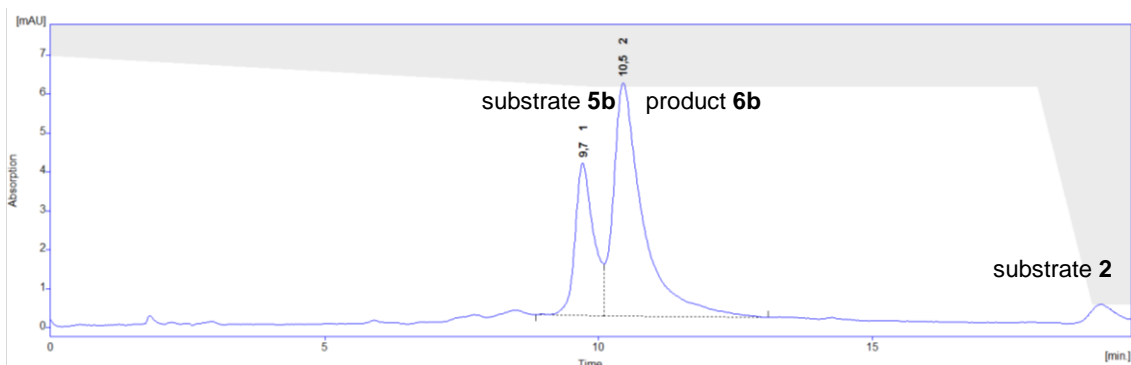
	Reten. Time [min]	Start Time [min]	End Time [min]	Start Value [mAU]	End Value [mAU]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	9,883	9,450	10,533	2,687	2,903	730,421	22,241	75,3	77,9	0,50	957
2	10,567	10,533	11,950	2,903	3,185	239,790	6,295	24,7	22,1	0,60	999
	Total					970,211	28,536	100,0	100,0		

After 3 h:



	Reten. Time [min]	Start Time [min]	End Time [min]	Start Value [mAU]	End Value [mAU]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	9,867	9,267	10,317	3,462	3,430	1319,437	59,943	46,3	61,8	0,35	932
2	10,683	10,317	13,533	3,430	3,330	1533,188	37,099	53,7	38,2	0,55	795
	Total					2852,625	97,042	100,0	100,0		

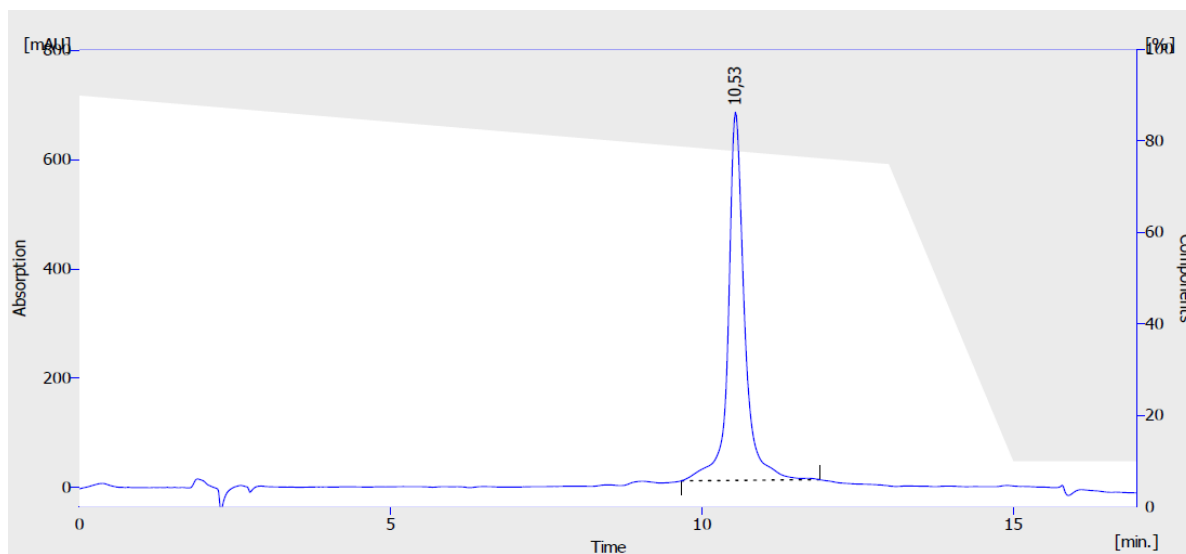
After 24 h:



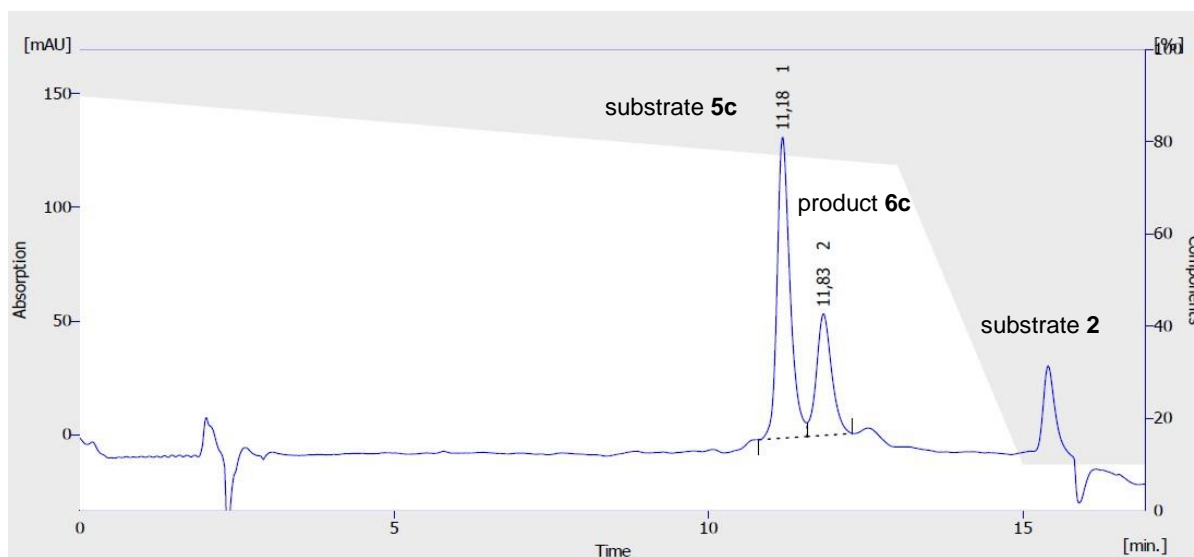
	Reten. Time [min]	Start Time [min]	End Time [min]	Start Value [mAU]	End Value [mAU]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	9,717	8,850	10,100	3,363	3,152	921,307	39,047	28,9	39,5	0,38	833
2	10,450	10,100	13,100	3,152	2,645	2268,160	59,845	71,1	60,5	0,50	818
	Total					3189,467	98,892	100,0	100,0		

2'OMeRNA-vitamin B₁₂ conjugate 6c

Substrate 5c:

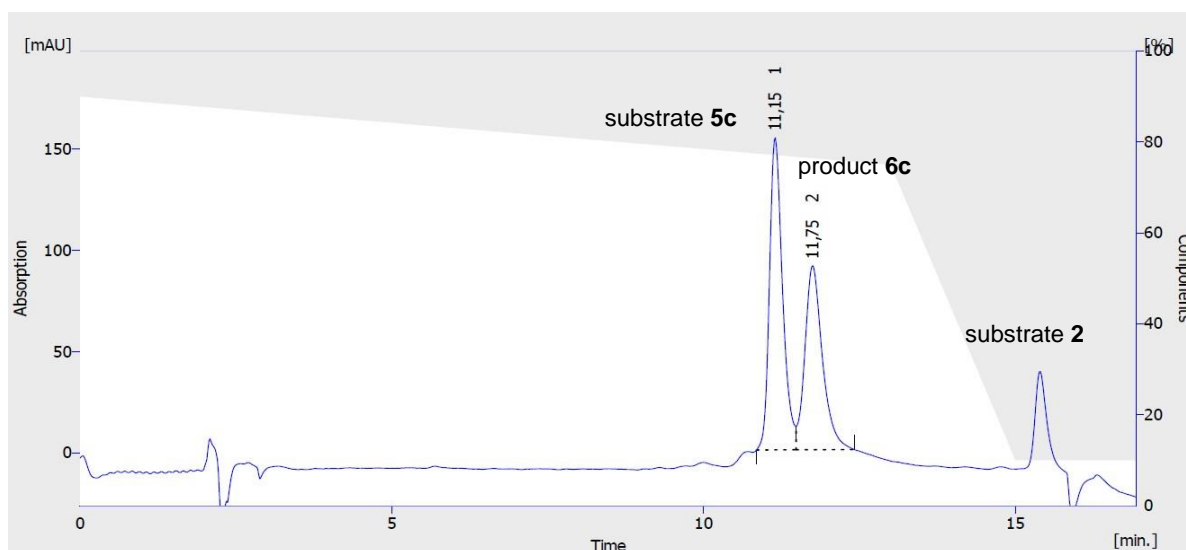


After 1.5 h:



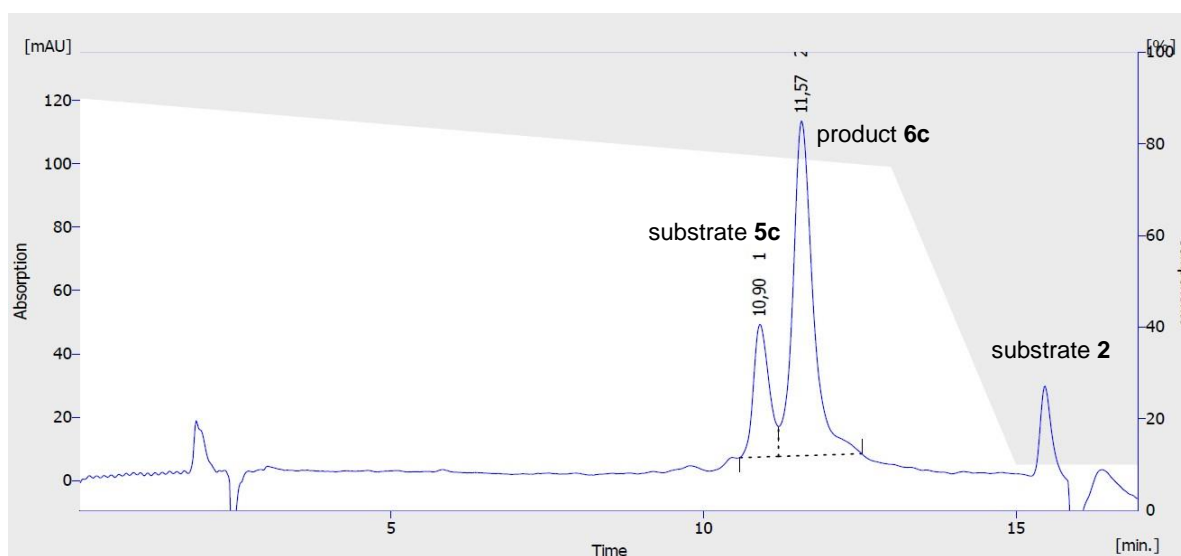
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	11,183	1890,771	132,193	67,6	71,2	0,22	895
2	11,833	906,791	53,422	32,4	28,8	0,27	979
	Total	2797,563	185,616	100,0	100,0		

After 3 h:



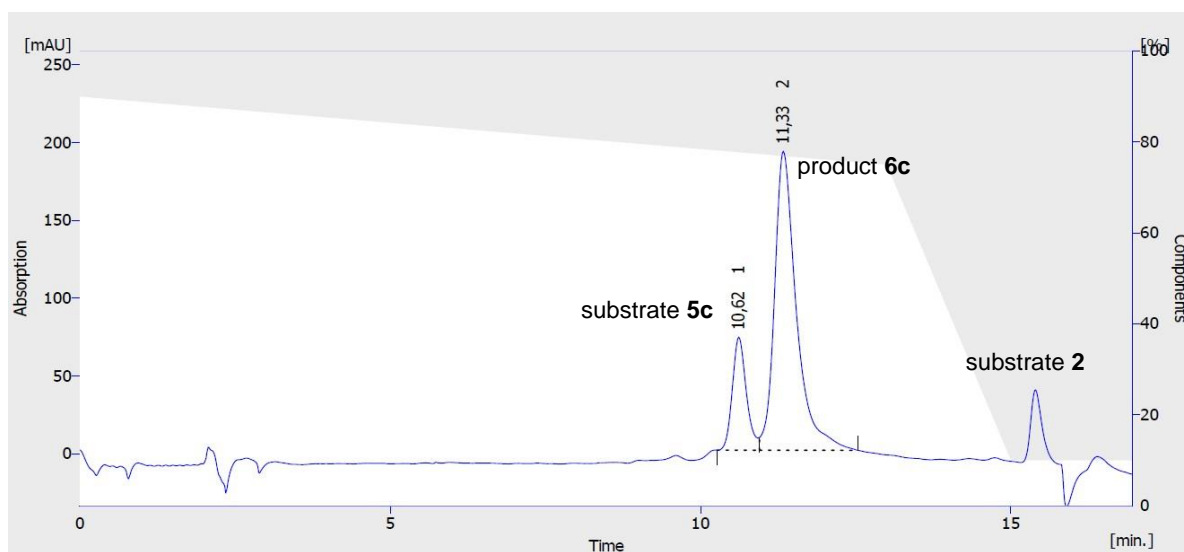
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	11,150	2237,585	154,013	55,6	62,9	0,25	854
2	11,750	1783,882	90,891	44,4	37,1	0,32	745
	Total	4021,466	244,904	100,0	100,0		

After 24 h:



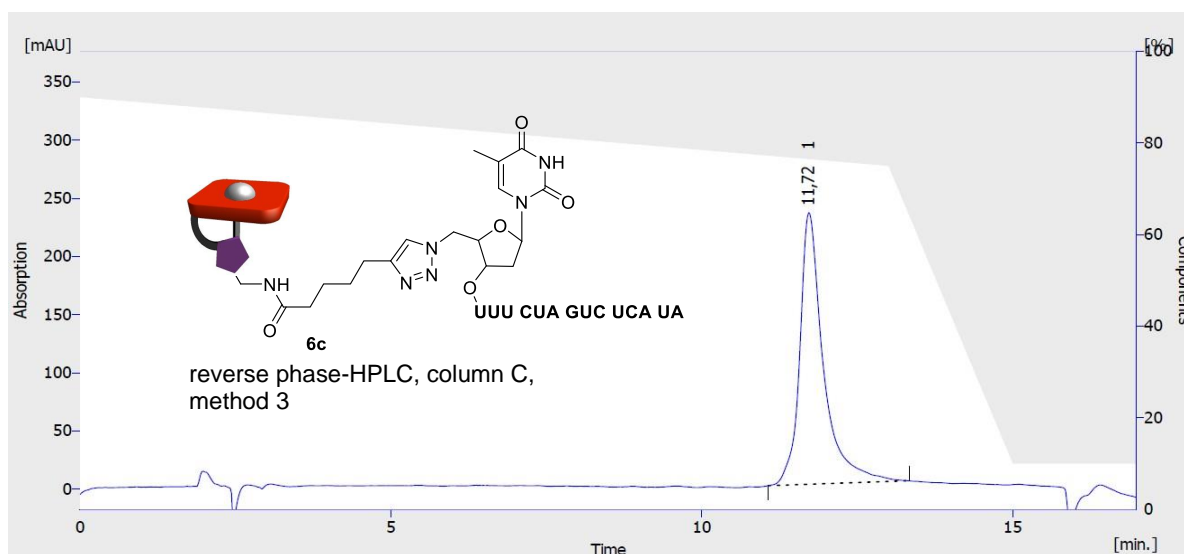
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	10,900	724,971	41,887	23,3	28,4	0,28	948
2	11,567	2388,673	105,682	76,7	71,6	0,33	881
	Total	3113,644	147,569	100,0	100,0		

After 48 h:



	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	10,617	1141,768	72,639	19,5	27,4	0,25	926
2	11,333	4716,857	192,267	80,5	72,6	0,35	943
	Total	5858,625	264,905	100,0	100,0		

Purified product 6c:

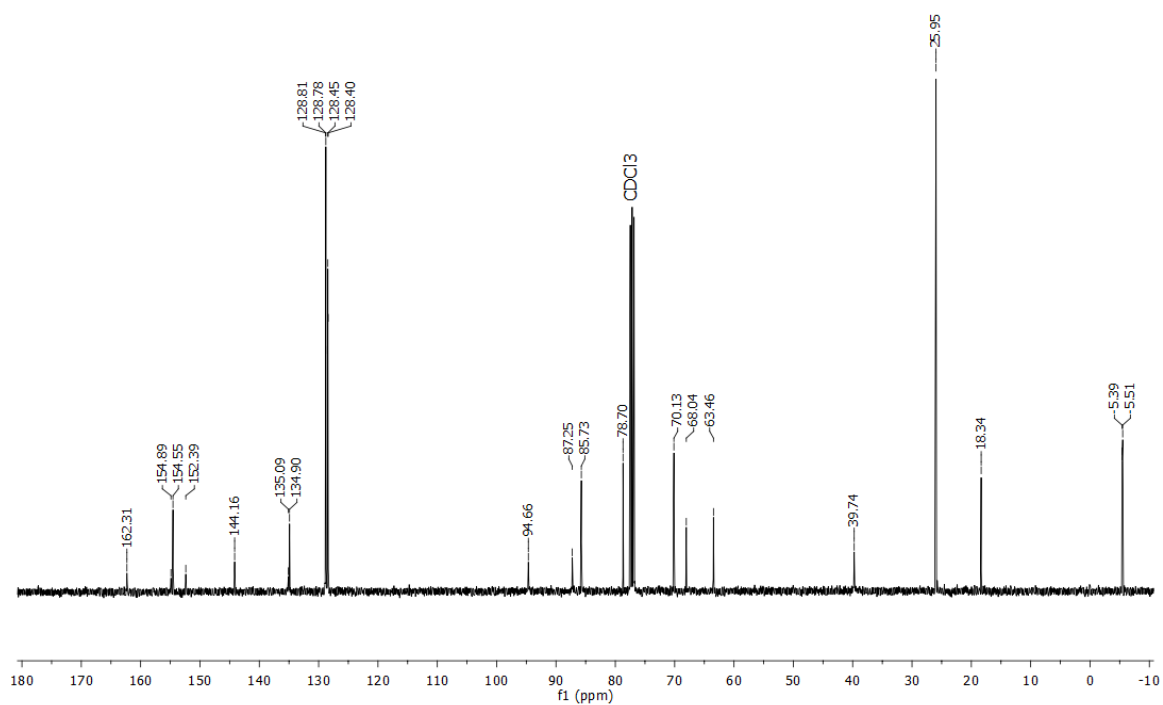
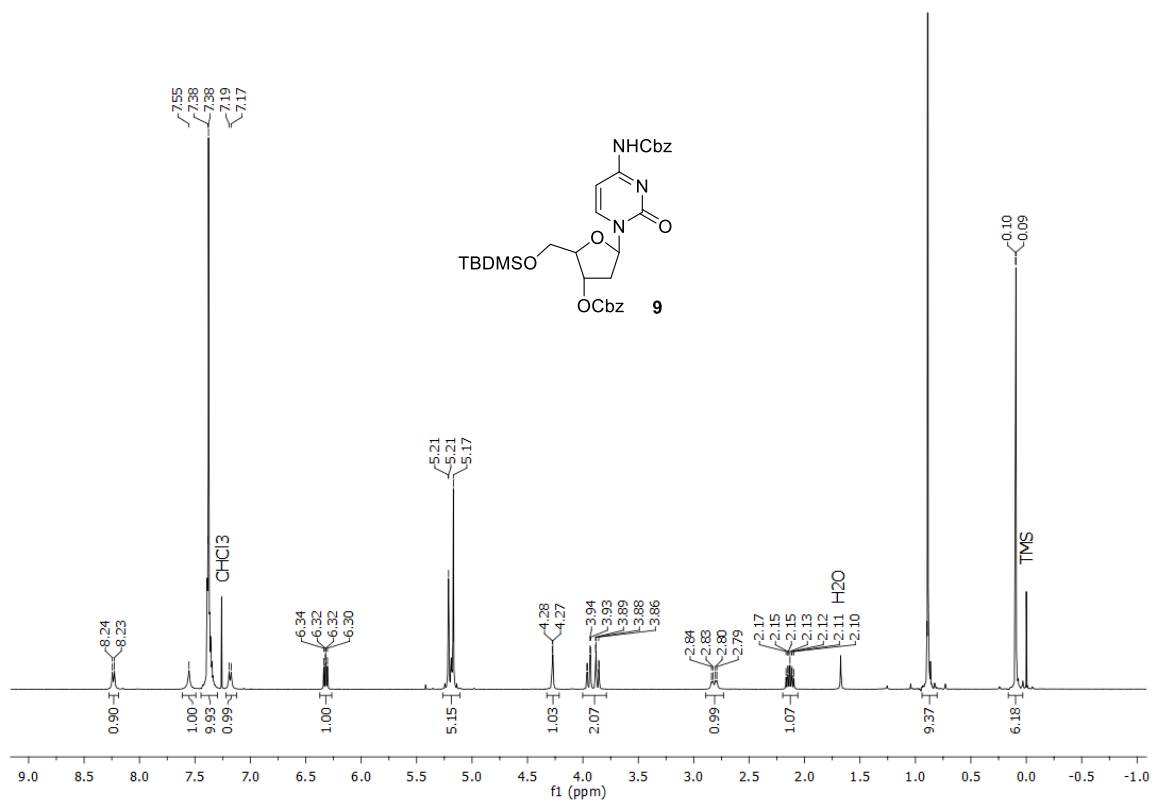


	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	11,717	6190,010	233,377	100,0	100,0	0,37	645
	Total	6190,010	233,377	100,0	100,0		

13. ^1H , ^{13}C and ^{31}P NMR spectra

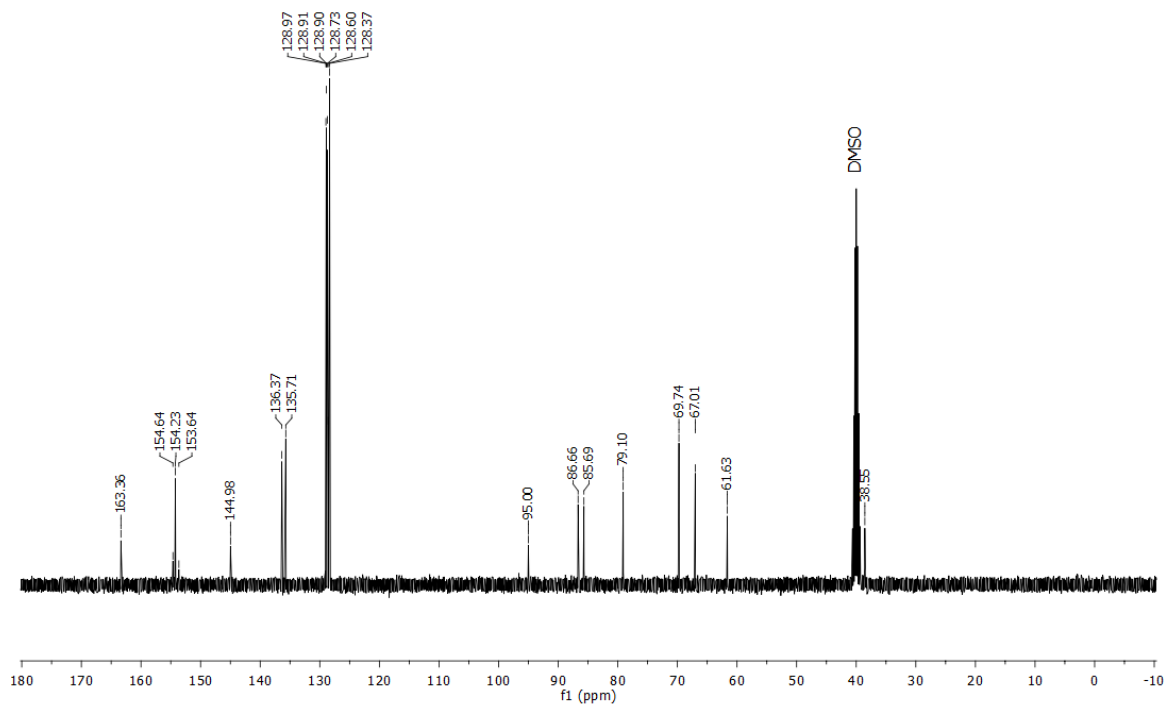
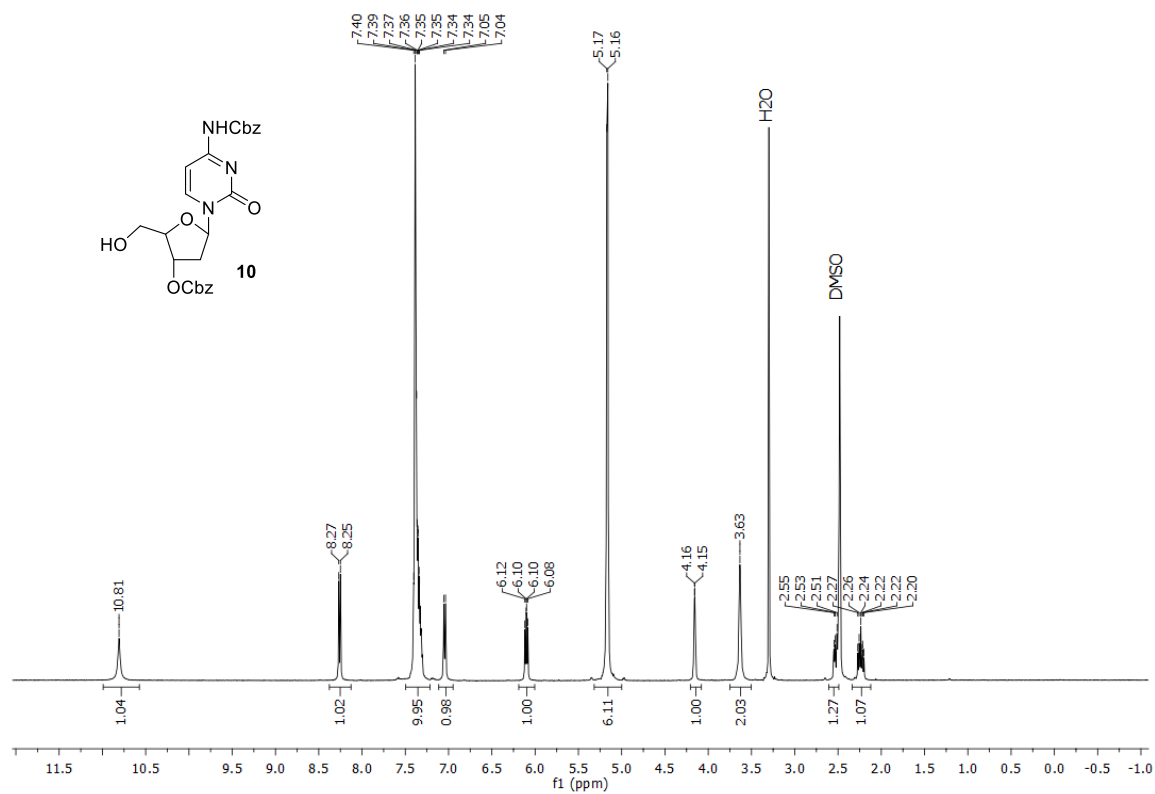
5'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-N⁴-3'-*O*-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (9)

^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (101 MHz) in CDCl_3



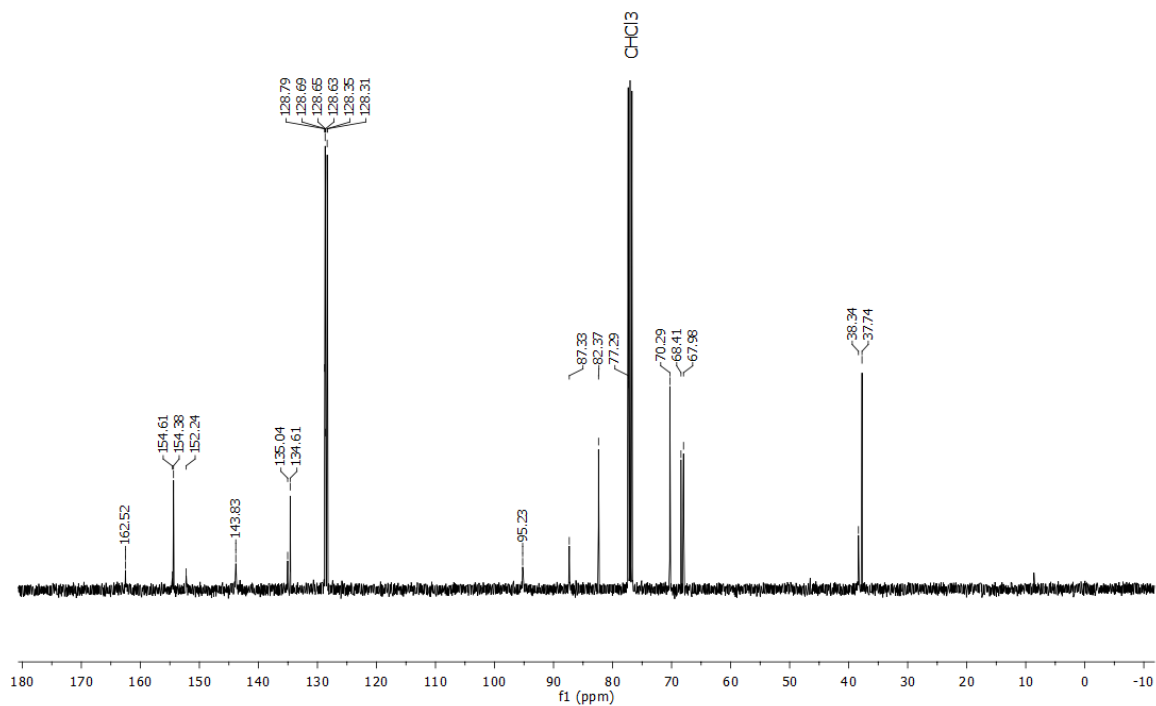
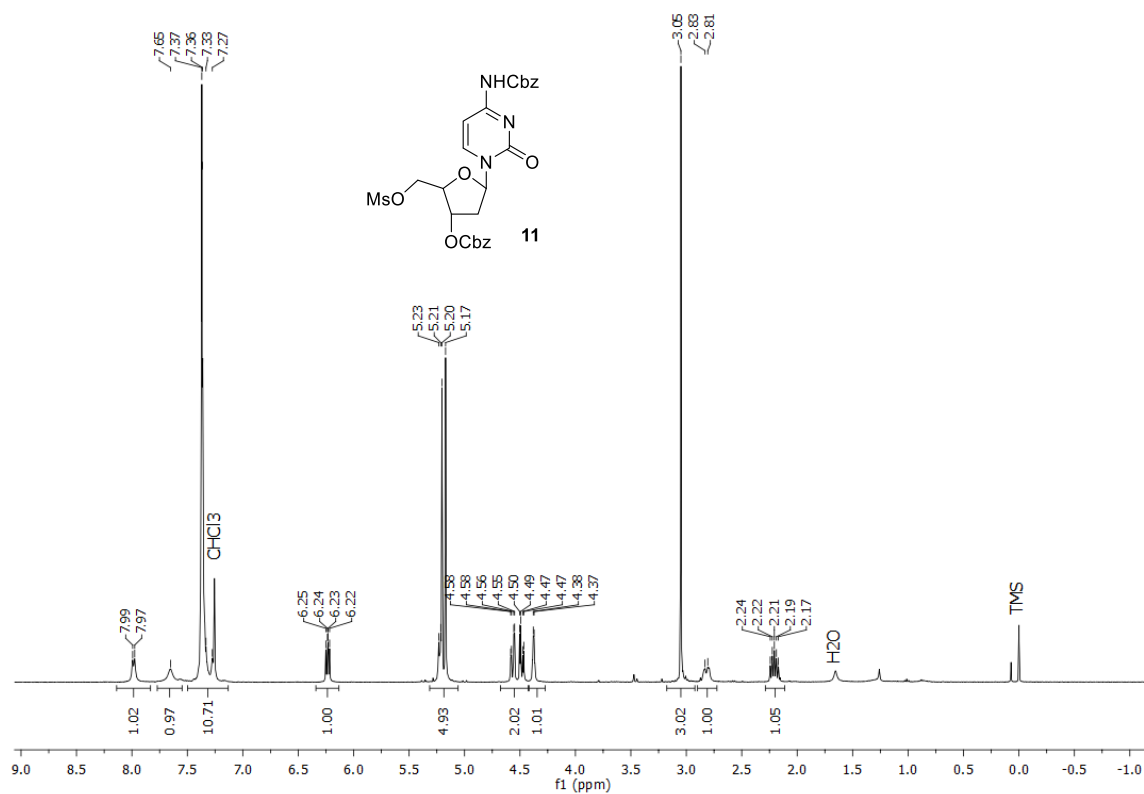
N⁴-3'-O-bis-benzoyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (10)

¹H NMR (400 MHz) and ¹³C NMR (101 MHz) in (CD₃)₂SO



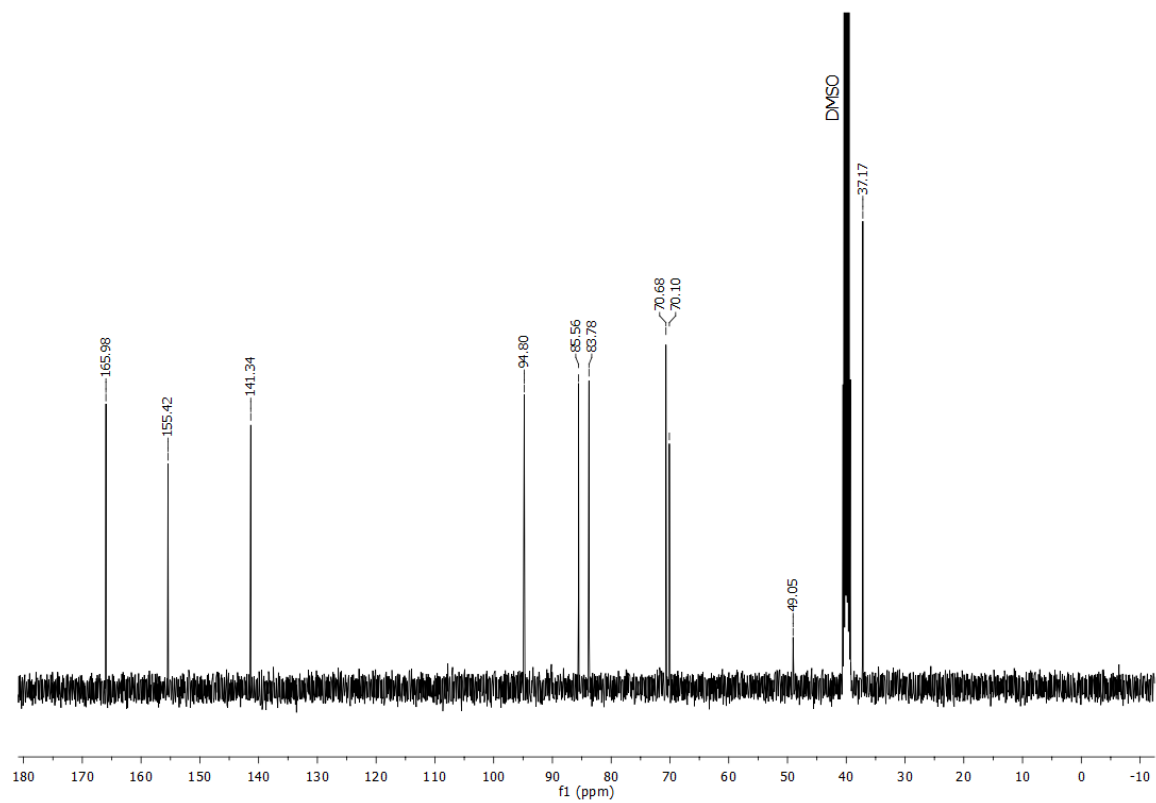
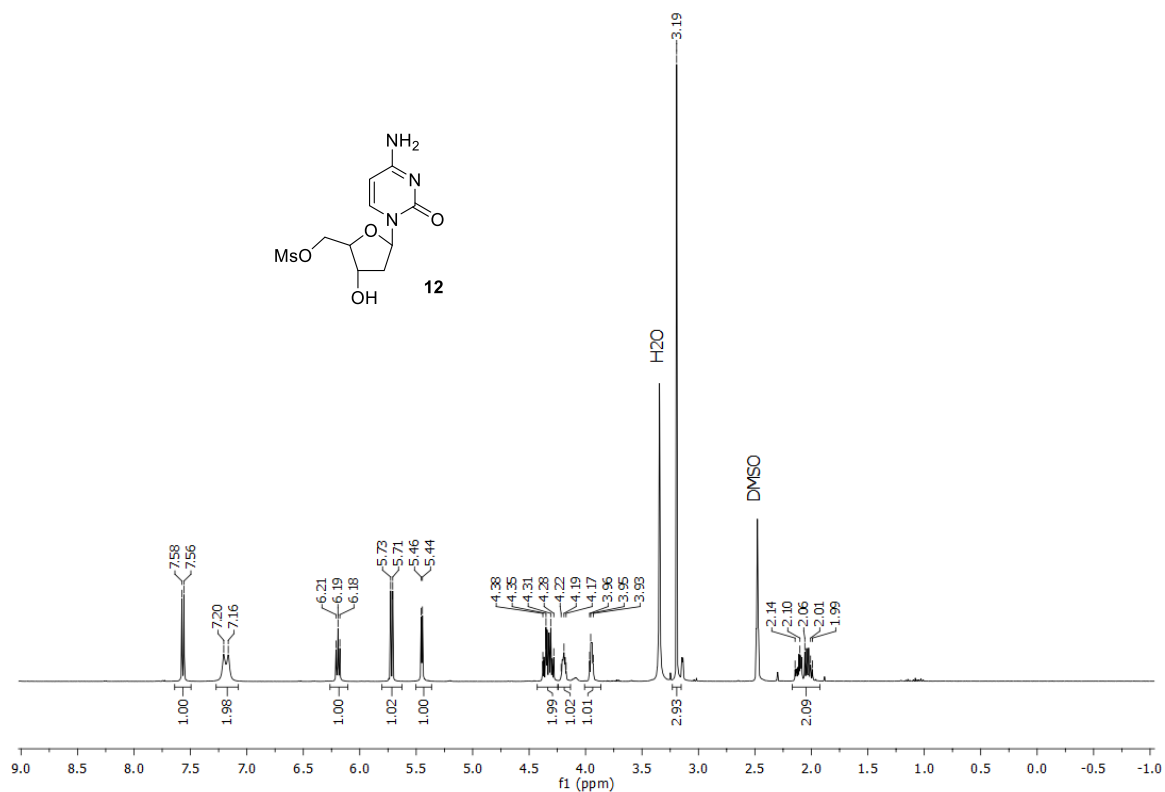
5'-Methanesulfonyl-N⁴-3'-O-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (11)

¹H NMR (400 MHz) and ¹³C NMR (101 MHz) in CDCl₃



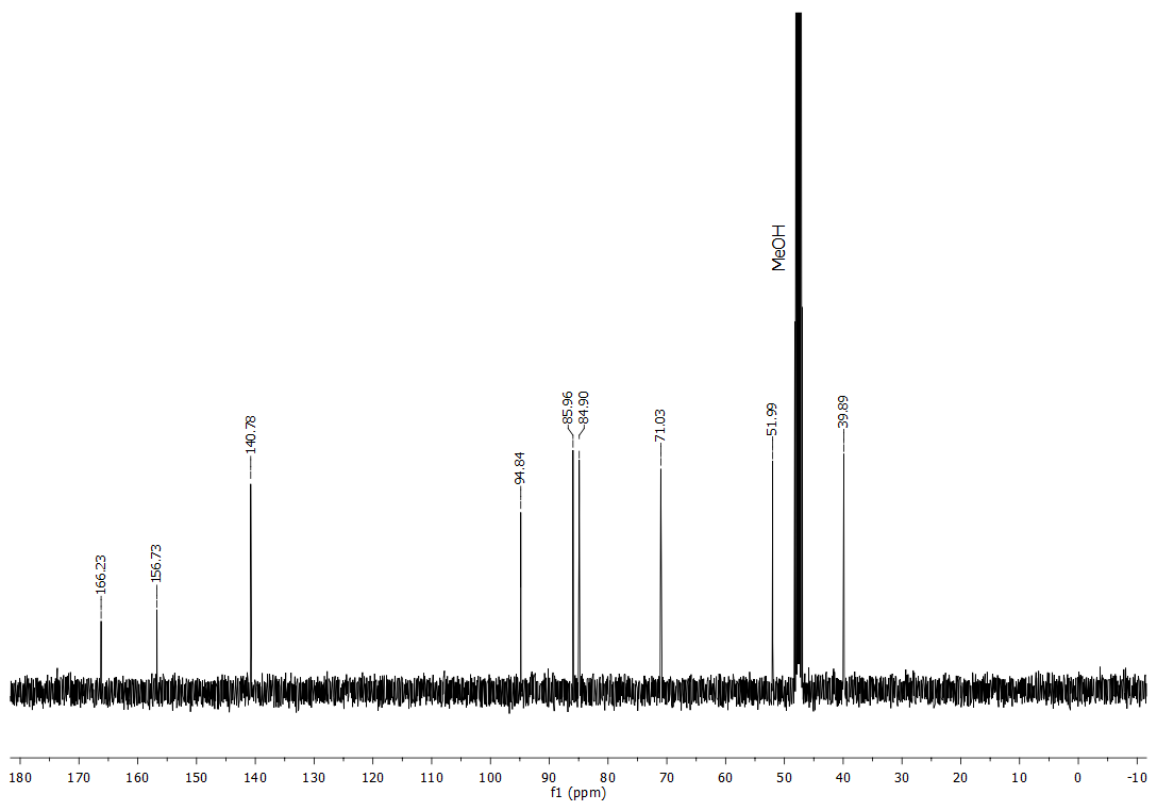
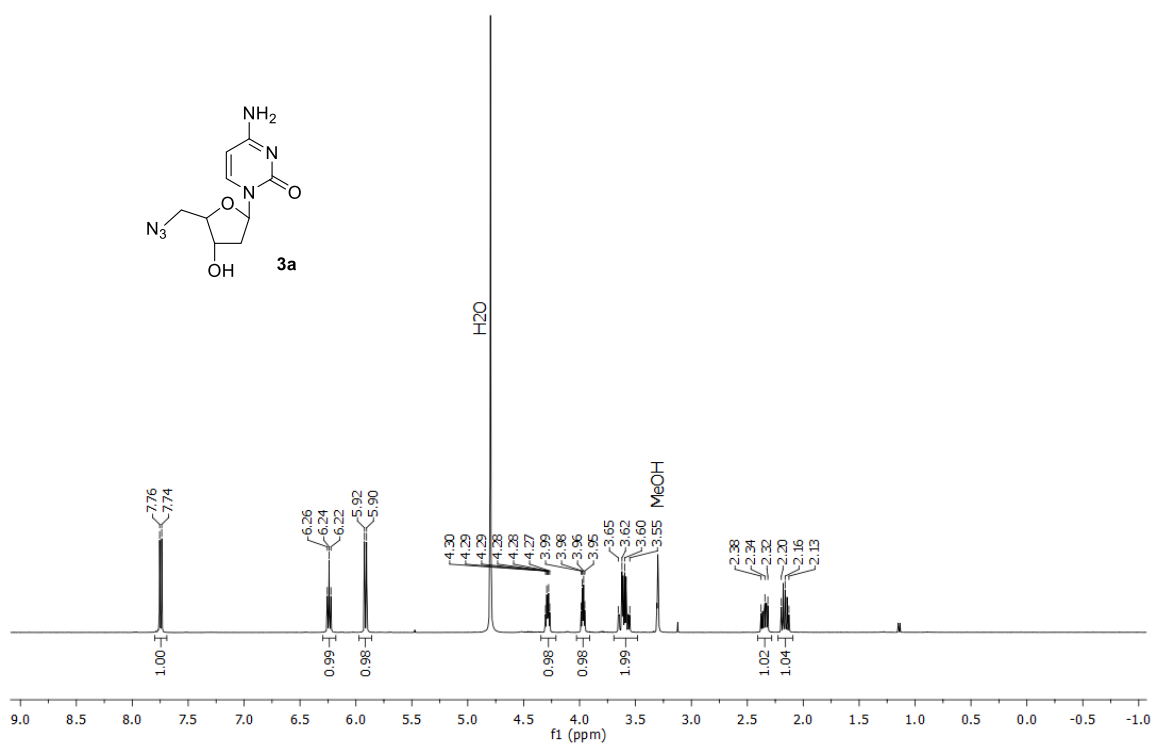
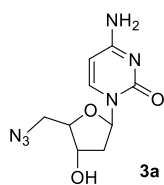
5'-Methanesulfonyl-2'-deoxycytidine (12)

^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (101 MHz) in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$



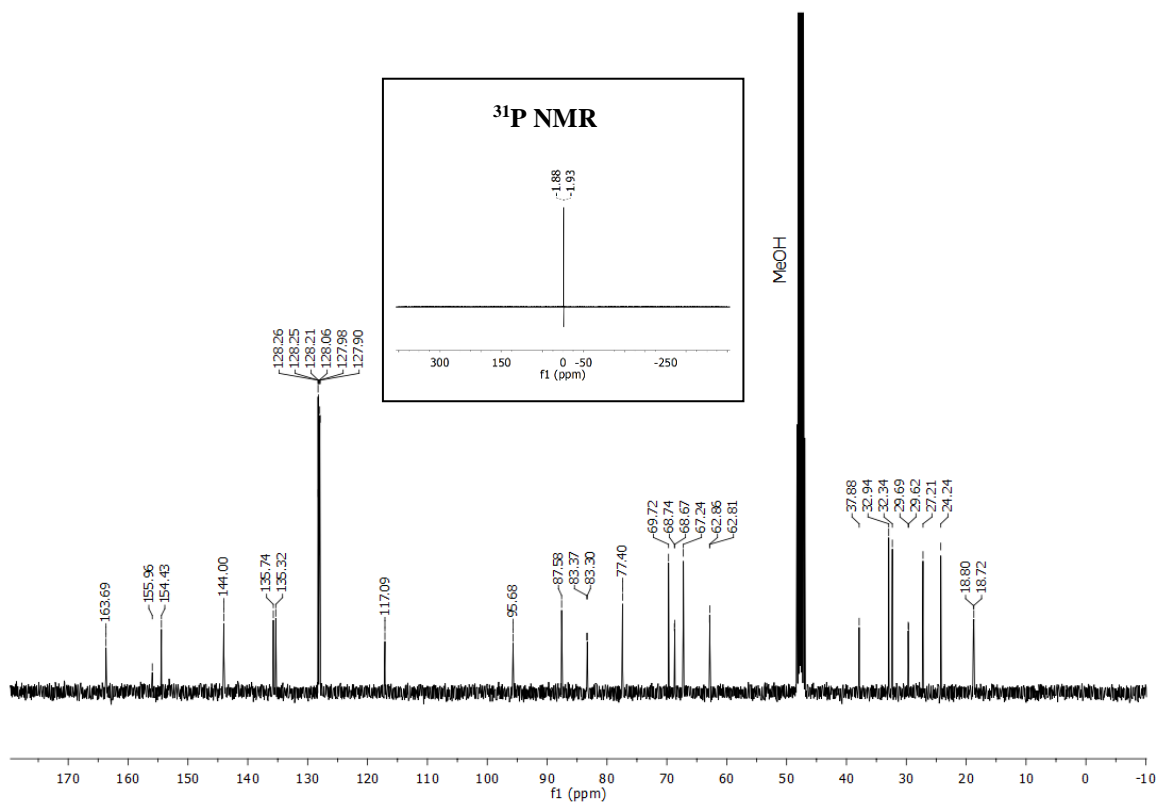
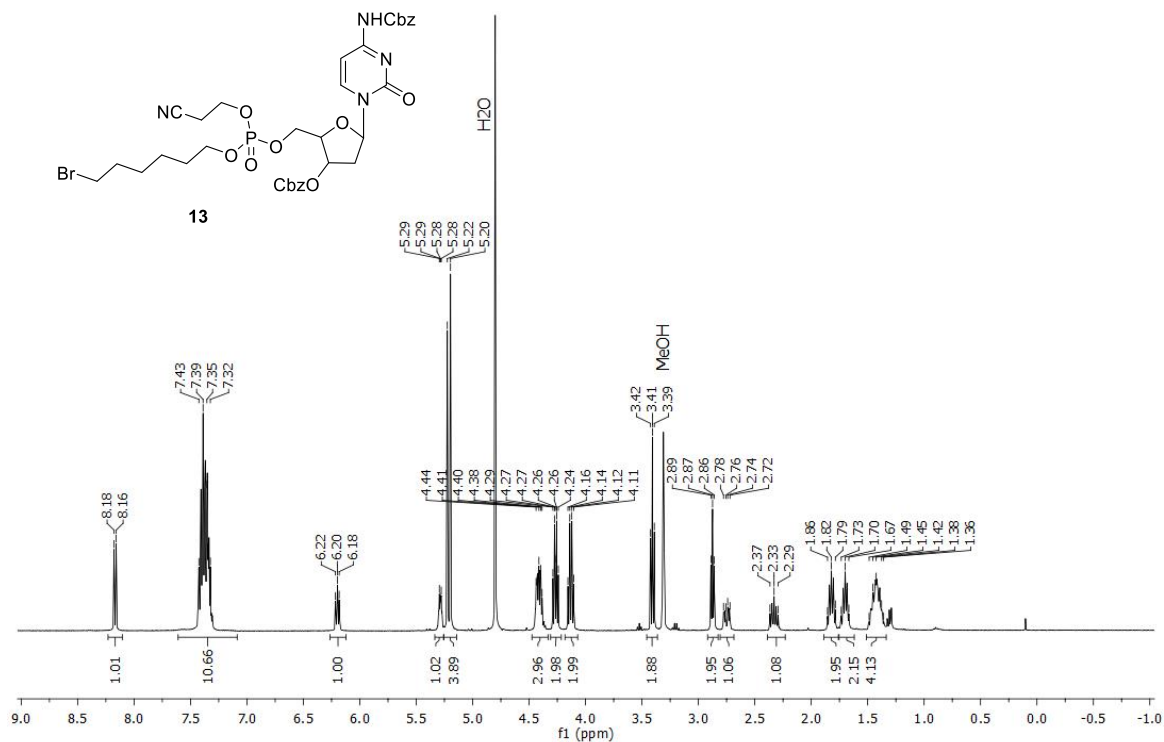
5'-Azido-2'-deoxycytidine (3a)

^1H NMR (400 MHz) and ^{13}C NMR (101 MHz) in CD_3OD

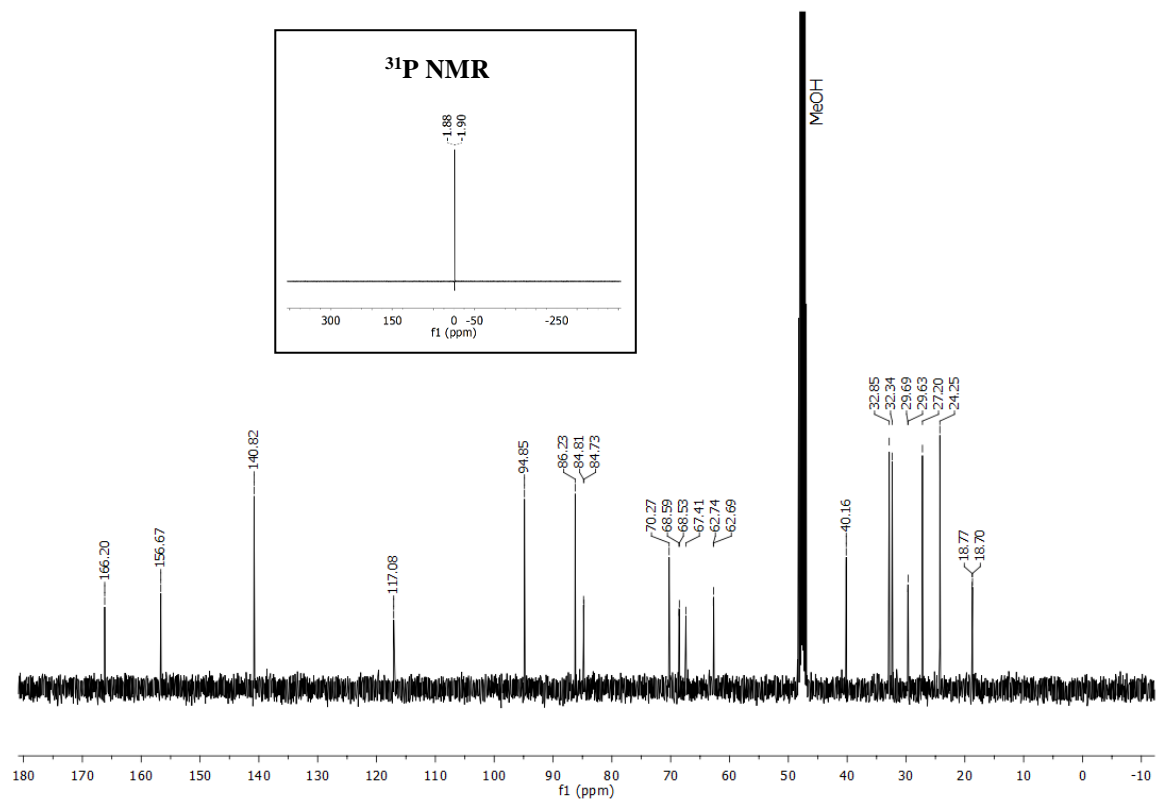
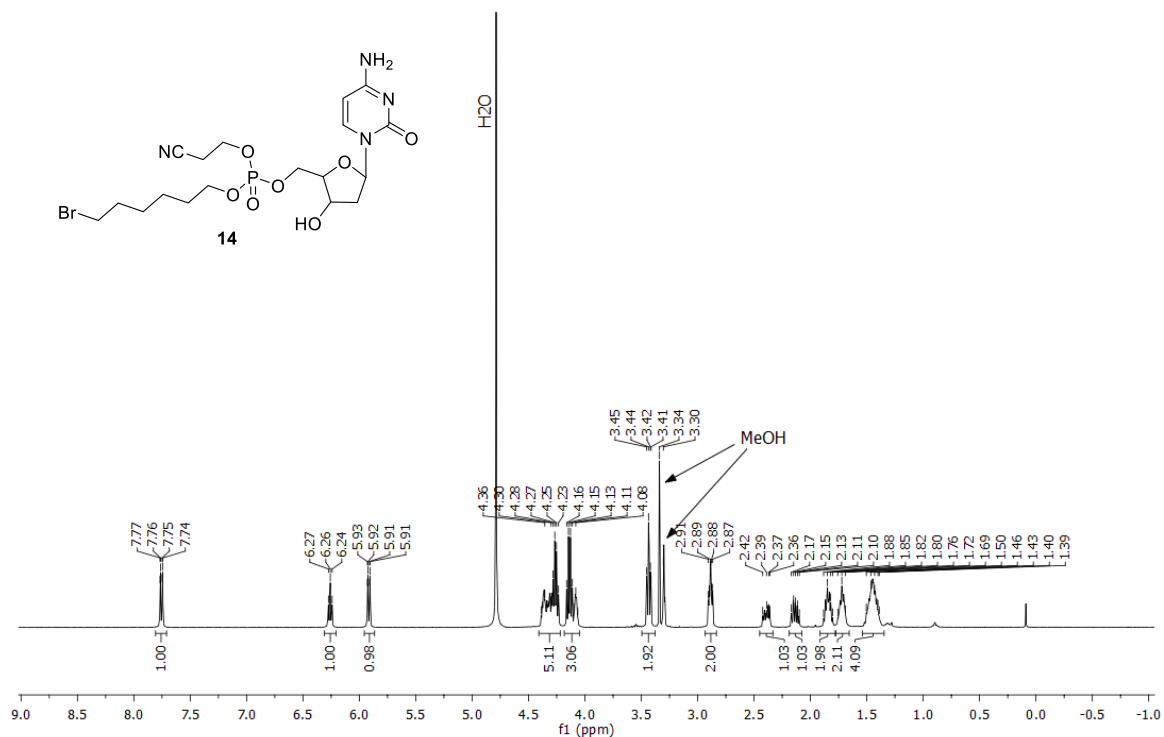


5'-(6-bromohex-1-yloxy-2-cyanoethoxy)phosphoryl-N⁴-3'-O-bis-benzyloxycarbonyl-2'-deoxycytidine (13)

¹H NMR (400 MHz), ¹³C NMR (101 MHz) and ³¹P NMR (162 MHz) in CD₃OD

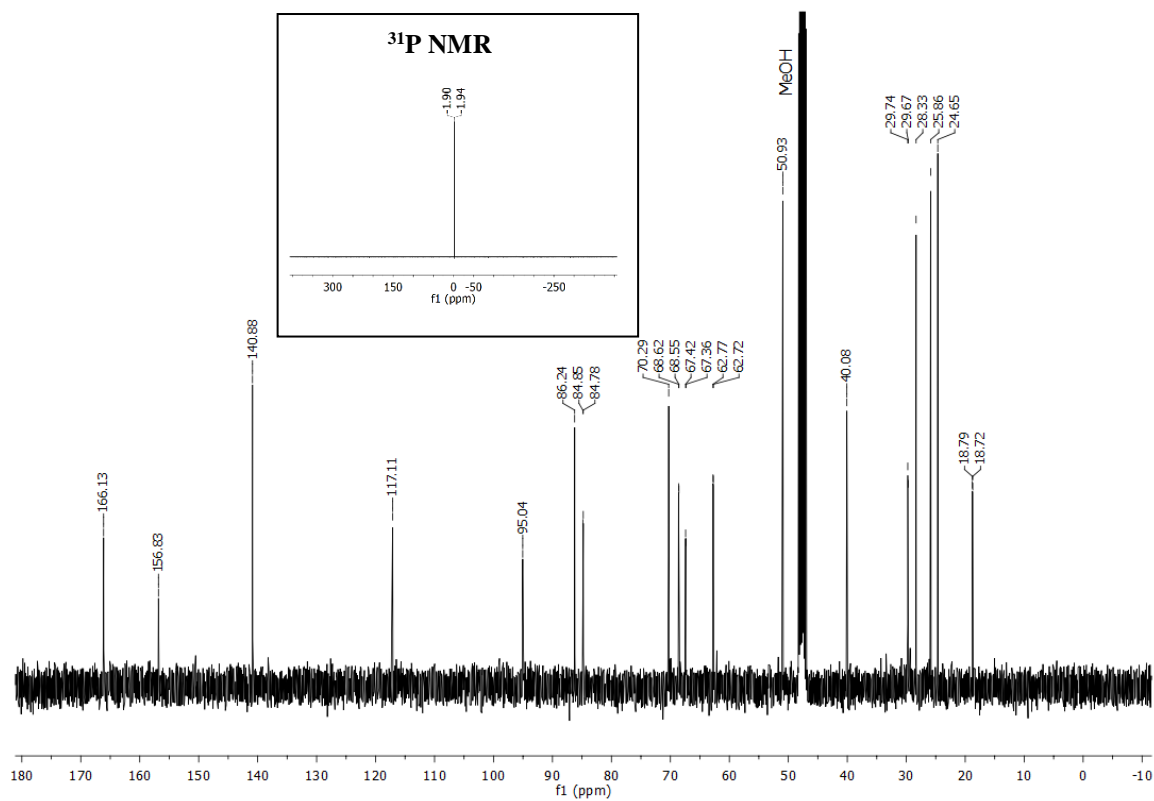
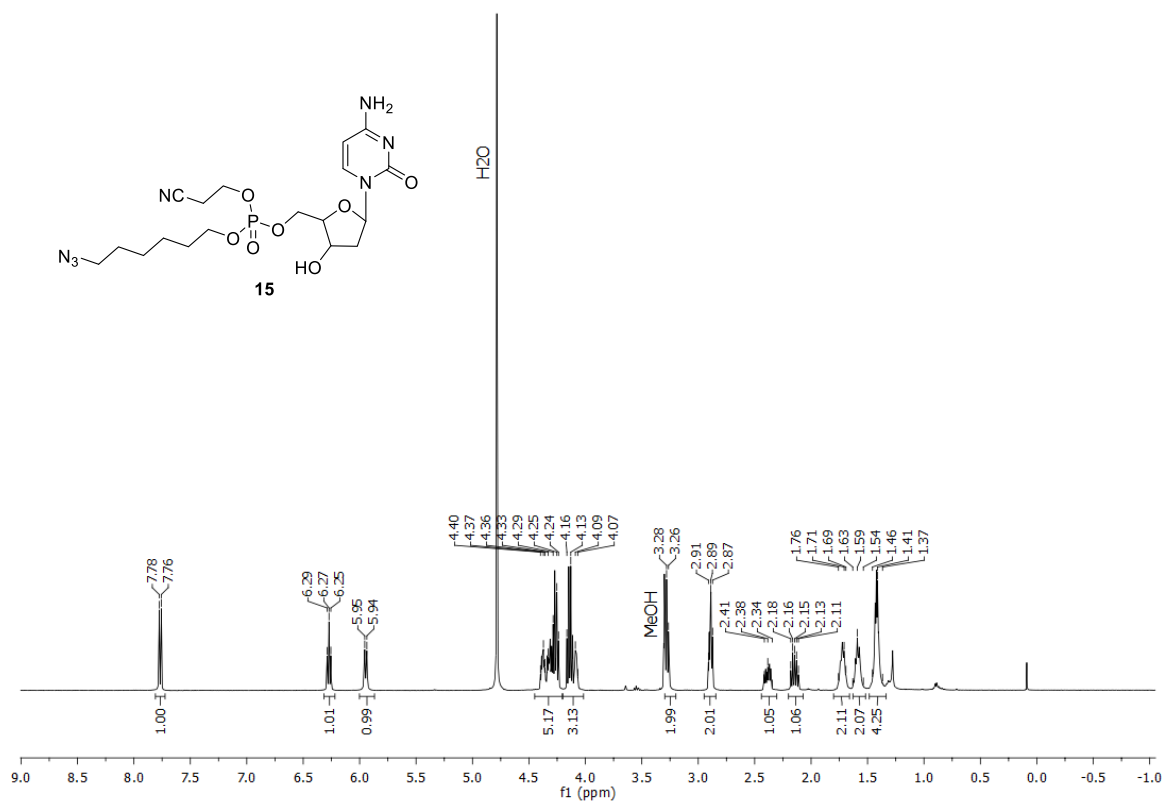


5'-(6-bromohex-1-yloxy-2-cyanoethoxy)phosphoryl-2'-deoxycytidine (14)
¹H NMR (400 MHz), ¹³C NMR (101 MHz) and ³¹P NMR (162 MHz) in CD₃OD



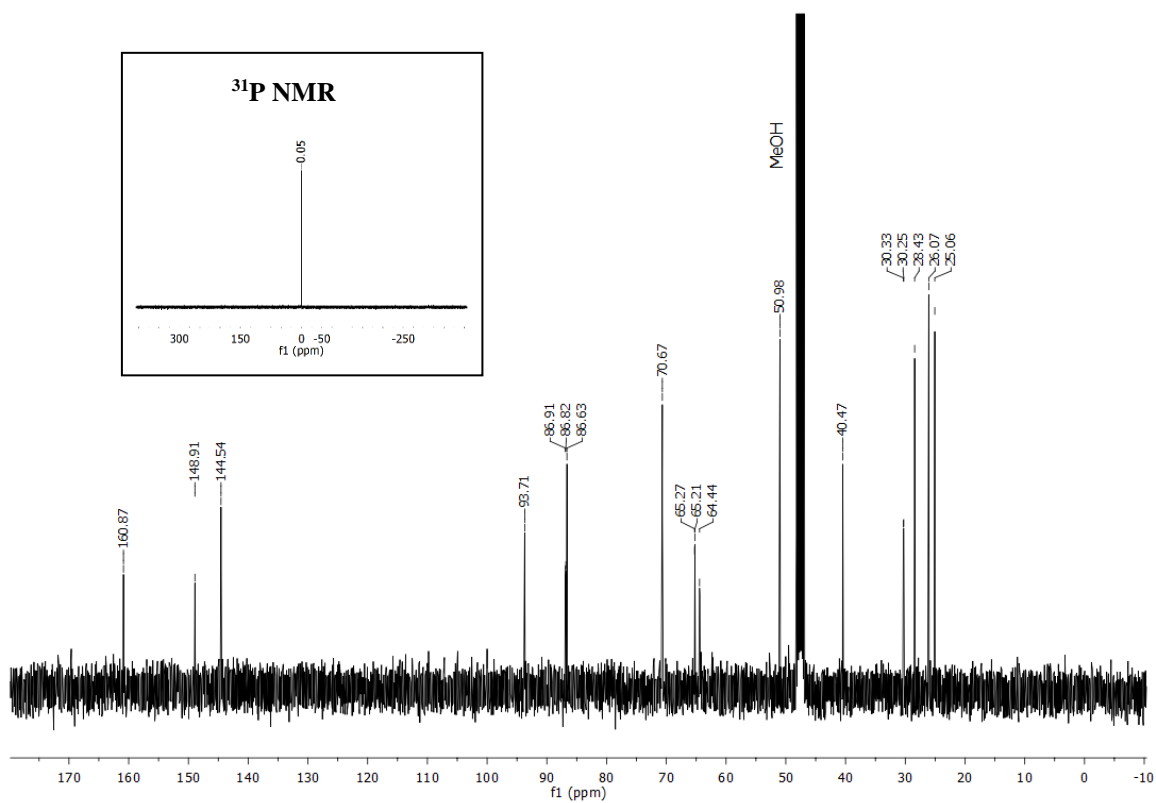
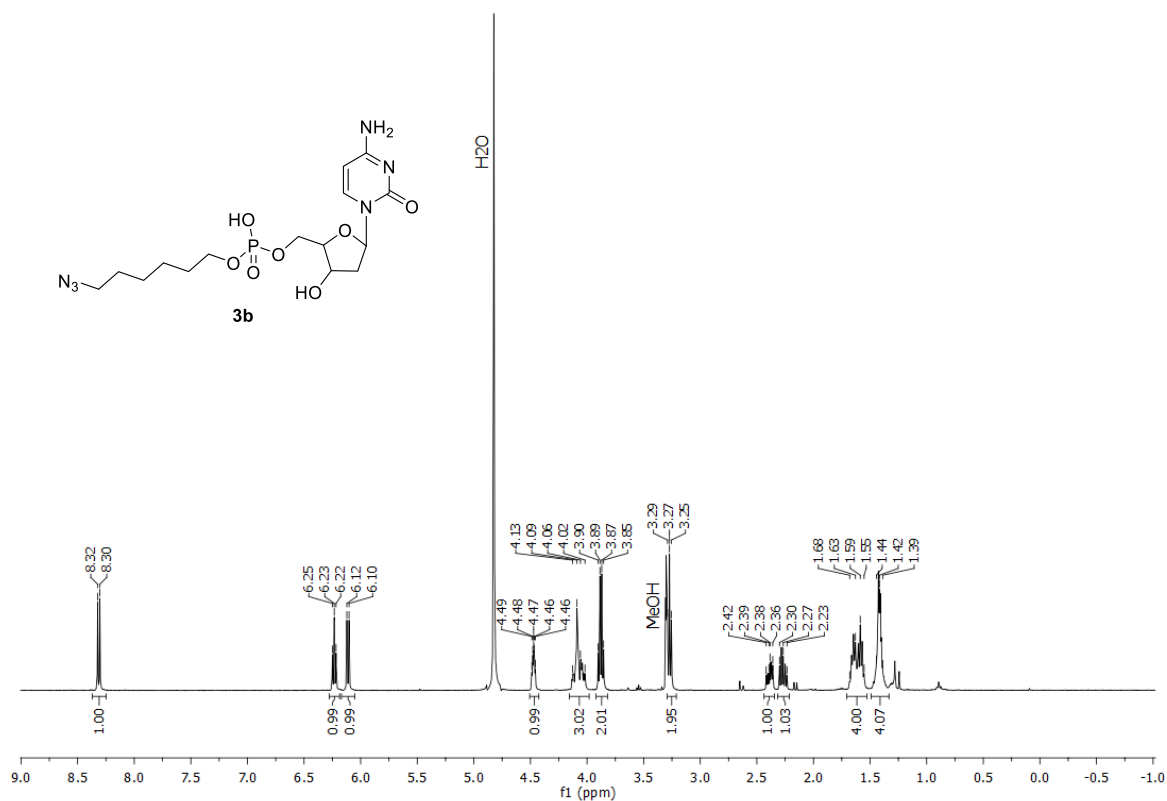
5'-(6-azidohex-1-yloxy-2-cyanoethoxy)phosphoryl-2'-deoxycytidine (15)

^1H NMR (400 MHz), ^{13}C NMR (101 MHz) and ^{31}P NMR (162 MHz) in CD_3OD



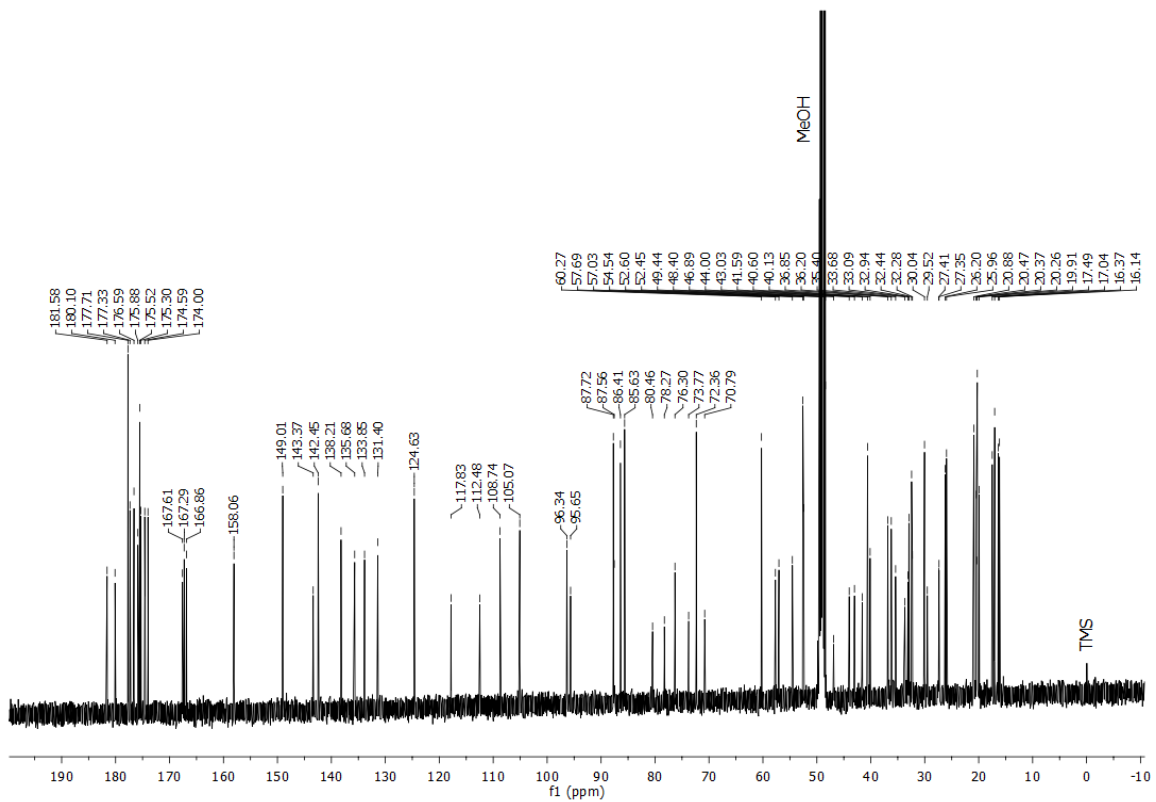
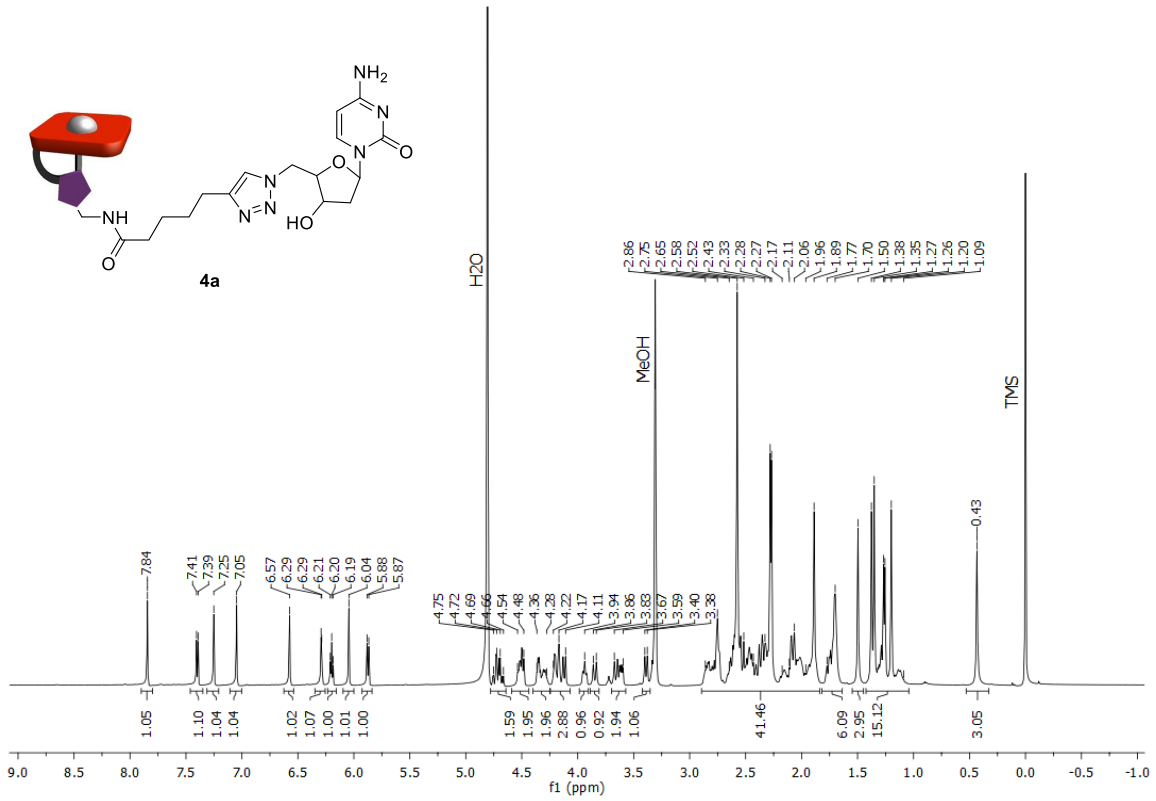
5'-(6-azidohex-1-yloxy)phosphoryl-2'-deoxycytidine (3b)

^1H NMR (400 MHz), ^{13}C NMR (101 MHz) and ^{31}P NMR (162 MHz) in CD_3OD



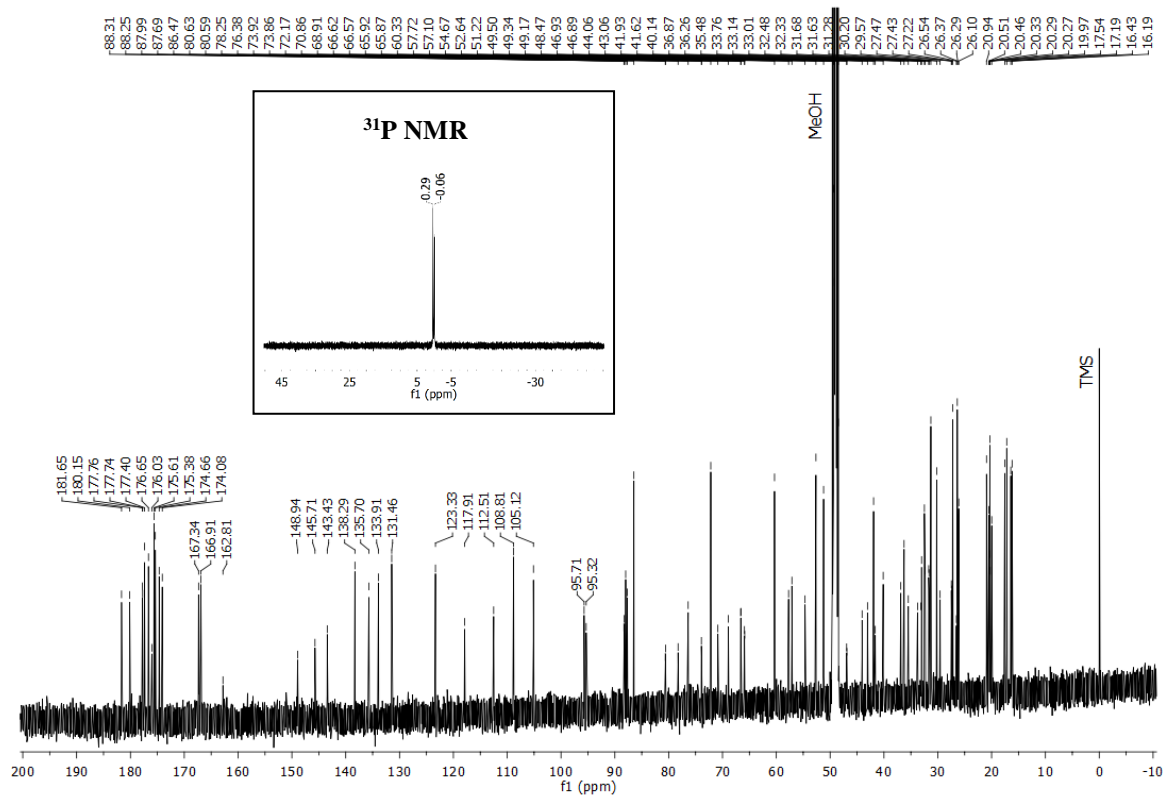
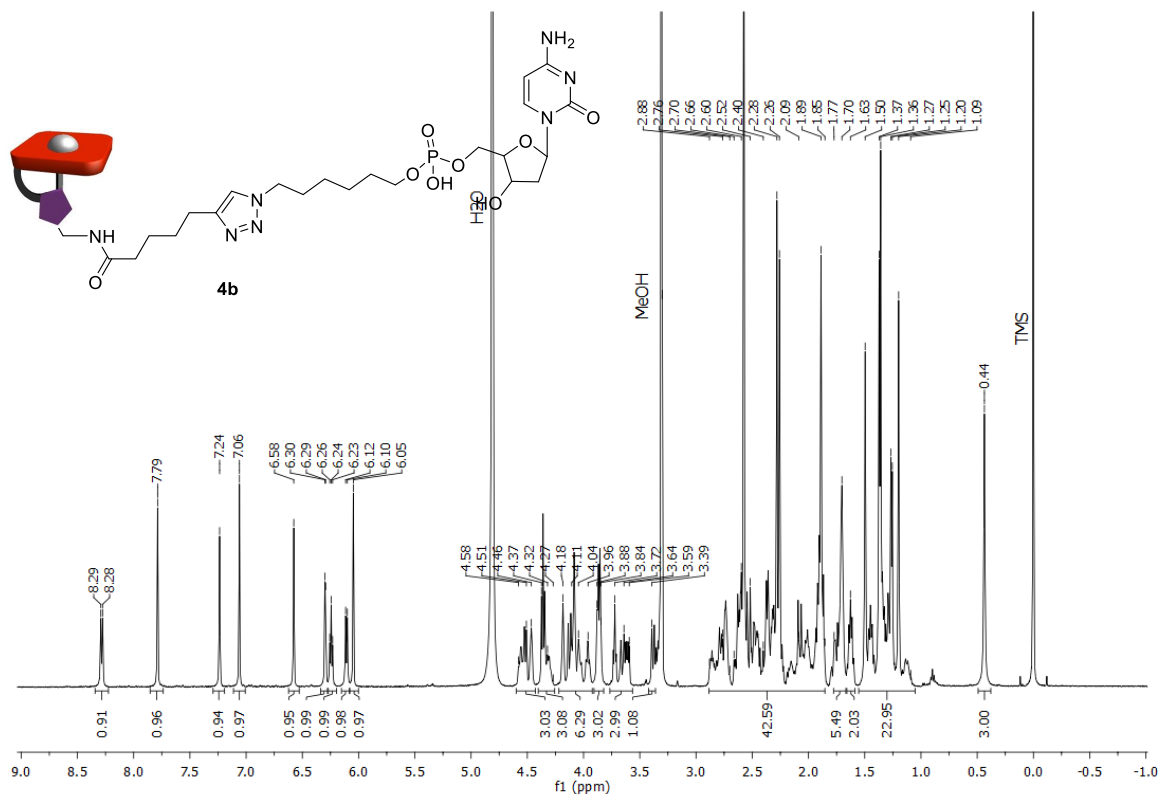
Nucleoside-vitamin B₁₂ conjugate 4a

¹H NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (126 MHz) in CD₃OD



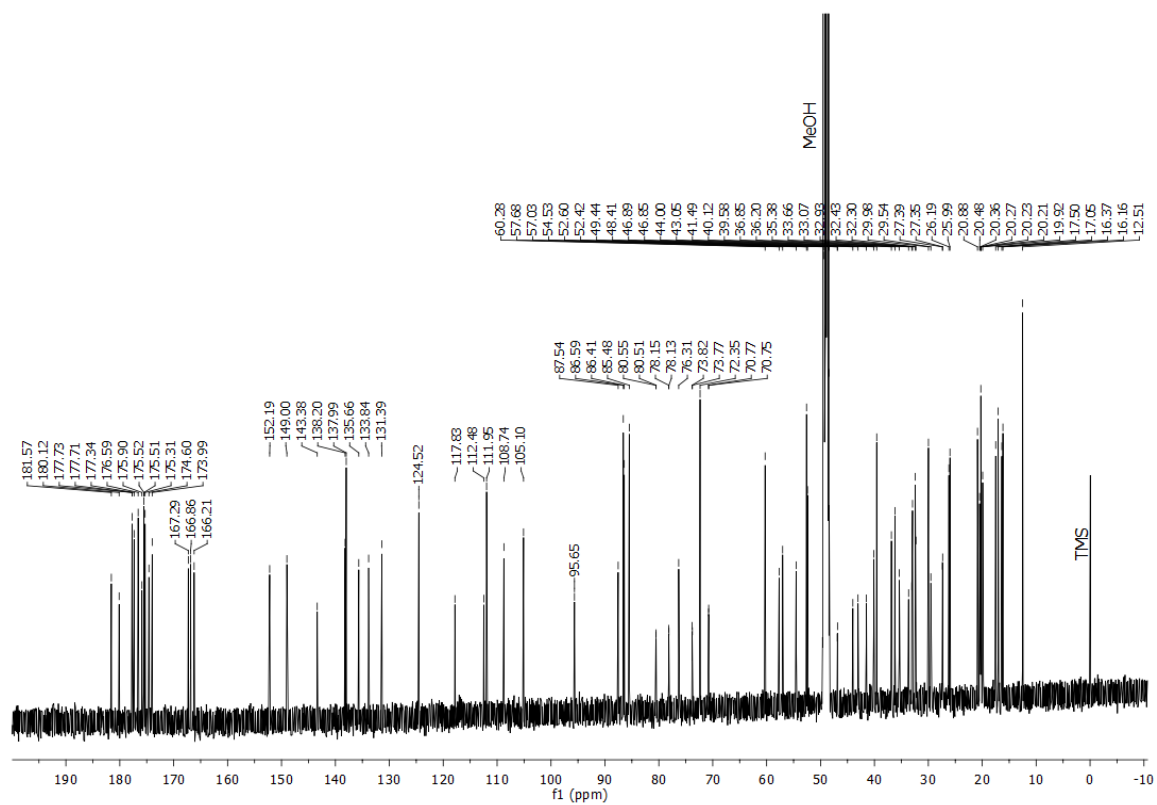
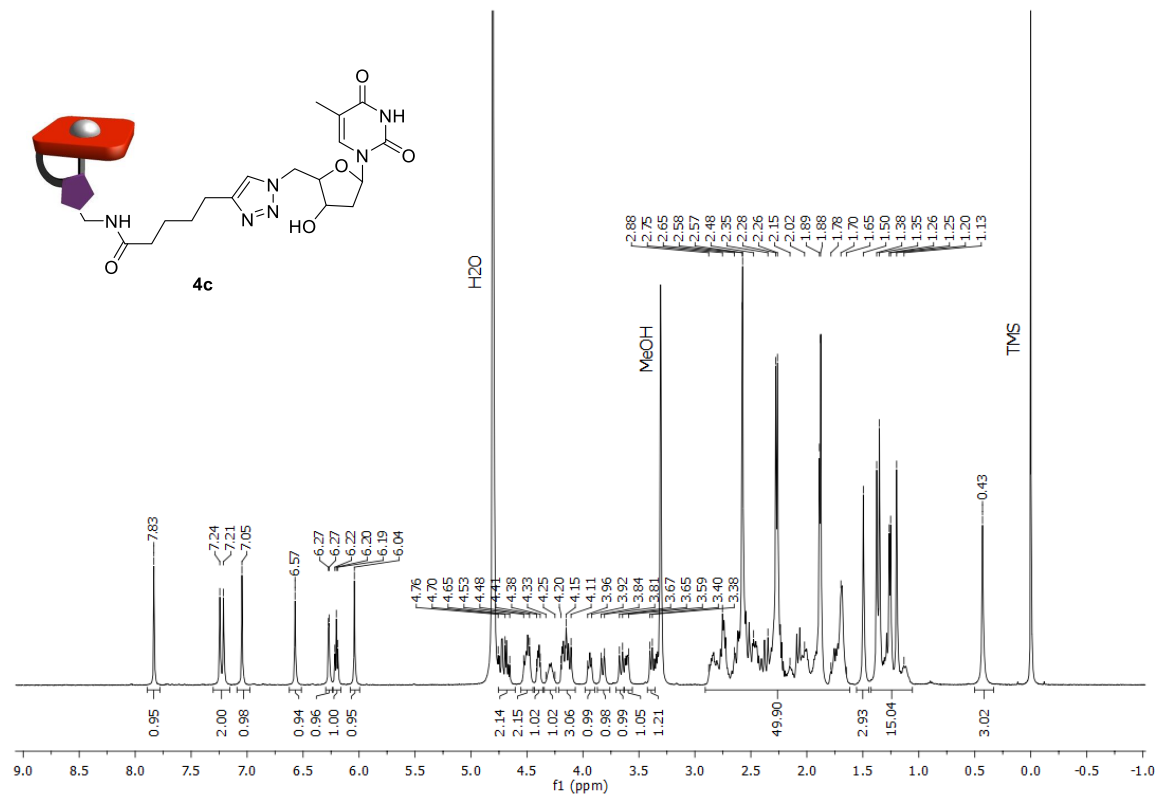
Nucleoside-vitamin B₁₂ conjugate 4b

¹H NMR (500 MHz), ¹³C NMR (126 MHz) and ³¹P NMR (202 MHz) in CD₃OD



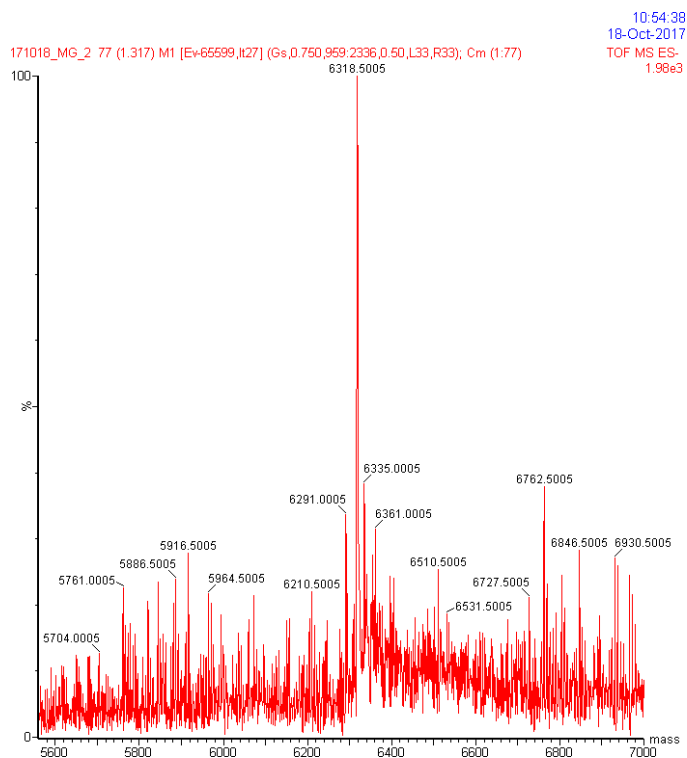
Nucleoside-vitamin B₁₂ conjugate **4c**

¹H NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (126 MHz) in CD₃OD

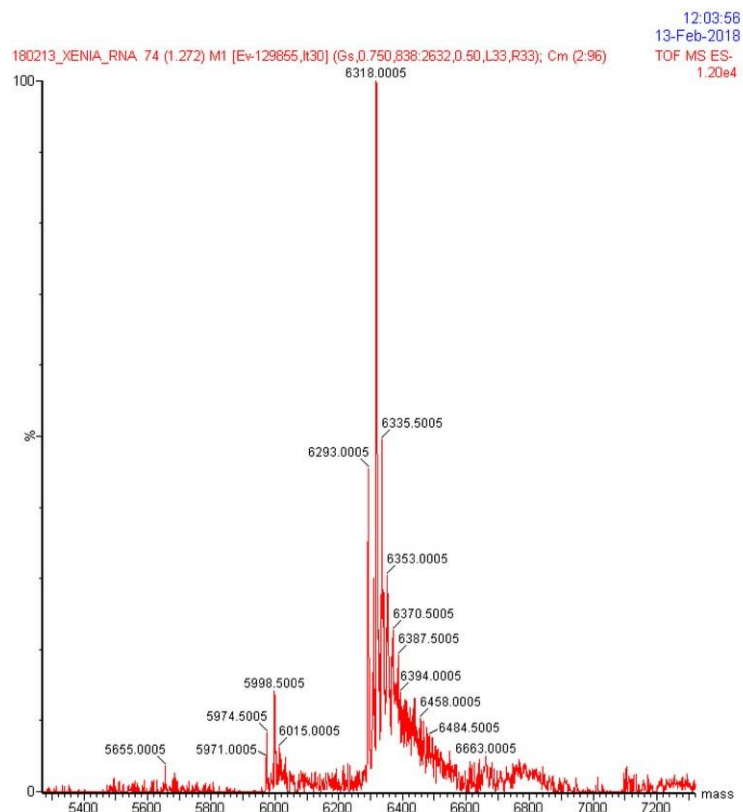


14. MS spectra of conjugates B₁₂-2'OMeRNA

2'OMeRNA-vitamin B₁₂ conjugate 6a



2'OMeRNA-vitamin B₁₂ conjugate 6c



Vitamin B₁₂ Derivatives Suitably Tailored for the Synthesis of Photolabile Conjugates

Agnieszka Jackowska and Dorota Gryko*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c00839>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

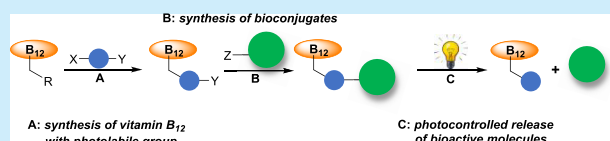


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Vitamin B₁₂ conjugates are broadly studied in biological sciences. As light offers spatiotemporal control, we decided to develop a method for the preparation of vitamin B₁₂ conjugates that release tethered molecules upon exposure to light. Herein, we report vitamin B₁₂ derivatives possessing a photolabile linker suitable for conjugation with amines, azides, and alkynes. The potential applications of such conjugates are broad and include the delivery of drugs, labels, and imaging agents to their place of action and spatiotemporal release.



Light is an external stimulus used to control chemical reactions not only in organic synthesis but also in biological systems.^{1,2} It is regarded as a noninvasive (with proper wavelength selection), orthogonal to most elements of living systems reagent that does not contaminate biological samples. These unique properties triggered broad use of light in chemical and biological sciences (artificial photosynthesis,³ water splitting,⁴ photocatalysis,⁵ imaging,⁶ phototherapeutics,^{2b} optogenetics,⁷ photolabeling,⁸ etc.). Within these fields, photolabile organic molecules found wide applications: in organic synthesis as photoremovable protecting groups⁹ and in chemical biology as “light-responsive agents” (triggering photorelease of biorthogonal functionalities or molecules with high spatial and temporal precision).¹⁰

Vitamin B₁₂ (**1**, cobalamin) has been extensively studied as a transporter of cargos into eukaryotic and prokaryotic cells (Figure 1).^{11,12} For this purpose its conjugates with therapeutics,¹³ fluorescent dyes,¹⁴ radioisotopic labels,¹⁵ peptides,¹⁶ metals,¹⁷ and oligonucleotides¹⁸ have been ex-

plored. Several methods for their preparation are currently available,¹⁹ but photomodulated approaches remain underexplored albeit offering numerous advantages including the possibility of disconnecting conjugates at the targeted site with temporal precision. This may be of importance for applications in which vitamin B₁₂ (**1**) interferes with a cargo binding site or in studies involving the bispecific interactions between cargo and other molecules of interest in a biological system.²⁰ In this line, Lawrence and Shell reported photolabile conjugates in which cargo molecules are appended at the central cobalt ion.²¹ These conjugates are also equipped with a fluorophore that responds to wavelengths from the edge of the UV to NIR spectrum triggering photohomolysis of the Co–C bond.

Herein, we report the synthesis of stable derivatives of vitamin B₁₂ (**1**) with a photocleavable moiety tethered at the 5'-position, at which functionalization, in general, does not affect the transport of cobalamin (**1**) into cells.²² Synthesized conjugates with the representative bioactive molecules, including amino acids, biotin, an oligonucleotide, and a fluorescent dye, undergo photolysis under blue light irradiation within minutes.

While designing a strategy for the preparation of light-responsive vitamin B₁₂ conjugates, different factors were considered. These include the following: (1) the site of conjugation at vitamin B₁₂ (**1**) because of the interference with binding to transport proteins, (2) type of a photoresponsive group, (3) the type of reactions suitable for conjugations, (4) the presence/absence of a linker, and (5) synthetic feasibility.

Received: March 10, 2021

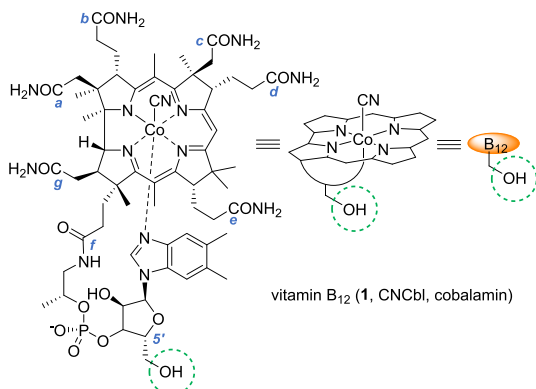


Figure 1. Vitamin B₁₂ structure and short representations.



Supporting Information for

**Vitamin B₁₂ derivatives suitably tailored for the synthesis
of photolabile conjugates**

Agnieszka Jackowska,^a Dorota Gryko^{a,*}

^aInstitute of Organic Chemistry, Polish Academy of Sciences, M. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland

Table of Contents

1. GENERAL INFORMATION	S3
2. OPTIMIZATION OF BIOCONJUGATE 6A SYNTHESIS	S5
3. HPLC METHODS USED	S6
4. PREPARATION OF STOCK SOLUTIONS: CU-TBTA, Et₃N/ACOH BUFFER AND ASCORBIC ACID	S8
5. EXPERIMENTAL PROCEDURES:	S9
5.1. For the synthesis of B ₁₂ -conjugate 6a (<i>via</i> intermediate 4)	S9
5.2. For the synthesis of B ₁₂ -conjugate 6b	S11
5.3. For the synthesis of B ₁₂ PEG2NH ₂ 7	S12
5.4. For the synthesis of B ₁₂ PEG2NH ₂ -photocleavable linker conjugate 8	S13
5.5. For the synthesis of B ₁₂ -conjugate 10a	S13
5.6. For the synthesis of B ₁₂ -conjugate 10b	S14
5.7. For the synthesis of compound 12	S15
5.8. For the synthesis of B ₁₂ -conjugate 14	S16
6. PHOTOCONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE MOLECULES	S17
6.1. Photoreaction setup	S17
6.2. Photorelease conversion	S17
6.3. Optimization based on the B ₁₂ -biotin conjugate 10a	S18
6.4. Photocontrolled release of cargo from bioconjugates 6a , 6b , and 14	S24
6.5. Isolation of photolysis products	S30
7. HPLC ANALYSES	S33
8. STABILITY OF BIOCONJUGATES 6B AND 10A	S38
9. ¹H AND ¹³C NMR SPECTRA	S43
9.1. ¹ H NMR and ¹³ C NMR of compound 4 , after hydrolysis	S43
9.2. ¹ H NMR and ¹³ C NMR of compound 5b (isolated after photo-release)	S45
9.3. ¹ H NMR and ¹³ C NMR of compound 6a , stereoisomer I	S47
¹ H NMR and ¹³ C NMR of compound 6a , stereoisomer II	S49
9.4. ¹ H NMR and ¹³ C NMR of compound 6b	S51
9.5. ¹ H NMR and ¹³ C NMR of compound 7	S53
9.6. ¹ H NMR and ¹³ C NMR of compound 7 (isolated after photo-release)	S55
9.7. ¹ H NMR and ¹³ C NMR of compound 8	S57
9.8. ¹ H NMR and ¹³ C NMR of compound 10a	S59
9.9. ¹ H NMR and ¹³ C NMR of compound 12	S61
10. MS SPECTRA OF BIOCONJUGATE 10B	S63
11. REFERENCES	S64

1. GENERAL INFORMATION

Commercially available reagents and solvents were used as received.

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded at room temperature on Varian 500 MHz spectrometer with the residual solvent peak as an internal standard. Data are reported as follows: chemical shift, peak multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet), number of protons and coupling constants (Hz).

UV-visible spectra were recorded on a Jenway 7315 Spectrophotometer.

High resolution mass spectra were recorded on SYNAPT or Waters Q-TOF Premier spectrometers.

All reactions and purity of products were monitored using RP HPLC. HPLC measurement conditions: column, Kromasil Eternity-5-C18, 250 mm \times 4.6 mm with a precolumn; UV/vis detection, pressure 15 MPa; room temperature; wavelengths, flow rates, and HPLC methods are given below. Preparative chromatography was performed using reversed-phase silica gel LiChroprep[®] RP-18 (40-63 μm) (Merck) with redistilled water and HPLC grade MeCN as eluents. In some cases, preparative HPLC was used for purification of products (column, KNAUER, E II 100-10 C18, 250 mm \times 20 mm with a precolumn; UV/vis detection, pressure 10 MPa; room temperature; wavelengths, flow rates, and HPLC methods are given below.

Linker 1-(5-methoxy-2-nitro-4-prop-2-ynyloxyphenyl)ethyl *N*-succinimidyl carbonate (**2**) was synthesized according to the literature procedure.^{1, 2}

The exact concentration of a solution of oligonucleotide **9b** was determined on Spectrophotometer DeNovix DS-11.

Oligonucleotide **9b** was provided by FutureSynthesis Sp. z o. o.:

5'-N₃-deoxythymidine-UUU CUA GUC UCA UA-3' (**9b**):

MW: 4855.2 g/mol; Molar Ext.coeffic.: 148600 L·mol⁻¹·cm⁻¹

R =

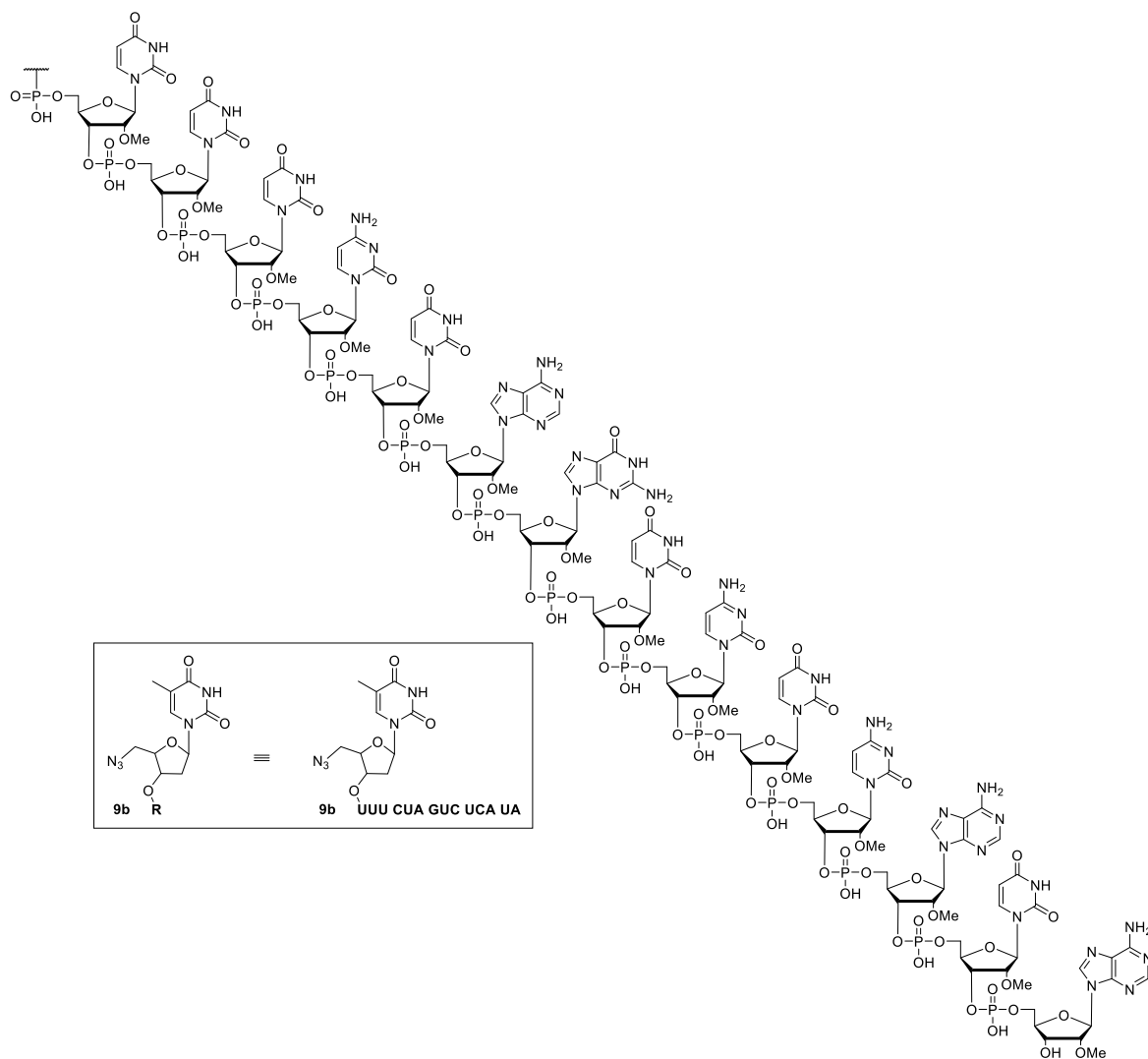
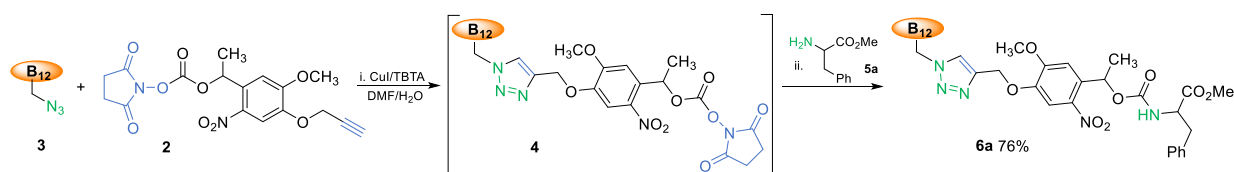


Figure 1. A simplified representation of 2'OMeRNA **9b**.

2. OPTIMIZATION OF BIOCONJUGATE 6A SYNTHESIS



Scheme 1. Vitamin B₁₂ with a photolabile linker suitable for conjugation with amines.

The reaction conditions for the one-pot procedure were optimized with respect to the solvent, an amount of photocleavable linker **2**, phenylalanine methyl ester (**5a**) – as a model amine, and a catalyst. (Table 1).

Table 1. Optimization of the consecutive CuAAC of azide **3 with linker **2** and amidation with amine **5a**.^a**

Entry	2 equiv	CuI/TBTA μmol ^b	5a equiv ^c	DMF/H ₂ O mL	Time h	Yield % ^d
1	1.5	0.4/0.8	1.5	0.25+0.25	0.5	67
					1	83
					2	89
					3	89
					24	89
2	1.1	0.4/0.8	1.1	0.25+0.25	0.5	39
					1	64
					2	75
					3	77
					24	81
3	1.5	0.2/0.4	1.5	0.25+0.25	0.5	40
					1	64
					2	78
					3	78
					24	79
4	1.5	0.4/0.8	1.5	0.1+0.1	0.5	67
					1	80
					2	86
					3	87
					24	86
5	1.5	0.4/0.8	1.5	0.5+0.5	0.5	63
					1	76
					2	84
					3	85
					24	85

^aGeneral conditions: Azide **3** (2.5 mg, 2.0 μmol), rt. ^bThe system of CuSO₄ and ascorbic acid were also tested, but does not work. ^cPhenylalanine methyl ester hydrochloride (**5a**) was neutralized with Et₃N before the reaction. ^dYields based on HPLC measurements.

Optimal conditions: Azide **3** (2.5 mg, 2.0 μmol), linker **2** (1.5 equiv), CuI/TBTA (0.4/0.8 μmol), phenylalanine methyl ester hydrochloride (**5a**, 1.5 equiv, neutralized with Et₃N before the reaction), DMF/H₂O (0.25/0.25 mL), rt, 3 h.

3. HPLC METHODS USED

The following conditions were used for HPLC measurements:

Column A: Kromasil Eternity-5-C18, 250 mm × 4.6 mm; pressure – 15 MPa; flow rate – 1 mL/min; room temperature; detection – UV/vis at wavelengths (λ) of 254, 361, and 590 nm.

Column B: KNAUER, E II 100-10 C18, 250 mm × 20 mm; pressure – 10 MPa; flow rate 10 mL/min; room temperature; detection – UV/vis at wavelengths (λ) of 254 and 361 nm.

HPLC method 1:

Time [min]	H ₂ O + 0.2% TFA [%]	MeCN [%]
Initial	90	10
15	30	70

HPLC method 2:

Time [min]	H ₂ O + 0.2% TFA [%]	MeCN [%]
Initial	90	10
30	30	70
40	30	70

HPLC method 3:

Time [min]	H ₂ O + 0.2% TFA [%]	MeCN [%]
Initial	90	10
15	30	70
20	30	70
30	10	90

HPLC method 4:

Time [min]	Buffer pH = 7.5 [%]	MeCN [%]
Initial	90	10
10	60	40
18	60	40
25	20	80
30	20	80

The HPLC-MS method used for analyses of compounds after photo-release:

- Synapt G2-S coupled with the liquid chromatograph ACQUITY UPLC I-Class Systems, Waters
- Source: ESI
- HPLC conditions:

Time [min]	Flow [mL/min]	0.1 M HCO ₂ H [%]	MeCN [%]
Initial	0.3	95	5
2.00	0.3	95	5
10.00	0.3	0	100
12.00	0.3	0	100
12.10	0.3	95	5
15.00	0.3	95	5

4. PREPARATION OF STOCK SOLUTIONS: CU-TBTA, ET₃N/ACOH BUFFERS, AND ASCORBIC ACID

10 mM CuSO₄-TBTA complex in DMSO/water (v/v 11:9): Copper(II) sulfate pentahydrate (50 mg, 0.20 mmol) was dissolved in water (10 mL). Tris(benzyltriazolylmethyl)amine (TBTA, 116 mg, 0.22 mmol) was dissolved in DMSO (11 mL). The two solutions were then mixed and stored.

2 M Triethylammonium acetate buffer, pH 7.0: Triethylamine (2.80 mL, 20 mmol) and acetic acid (1.10 mL, 20 mmol) were mixed. Water was added to 10 mL volume, and pH was adjusted to 7.0 with diluted solutions of either triethylamine or acetic acid.

10 mM Ascorbic acid: Ascorbic acid (18 mg, 0.1 mmol) was dissolved in water (10 mL) and the mixture was degassed by bubbling argon and sonication for 15 minutes.

0.1 M Triethylammonium acetate buffer, pH 7.5: Glacial acetic acid (5.6 mL, 97 mmol) and trimethylamine (13.9 mL, 100 mmol) were dissolved in water (950 mL). pH was adjusted to 7.5 with diluted solutions of either triethylamine or acetic acid.

5. EXPERIMENTAL PROCEDURES:

5.1. For the synthesis of B₁₂-conjugate 6a (via intermediate 4)

Phenylalanine methyl ester hydrochloride (**5a**, 5.8 mg, 27 μ mol) was dissolved in DMF (1 mL) and neutralized with Et₃N (6 μ L, 43 μ mol), the resulting mixture was stirred at room temperature for 30 min. In a separate vial, CuI (1.0 mg, 5 μ mol) and TBTA (5.5 mg, 10 μ mol) were dissolved in DMF (1 mL) and stirred at room temperature for 20 min.

B₁₂N₃ (**3**, 25 mg, 18 μ mol) was dissolved in H₂O (2.5 mL), and then a solution of photocleavable linker **2** (10.7 mg, 27 μ mol) in DMF (1.5 mL) was added. After 20 min stirring, 0.85 mL of the CuI-TBTA solution was added and followed by neutralized phenylalanine methyl ester hydrochloride (**5a**). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hours. MeOH (5 mL) was added to the reaction mixture, then it was poured into Et₂O (100 mL), and the resulting precipitate was filtered through cotton wool. It was firstly washed with Et₂O (2 x 20 mL), AcOEt (2 x 20 mL), and then dissolved in MeOH and concentrated *in vacuo*. The resulting solid was dissolved in H₂O (5 mL) and purified using preparative reverse phase-HPLC, (column B, method 2) giving product **6a**, as a red powder. Yield: 25 mg, 76% (stereoisomer I – 13 mg, 40% and stereoisomer II – 12.0 mg, 36%).

B₁₂-conjugate 6a, stereoisomer I:

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 8.54 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.34 – 7.22 (m, 2H), 7.17 – 7.09 (m, 4H), 7.03 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.20 (dd, 1H, J = 12.8, 6.3 Hz), 6.05 (s, 1H), 5.96 (d, 1H, J = 2.9 Hz), 5.28 (s, 2H), 5.12 (dd, 2H, J = 14.7, 2.9 Hz), 5.00 – 4.92 (m, 3H), 4.63 (s, 4H), 4.60 – 4.32 (m, 5H), 4.17 – 4.06 (m, 2H), 3.97 (d, 1H, J = 8.9 Hz), 3.77 (s, 2H), 3.73 – 3.60 (m, 3H), 3.69 (s, 2H), 3.26 (d, 2H, J = 10.3 Hz), 3.12 (dd, 2H, J = 14.0, 4.9 Hz), 2.86 (dd, 3H, J = 14.2, 9.7 Hz), 2.72 – 2.30 (m, 7H), 2.61 (s, 3H), 2.58 (s, 3H), 2.27 (s, 2H), 2.24 (s, 2H), 2.22 – 1.65 (m, 10H), 1.88 (s, 3H), 1.56 (d, 2H, J = 6.4 Hz), 1.47 (s, 3H), 1.37 (s, 4H), 1.29 (d, 3H, J = 6.3 Hz), 1.26 – 1.22 (m, 1H), 1.19 (s, 2H), 1.16 – 1.07 (m, 2H), 0.44 (s, 3H).

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ 180.1, 178.7, 176.1, 175.9, 175.9, 175.1, 174.1, 173.9, 173.2, 172.8, 172.4, 165.7, 165.4, 155.9, 154.5, 146.4, 139.3, 136.8, 136.7, 134.5, 134.3, 132.5, 129.9, 128.6, 128.0, 126.4, 110.2, 108.1, 107.3, 103.8, 85.0, 68.6, 58.9, 56.2, 55.4, 55.1, 53.9, 51.3, 51.2, 47.0, 42.48, 42.47, 41.62, 41.61, 41.60, 38.7, 37.0, 34.8, 33.8, 32.0, 31.5, 31.4, 30.9, 30.9, 28.03, 28.02, 26.0, 25.9, 20.9, 19.5, 19.0, 18.94, 18.92, 18.89, 18.85, 18.5, 16.1, 15.7, 14.9, 14.8.

UV/vis λ_{\max} (H₂O)/nm 281 (ϵ /dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ 10 447), 308 (13 375), 361 (34 671), 519 (8 381), and 550 (9 586).

HRMS (ESI) m/z calcd for C₈₆H₁₁₁N₁₉O₂₁NaPCo [M + Na]⁺: 1858.7164, found 1858.7169.

t_R (RP-HPLC, column A, method 1) = 13.23 min.

B₁₂-conjugate 6a, stereoisomer II:

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 8.52 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.28 (m, 2H), 7.24 – 7.16 (m, 4H), 7.15 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.19 (dd, 1H, *J* = 12.8, 6.4 Hz), 6.06 (s, 1H), 5.96 (d, 1H, *J* = 2.7 Hz), 5.27 (s, 2H), 5.11 (dd, 2H, *J* = 14.5, 3.4 Hz), 4.98 – 4.92 (m, 3H), 4.63 (s, 4H), 4.59 – 4.30 (m, 5H), 4.13 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz), 4.10 – 4.07 (m, 1H), 3.97 (s, 2H), 3.82 – 3.62 (m, 4H), 3.61 (s, 2H), 3.26 (d, 1H, *J* = 10.7 Hz), 3.13 (dd, 2H, *J* = 13.8, 5.2 Hz), 2.88 (m, 4H), 2.70 – 2.31 (m, 7H), 2.60 (s, 3H), 2.58 (s, 3H), 2.27 (s, 2H), 2.24 (s, 2H), 2.21 – 1.68 (m, 10H), 1.89 (s, 3H), 1.53 (d, 2H, *J* = 6.4 Hz), 1.47 (s, 3H), 1.37 (s, 4H), 1.28 (d, 3H, *J* = 6.3 Hz), 1.25 (dd, 1H, *J* = 10.5, 4.8 Hz), 1.19 (s, 2H), 1.16 – 1.07 (m, 2H), 0.43 (s, 3H).

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ 180.1, 178.7, 176.1, 175.91, 175.86, 175.1, 174.1, 173.9, 173.2, 172.8, 172.4, 165.7, 165.4, 156.1, 154.6, 146.5, 141.8, 139.1, 136.9, 136.7, 134.8, 134.3, 132.5, 129.9, 128.7, 128.1, 126.8, 126.4, 116.4, 111.1, 110.3, 108.1, 107.3, 103.8, 94.3, 86.4, 85.0, 79.5, 74.9, 73.6, 72.3, 68.9, 62.3, 58.9, 56.2, 55.5, 53.9, 51.3, 51.2, 48.0, 48.0, 47.9, 47.0, 42.5, 41.6, 38.7, 36.9, 34.8, 33.9, 32.0, 31.5, 31.4, 30.9, 28.0, 26.0, 25.9, 20.9, 19.5, 18.91, 18.85, 18.5, 16.1, 15.7, 14.9, 14.8.

UV/vis λ_{max} (H₂O)/nm 291 (ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ 10 370), 309 (10 721), 361 (25 799), 516 (6 462), and 549 (7 314).

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₈₆H₁₁₁N₁₉O₂₁NaPCo [M + Na]⁺: 1858.7159, found 1858.7169.

t_R (RP-HPLC, column A, method 1) = 13.58 min.

B₁₂-photocleavable linker conjugate 4:

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₈₀H₁₀₂N₁₉O₂₂PCo [M - H]⁻: 1770.6467, found 1770.6516.

t_R (RP-HPLC, column A, method 1) = 11.75 min. Used without purification, formed *in situ*.

B₁₂-photocleavable linker conjugate 4 (after hydrolysis):

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 8.49 (2 x s, 2 x 0.5H), 7.73 (2 x s, 2 x 0.5H), 7.42 (2 x s, 2 x 0.5H), 7.18 (2 x s, 2 x 0.5H), 7.15 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.06 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 5.94 (2 x d, 2 x 0.5H, *J* = 3.0 Hz), 5.44 (2 x q, 2 x 0.5H, *J* = 2.5 Hz), 5.28 (m, 2H), 5.11 (2 x d, 2 x 0.5H, *J* = 3.1 Hz), 4.95 – 4.85 (m, 3H), 4.59 – 4.32 (m, 5H), 4.13 (d, 1H, *J* = 11.4 Hz), 4.11 – 4.05 (m, 1H), 3.95 (d, 3H, *J* = 7.7 Hz), 3.72 – 3.66 (m, 1H), 3.63 (dd, 1H, *J* = 11.2, 4.7 Hz), 3.26 (d, 1H, *J* = 10.5 Hz), 2.86 (m, 2H), 2.71 – 2.31 (m, 6H), 2.60 (s, 4H), 2.58 (s, 4H), 2.28 (s, 3H), 2.25 (d, 3H, *J* = 3.0 Hz), 2.22 – 1.68 (m, 6H), 1.89 (s, 4H), 1.47 (dd, 6H, *J* = 6.3, 3.8 Hz), 1.37 (d, 6H, *J* = 2.3 Hz), 1.28 (dd, 5H, *J* = 6.3, 2.7 Hz), 1.20 (s, 3H), 1.15 (d, 1H, *J* = 6.2 Hz), 1.14 – 1.05 (m, 1H), 0.44 (s, 3H).

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ 180.2, 178.7, 176.2, 176.1, 175.90, 175.86, 174.14, 174.10, 173.9, 173.2, 172.8, 165.8, 165.5, 154.7, 154.5, 146.1, 145.8, 142.5, 142.4, 141.8, 139.3, 139.2, 138.8, 138.5, 136.7,

134.4, 134.3, 132.6, 129.90, 129.88, 126.8, 126.7, 116.4, 111.2, 111.1, 111.0, 110.5, 109.1, 108.9, 107.4, 103.8, 94.3, 86.4, 85.0, 79.52, 79.47, 74.9, 73.6, 73.4, 72.3, 72.2, 69.0, 64.84, 64.78, 62.44, 62.41, 58.92, 58.91, 56.2, 55.5, 55.3, 54.0, 51.2, 42.5, 41.6, 38.7, 34.8, 33.9, 32.0, 31.4, 30.9, 28.1, 28.0, 26.0, 25.9, 23.8, 23.7, 23.6, 19.5, 19.0, 18.9, 18.8, 18.5, 16.1, 15.7, 14.9, 14.7.

UV/vis λ_{\max} (H₂O)/nm 293 ($\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 14 269), 306 (14 038), 361 (30 709), 515 (7 758), and 548 (8 589).

HRMS (ESI) m/z calcd for C₇₅H₁₀₀N₁₈O₁₈Na₂PCo [M + 2Na]²⁺: 838.3167, found 838.3159.

t_R (RP-HPLC, column A, method 1) = 9.77 min.

5.2. For the synthesis of B₁₂-conjugate 6b

CuI (1.0 mg, 5 μmol) and TBTA (5.5 mg, 10 μmol) were dissolved in DMF (1 mL) and stirred at room temperature for 20 minutes.

B₁₂N₃ (**3**, 25 mg, 18 μmol) was dissolved in H₂O (2.5 mL), and then a solution of photocleavable linker **2** (10.7 mg, 27 μmol) in DMF (2.5 mL) was added. After 20 min stirring, 0.85 mL of the CuI-TBTA solution was added and followed by Ala-Ala-Phe-pNA (**5b**, 12.0 mg, 27 μmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hours. MeOH (5 mL) was added to the reaction mixture, then it was poured into Et₂O (100 mL), and the resulting precipitate was filtered through cotton wool. It was firstly washed with Et₂O (2 x 20 mL), AcOEt (2 x 20 mL), and then dissolved in MeOH and concentrated *in vacuo*. The resulting solid was dissolved in water, loaded onto an RP column, and eluted gradually with a mixture of MeCN/H₂O (5 – 25% v/v) giving product **6b** as a mixture of two diastereoisomers, as a red powder. Yield: 28 mg, 75%.

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 8.50 (d, 1H, J = 3.5 Hz), 8.15 (2 x s, 2 x 0.5H), 8.10 (2 x s, 2 x 0.5H), 7.82 (2 x s, 2 x 0.5H), 7.78 (2 x s, 2 x 0.5H), 7.73 (d, 1H, J = 1.8 Hz), 7.29 – 7.08 (m, 7H), 6.57 (s, 1H), 6.32 (2 x q, 2 x 0.5H, J = 6.5 Hz), 6.05 (2 x s, 2 x 0.5H), 5.93 (2 x s, 2 x 0.5H), 5.30 – 5.06 (m, 4H), 4.99 – 4.89 (m, 3H), 4.71 – 4.33 (m, 4H), 4.57 (s, 4H), 4.23 – 3.96 (m, 4H), 3.91 (d, 3H, J = 22.9 Hz), 3.69 (dd, 1H, J = 13.3, 2.8 Hz), 3.63 (dd, 1H, J = 10.4, 5.1 Hz), 3.29 – 3.15 (m, 2H), 3.00 (m, 1H), 2.85 (m, 2H), 2.74 – 2.32 (m, 7H), 2.60 (s, 4H), 2.58 (s, 4H), 2.27 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.19 – 1.67 (m, 7H), 1.88 (s, 4H), 1.57 (m, 3H), 1.46 (d, 3H, J = 2.9 Hz), 1.37 (s, 6H), 1.35 – 1.04 (m, 9H), 1.20 – 1.18 (m, 3H), 0.44 (s, 3H).

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ 180.2, 178.7, 176.2, 175.9, 175.9, 175.2, 174.6, 174.1, 173.9, 173.2, 172.8, 165.7, 165.5, 156.3, 156.2, 154.7, 154.5, 146.5, 146.4, 144.2, 144.1, 143.3, 143.2, 139.2, 139.1, 136.7, 134.3, 134.24, 134.21, 132.54, 132.51, 129.9, 129.8, 128.9, 128.8, 128.12, 128.07, 126.5, 126.4, 124.3, 124.2, 119.2, 119.1, 116.4, 111.1, 111.0, 110.6, 110.2, 108.6, 108.2, 107.3, 103.8, 94.3, 86.4, 85.0, 79.5, 74.9, 72.3, 68.9, 68.82, 68.79, 62.3, 58.9, 56.2, 55.6, 55.6, 55.5, 55.4, 54.0, 51.2, 48.0, 47.0,

42.5, 41.6, 37.1, 36.9, 34.8, 33.9, 31.5, 30.9, 29.3, 28.0, 26.0, 21.2, 19.5, 19.03, 18.97, 18.9, 18.5, 16.6, 16.4, 16.1, 15.9, 15.74, 15.70, 15.0, 14.8.

UV/vis λ_{max} (H₂O)/nm 321 ($\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 21 421), 360 (31 158), 522 (6 727), and 549 (7 436).

HRMS (ESI) m/z calcd for C₉₇H₁₂₃N₂₃O₂₄Na₂PCo [M + 2Na]²⁺: 1064.8990, found 1064.8983.

t_{R} (RP-HPLC, column A, method 1) = 14.02 min.

5.3. For the synthesis of B₁₂PEG2NH₂ 7

Vitamin B₁₂ (**1**, 100 mg, 74 μmol) was dissolved in NMP (3 mL), and then 1,1'-carbonyl-di-(1,2,4-triazole) (CDT, 54 mg, 330 μmol) was added in three equal portions at 1 h intervals (40 °C, Ar atmosphere). After the addition of the third portion, the reaction mixture was stirred for an additional hour. A B₁₂-CDT adduct formed in 92 % (determined by HPLC). Without work-up, it was treated with Et₃N (21 μL , 147 μmol) and 2,2'-(ethylenedioxy)bis(ethylamine) (22 μL , 147 μmol). The resulting mixture was stirred at 40 °C for 1.5 h and then MeOH (3 mL) was added. The resulting mixture was poured into Et₂O (100 mL), and the precipitate formed was filtered through cotton wool. It was firstly washed with Et₂O (2 x 20 mL), AcOEt (2 x 20 mL), and then dissolved in MeOH and concentrated *in vacuo*. The resulting solid was dissolved in H₂O (5 mL) and purified using preparative reverse phase-HPLC (column B, method 2) giving product **7**, as a red powder. Yield: 100 mg, 89%; purity: 90%.

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 7.25 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.23 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz), 6.04 (s, 1H), 4.66 (dd, 1H, $J = 12.2, 2.7$ Hz), 4.53 (dd, 1H, $J = 8.9, 2.1$ Hz), 4.36 (m, 1H), 4.25 – 4.12 (m, 4H), 3.68 – 3.59 (m, 7H), 3.55 (m, 4H), 3.30 – 3.24 (m, 1H), 2.89 (m, 4H), 2.70 – 2.34 (m, 10H), 2.59 (d, 6H, $J = 1.8$ Hz), 2.38 (d, 2H, $J = 4.8$ Hz), 2.29 (d, 6H, $J = 5.3$ Hz), 2.22 – 1.80 (m, 7H), 1.89 (s, 4H), 1.74 (m, 1H), 1.47 (s, 3H), 1.38 (d, 6H, $J = 5.3$ Hz), 1.30 – 1.27 (m, 1H), 1.25 (d, 4H, $J = 6.4$ Hz), 1.19 (s, 3H), 1.16 – 1.07 (m, 1H), 0.47 (s, 3H).

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ 180.2, 178.7, 176.1, 176.0, 175.9, 175.2, 174.14, 174.10, 173.9, 173.2, 172.7, 165.7, 165.5, 157.3, 141.9, 136.8, 134.3, 132.5, 129.9, 129.3, 116.5, 114.7, 111.0, 107.3, 103.8, 94.2, 86.8, 85.0, 80.0, 79.9, 74.9, 72.1, 72.0, 69.9, 69.9, 69.6, 69.1, 62.9, 58.9, 56.2, 55.5, 53.7, 51.2, 48.0, 47.9, 47.0, 45.2, 42.5, 41.6, 40.4, 40.3, 38.7, 34.8, 33.8, 31.9, 31.6, 31.2, 30.9, 28.1, 26.0, 25.9, 19.5, 19.1, 19.1, 18.9, 18.78, 18.75, 18.5, 16.1, 15.7, 15.0, 14.7.

UV/vis λ_{max} (H₂O)/nm 290 ($\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 8 910), 307 (8 145), 362 (24 665), 522 (7 036), and 550 (7 839).

HRMS (ESI) m/z calcd for C₇₀H₁₀₃N₁₆O₁₇NaPCo [M + H + Na]²⁺: 776.3323, found 776.3322.

t_{R} (RP-HPLC, column A, method 1) = 8.17 min.

5.4. For the synthesis of B₁₂PEG2NH₂-photocleavable linker conjugate **8**

Compound B₁₂PEG2diamine **7** (25 mg, 16 μmol) was dissolved in NaHCO₃ (0.1 M, pH = 8.2, 2.5 mL), and a solution of photocleavable linker **2** in DMF (9.6 mg, 24 μmol, 1.25 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hour. MeOH (3 mL) was added to the reaction mixture, then the solution was poured into Et₂O (100 mL). The resulting red precipitate was filtered through cotton wool. It was firstly washed with Et₂O (2 x 20 mL), AcOEt (2 x 20 mL), and then dissolved in MeOH and concentrated *in vacuo*. The resulting solid was dissolved in water, loaded onto a RP column, and eluted gradually with a mixture of MeCN/H₂O (5 – 25% v/v of MeCN in H₂O) giving product **8**, as a red powder. Yield: 24 mg, 80%.

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 7.76 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz), 7.23 (s, 1H), 7.21 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz), 7.15 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.27 (m, 1H), 6.23 (m, 1H), 6.04 (s, 1H), 4.66 (d, 1H, *J* = 11.7 Hz), 4.52 (dd, 1H, *J* = 9.1, 2.0 Hz), 4.36 (dt, 1H, *J* = 8.6, 6.2 Hz), 4.26 – 4.11 (m, 4H), 3.96 (d, 3H, *J* = 3.8 Hz), 3.69 – 3.45 (m, 7H), 3.55 (s, 4H), 3.29 – 3.20 (m, 3H), 2.94 – 2.85 (m, 2H), 2.69 – 2.33 (m, 13H), 2.58 (s, 6H), 2.30 – 2.28 (m, 3H), 2.26 (d, 3H, *J* = 2.6 Hz), 2.21 – 1.69 (m, 10H), 1.89 (s, 4H), 1.57 (dd, 3H, *J* = 13.1, 6.4 Hz), 1.46 (s, 3H), 1.38 (d, 6H, *J* = 7.2 Hz), 1.32 – 1.27 (m, 2H), 1.24 (d, 3H, *J* = 6.3 Hz), 1.19 (s, 3H), 1.16 – 1.07 (m, 1H), 0.47 (s, 3H).

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ 180.2, 178.7, 176.1, 176.0, 175.9, 175.2, 174.14, 174.11, 173.9, 173.2, 172.7, 165.7, 165.5, 157.3, 156.5, 154.5, 145.6, 141.9, 139.3, 136.8, 134.9, 134.3, 132.5, 129.9, 116.5, 111.0, 110.39, 110.36, 108.4, 107.3, 103.8, 94.2, 86.8, 85.0, 74.9, 69.9, 69.8, 69.6, 69.5, 69.1, 68.4, 62.9, 58.9, 56.5, 56.2, 55.63, 55.61, 55.5, 53.6, 51.1, 48.0, 48.0, 47.9, 47.0, 45.2, 42.5, 41.6, 40.3, 40.1, 38.7, 34.8, 33.8, 31.9, 31.6, 31.2, 31.0, 30.9, 29.4, 28.1, 26.00, 25.95, 21.0, 19.5, 19.13, 19.07, 18.9, 18.8, 18.7, 18.5, 16.1, 15.7, 15.0, 14.7.

UV/vis λ_{max} (H₂O)/nm 292 (ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ 13 389), 307 (13 985), 360 (30 734), 521 (8 835), and 549 (9 486).

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₈₃H₁₁₃N₁₇O₂₃Na₂PCo [M + 2Na]²⁺: 925.8524, found 925.8525.

t_R (RP-HPLC, column A, method 1) = 12.18 min.

5.5. For the synthesis of B₁₂-conjugate **10a**

CuI (1.0 mg, 5 μmol) and TBTA (5.5 mg, 10 μmol) were dissolved in DMF (1 mL) and stirred at room temperature for 20 minutes.

Compound **8** (25 mg, 14 μmol) and biotin derivative **9a** (7 mg, 21 μmol) were dissolved in H₂O (2 mL). After 20 min stirring, 0.85 mL of the CuI-TBTA solution was added, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 3 hours. MeOH (3 mL) was added to the reaction mixture, then the solution

was poured into Et₂O (100 mL). The resulting precipitate was filtered through cotton wool. It was firstly washed with Et₂O (2 x 20 mL), AcOEt (2 x 20 mL), and then dissolved in MeOH and concentrated *in vacuo*. The resulting solid was dissolved in water, loaded onto a RP column, and eluted gradually with a mixture of MeCN/H₂O (5 – 30% v/v MeCN in H₂O) giving product **10a**, as a red powder. Yield: 21 mg, 70%.

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 8.14 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz), 7.81 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz), 7.23 (s, 1H), 7.20 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz), 7.15 (s, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.31 – 6.25 (m, 1H), 6.23 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz), 6.04 (s, 1H), 5.26 (d, 2H, *J* = 4.7 Hz), 4.65 (d, 1H, *J* = 11.7 Hz), 4.61 (t, 2H, *J* = 5.0 Hz), 4.52 (d, 1H, *J* = 8.9 Hz), 4.48 – 4.44 (m, 1H), 4.39 – 4.32 (m, 1H), 4.26 (m, 1H), 4.19 (d, 3H, *J* = 27.1 Hz), 4.13 (d, 1H, *J* = 11.4 Hz), 3.94 (d, 3H, *J* = 3.6 Hz), 3.86 (t, 2H, *J* = 5.0 Hz), 3.68 – 3.43 (m, 6H), 3.56 (s, 4H), 3.50 (q, 4H, *J* = 5.1 Hz), 3.29 – 3.09 (m, 5H), 2.95 – 2.83 (m, 3H), 2.71 – 2.33 (m, 12H), 2.58 (s, 6H), 2.30 – 2.28 (m, 3H), 2.27 – 2.24 (m, 3H), 2.18 (m, 3H), 2.11 – 1.82 (m, 6H), 1.89 (s, 4H), 1.78 – 1.49 (m, 5H), 1.57 (dd, 4H, *J* = 11.4, 6.4 Hz), 1.45 (s, 3H), 1.38 (s, 4H), 1.36 (d, 4H, *J* = 4.4 Hz), 1.35 – 1.26 (m, 2H), 1.24 (d, 3H, *J* = 6.3 Hz), 1.18 (s, 3H), 1.16 – 1.08 (m, 1H), 0.47 (s, 3H).

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ 180.8, 179.4, 176.8, 176.7, 176.6, 175.8, 175.37, 175.36, 174.8, 174.5, 173.8, 173.3, 166.4, 166.1, 165.3, 157.9, 157.1, 155.1, 147.1, 143.2, 142.6, 140.1, 137.5, 135.3, 134.9, 133.2, 130.6, 125.9, 125.8, 117.1, 111.7, 110.74, 110.68, 109.0, 108.0, 104.5, 94.9, 87.5, 85.7, 75.6, 72.6, 70.5, 70.4, 70.21, 70.15, 69.8, 69.3, 69.0, 63.6, 62.9, 62.6, 60.8, 59.5, 56.9, 56.3, 56.23, 56.17, 54.3, 51.81, 51.80, 50.7, 48.7, 48.6, 48.5, 48.3, 47.6, 43.2, 42.3, 41.0, 40.8, 40.3, 39.4, 39.3, 36.0, 35.4, 34.4, 32.5, 32.2, 31.8, 31.6, 31.6, 29.97, 28.95, 28.72, 28.70, 26.7, 26.6, 26.1, 21.72, 21.70, 20.1, 19.8, 19.7, 19.6, 19.43, 19.40, 19.2, 16.7, 16.4, 15.6, 15.4.

UV/vis λ_{max} (H₂O)/nm 292 (ε/dm³ mol⁻¹ cm⁻¹ 22 714), 361 (36 060), 522 (10 101), and 549 (10 938).

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₉₇H₁₃₇N₂₃O₂₆Na₂PSCo [M + 2Na]²⁺: 1103.9331, found 1103.9340.

t_R (RP-HPLC, column A, method 1) = 11.70 min.

5.6. For the synthesis of B₁₂-conjugate **10b**

A stock solution of RNA: 2'OMeRNA oligonucleotide **9b** (5'-N₃-deoxythymidine- UUU CUA GUC UCA UA-3', 8 mg, 1.6 μmol) was dissolved in H₂O (500 μL). The exact concentration of the solution was determined by NanoDrop UV-Vis Spectroscopy to be 17801 ng/μL.

In a 1.5 mL Eppendorf tube equipped with a stirring bar, compound **8** (0.9 mg, 0.5 μmol) was dissolved in a mixture of DMSO/H₂O (200 μL/100 μL) and the triethylammonium acetate buffer stock solution (2 M, 20 μL). Then modified RNA **9b** (70 μL of solution RNA, 1.1 mg, 0.2 μmol), the CuSO₄-TBTA stock solution (10 mM in DMSO/water: v/v 11:9, 6 μL), and the L-ascorbic acid stock solution (10 mM, 6 μL)

were added. The reaction mixture was stirred at 45 °C, and after 1.5 h and 3 h addition portions of ascorbic acid stock solution (10 mM, 2 x 6 µL) were added. After 16 h, the HPLC analysis indicated 99 % conversion of modified RNA **9b**. The reaction mixture was diluted with H₂O (3 mL) and purified using preparative reverse phase-HPLC (column A, method 4). The eluate was freeze-dried to afford product **10b** as a pink solid.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₃₇H₃₁₄N₆₅O₁₂₉P₁₅Co [M - H]⁻: 6657.5500, found 6662.0005.

t_R (RP-HPLC, column A, method 4) = 10.54 min.

5.7. For the synthesis of compound **12**

CuI (1.0 mg, 5 µmol) and TBTA (5.5 mg, 10 µmol) were dissolved in DMF (1 mL) and stirred at room temperature for 20 minutes.

Compound **8** (25 mg, 14 µmol) and 1,11-diazido-3,6,9-trioxaundecane **11** (29 µL, 138 µmol) were dissolved in H₂O (2.5 mL) and MeOH (0.5 mL). After 20 min stirring, 0.85 mL of the CuI-TBTA solution was added, and the reaction mixture was stirred for 4 hours at room temperature. MeOH (3 mL) was added to the reaction mixture, then it was poured into Et₂O (100 mL), and the resulting precipitate was filtered through cotton wool. It was washed with Et₂O (2 x 20 mL), AcOEt (2 x 20 mL), dissolved in MeOH, and concentrated *in vacuo*. The resulting solid was dissolved in water, loaded onto a RP column, and eluted gradually with a mixture of MeCN/H₂O (5 – 30% v/v MeCN in H₂O) giving product **12**, as a red powder. Yield: 24 mg, 83%.

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 8.18 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.26 (q, 1H, *J* = 6.5 Hz), 6.24 (d, 1H, *J* = 3.1 Hz), 6.04 (s, 1H), 5.26 (d, 2H, *J* = 5.5 Hz), 4.84 – 4.79 (m, 1H), 4.68 – 4.62 (m, 3H), 4.60 (t, 2H, *J* = 4.9 Hz), 4.52 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz), 4.35 (m, 1H), 4.24 – 4.11 (m, 4H), 3.94 (d, 3H, *J* = 2.9 Hz), 3.89 (t, 2H, *J* = 5.0 Hz), 3.68 – 3.57 (m, 11H), 3.56 (s, 4H), 3.49 (dd, 4H, *J* = 11.9, 6.1 Hz), 3.29 – 3.18 (m, 4H), 2.89 (m, 2H), 2.68 – 2.33 (m, 12H), 2.58 (s, 6H), 2.29 (d, 3H, *J* = 2.2 Hz), 2.26 (d, 3H, *J* = 3.1 Hz), 2.21 – 1.79 (m, 8H), 1.89 (s, 3H), 1.76 – 1.70 (m, 1H), 1.57 (dd, 3H, *J* = 12.9, 6.4 Hz), 1.46 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.37 (s, 3H), 1.31 – 1.26 (m, 1H), 1.24 (d, 4H, *J* = 6.3 Hz), 1.18 (s, 3H), 1.15 – 1.07 (m, 1H), 0.47 (s, 3H).

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ 180.2, 178.7, 176.1, 176.0, 175.9, 175.2, 174.14, 174.08, 173.9, 173.2, 172.6, 165.7, 165.5, 157.2, 156.4, 154.5, 146.4, 141.9, 139.4, 136.8, 134.6, 134.3, 132.5, 129.9, 125.3, 116.5, 111.0, 110.00, 109.97, 108.3, 107.3, 103.8, 94.2, 86.8, 85.0, 80.0, 79.9, 74.9, 73.8, 72.1, 72.0, 70.12, 70.08, 70.0, 69.9, 69.8, 69.7, 69.6, 69.5, 69.1, 68.9, 68.3, 62.9, 62.2, 58.9, 56.2, 55.54, 55.46, 53.6, 51.2, 50.3, 50.1, 48.0, 48.0, 47.0, 45.1, 42.5, 41.6, 40.3, 40.1, 38.7, 34.8, 33.7, 31.8, 31.5, 31.2, 31.0, 30.9, 28.1, 26.0, 25.9, 21.1, 19.5, 19.14, 19.06, 18.9, 18.8, 18.5, 16.1, 15.7, 15.0, 14.8.

UV/vis λ_{\max} (H₂O)/nm 291 ($\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 12 837), 307 (13 102), 361 (31 084), 520 (7 532), and 549 (8 487).

HRMS (ESI) m/z calcd for C₉₁H₁₂₉N₂₃O₂₆Na₂PCo [M + 2Na]²⁺: 1047.9250, found 1047.9167.

t_R (RP-HPLC, column A, method 1) = 12.68 min.

5.8. For the synthesis of B₁₂-conjugate 14

CuI (1.0 mg, 5 μmol) and TBTA (5.5 mg, 10 μmol) were dissolved in DMF (1 mL) and stirred at room temperature for 20 minutes.

Compound **12** (3.6 mg, 1.8 μmol) was dissolved in H₂O (300 μL), and then ATTO 590 **13** (0.5 mg, 0.8 μmol) dissolved in DMF (200 μL) was added. After 20 min stirring, 300 μL of the CuI-TBTA solution was added, and the reaction mixture was stirred for 16 hours at room temperature. After 16 h the HPLC analysis indicated 99 % conversion. MeOH (1 mL) was added to the reaction mixture, then it was poured into Et₂O (15 mL), and the resulting precipitate was filtered through cotton wool. It was washed with Et₂O (2 x 5 mL), AcOEt (2 x 5 mL), dissolved in MeOH, and concentrated *in vacuo*. The resulting solid was dissolved in water, loaded onto a RP column, and eluted gradually with a mixture of MeCN/H₂O (5 – 30% v/v MeCN in H₂O) giving product **14**, as a navy blue/purple powder (navy blue when is dissolved in H₂O, purple – in MeOH). Yield: 3.9 mg, 82%.

UV/vis λ_{\max} (H₂O)/nm 288 ($\epsilon/\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 20 456), 361 (24 119), 405 (9 022), 560 (26 263), and 601 (60 476).

HRMS (ESI) m/z calcd for C₁₃₁H₁₇₂N₂₆O₃₀PKCo [M + H + K]³⁺: 906.0494, found 906.0474.

t_R (RP-HPLC, column A, method 3) = 14.53 min.

6. PHOTOCONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE MOLECULES

6.1. Photoreaction setup

To perform photorelease experiments, we used the light of three different wavelengths: white, blue, and green. Photorelease reactions were set up in vials of volume 8 ml (outer diameter ~20 mm).

White light: Photorelease reactions were carried out in a homemade photoreactor made of a 400 mL beaker covered on the inside with the LED tape. A cooling fan with an adjustable spin rate was used to maintain the ambient temperature inside the photoreactor.

White LED tape: 8 mm SMD3528 LED strip, 120 LED diodes/m

Power consumption: 9.6 W/m

White light – 6500 K, 30 lm

Blue and green light: Photorelease reactions were carried out in a commercially available LAB-SCALE PHOTOREACTOR, UOSlab (https://en.uoslab.com/download/Photochemical_reactors.pdf). A chiller was used to maintain the ambient temperature inside the photoreactor.

Blue LED: High Power Blue LED with Peak Wavelength of 450 nm

Power consumption: 0 – 40 W/m

https://download.luminus.com/datasheets/Luminus_SST-20-B_Datasheet.pdf

Green LED: High Power Green LED with Peak Wavelength of 530 nm

Power consumption: 0 – 40 W/m

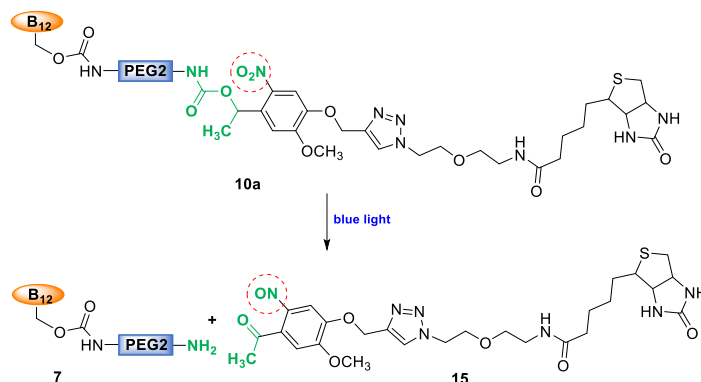
https://download.luminus.com/datasheets/Luminus_SST-10-G_Datasheet.pdf

6.2. Photorelease conversion

The photorelease of cargo from a conjugate was monitored over time by HPLC. In all measurements, 50 μ L aliquots of a solution of a conjugate (biotin conjugate **10a**, Atto conjugate **14**, and bioconjugate **6a** or **6b**) were taken before and at given times of irradiation (see figures below) and analyzed by HPLC. The conversion (for each conjugate) was calculated as a ratio of areas of peaks corresponding to a conjugate at a given time to the one measured before the irradiation.

6.3. Optimization based on the B₁₂-biotin conjugate 10a

We have performed the detailed optimization of the light-induced release for photolabile B₁₂-biotin conjugate **10a** (Scheme 3).



Scheme 3. Photocontrolled release of modified biotin from B₁₂-biotin conjugate 10a.

a) Stability control of conjugates

The stability of the prepared photolabile conjugates was tested under daylight. Firstly, B₁₂-biotin conjugate **10a** (0.1 mg, 0.046 μmol, 46 μM) was dissolved in H₂O (1 mL) and left for 24 h in the daylight. HPLC analysis proved that compound **10a** is stable (Figure 2).

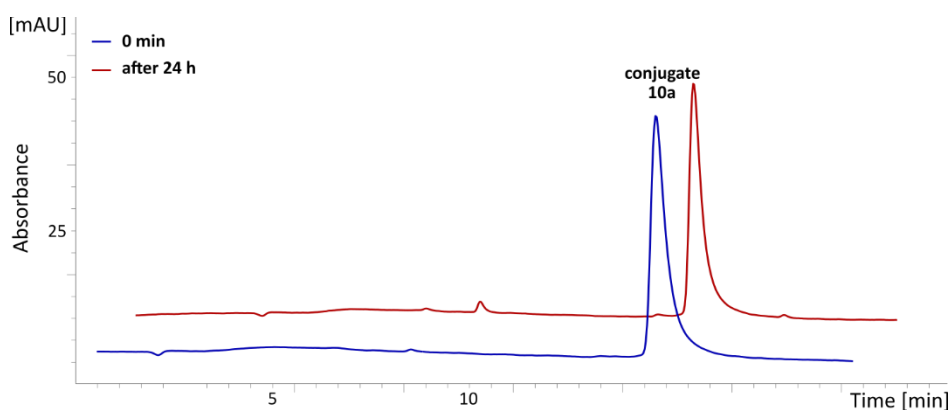


Figure 2. B₁₂-biotin conjugate 10a at time 0 and after 24 h in the daylight.

When a sample was irradiated with focused white light (10 W) for 24 hours or more, photolysis occurred, but the release was slow (Figure 3). After 24, 48, and 72 h of irradiation the conversion of B₁₂-biotin conjugate **10a** are 12, 26, and 35%, respectively.

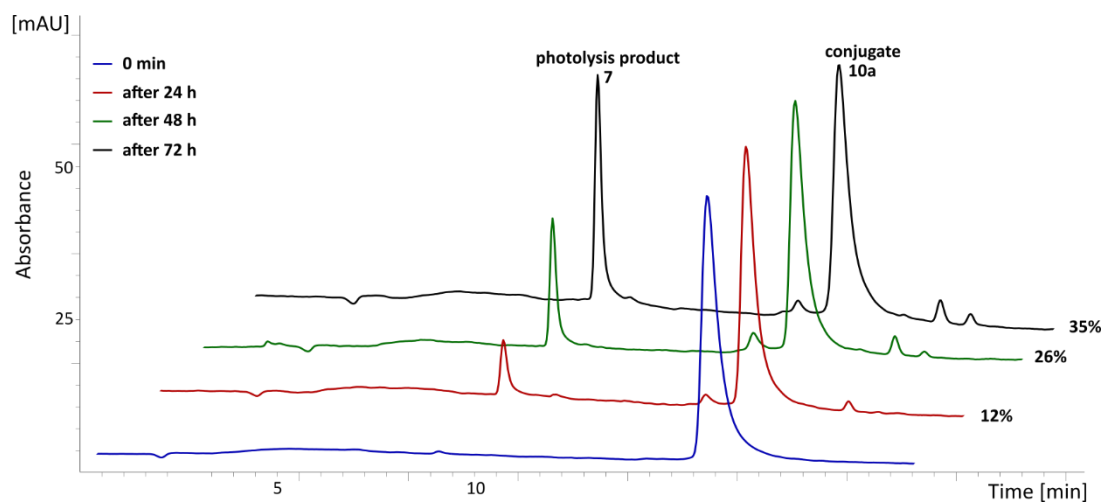


Figure 3. B₁₂-biotin conjugate 10a at time 0 and after 24, 48, and 72 h white light irradiation.

b) Photorelease under blue light irradiation

Using blue light (peak wavelength of 450 nm), we performed full optimization for the release of molecules from B₁₂-biotin **10a** conjugate. Photorelease was tested under blue light irradiation using 10, 20, 40 Wats.

- **Blue light – LEDs 10 W**

Figure 4 shows chromatograms for samples of conjugate **10a** irradiated with 10 W LEDs during 1h. We observed that only after 5 minutes of irradiation with blue light, product **7** is released and the conversion of substrate **10a** is 23%. *This proves that photocleavable of linker **2** can occur under blue light and does not require UV light as reported by Nakanishi² and Wegner.³*

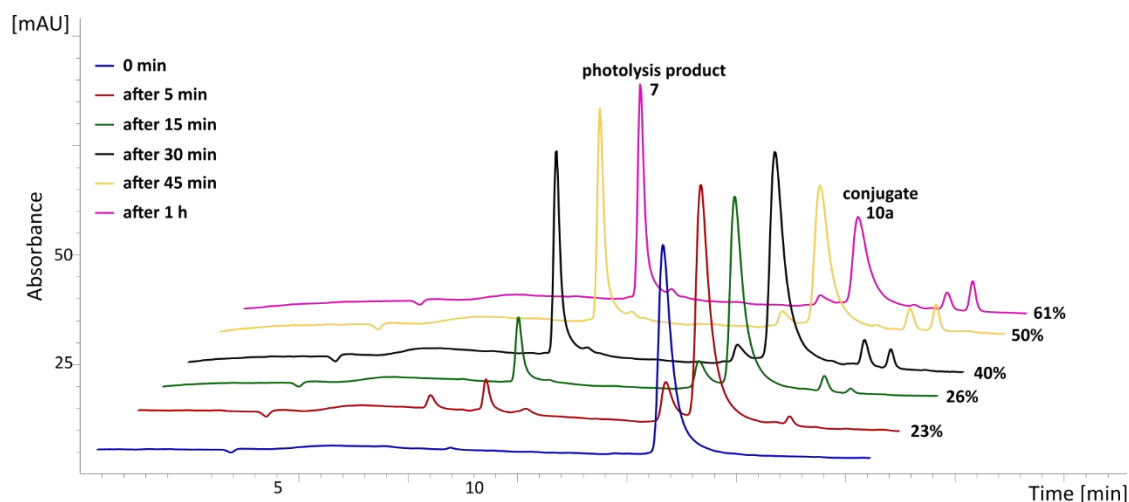


Figure 4. Control during 1 h of B₁₂-biotin conjugate 10a blue light irradiation (10 W).

During the next 2 hours, the process was monitored every half an hour (Figure 5). Conversion after 1.5, 2, and 2.5 h were 74, 84, and 91%, respectively. The photo-release was carried out for 3 h, after which the conversion was complete (97%).

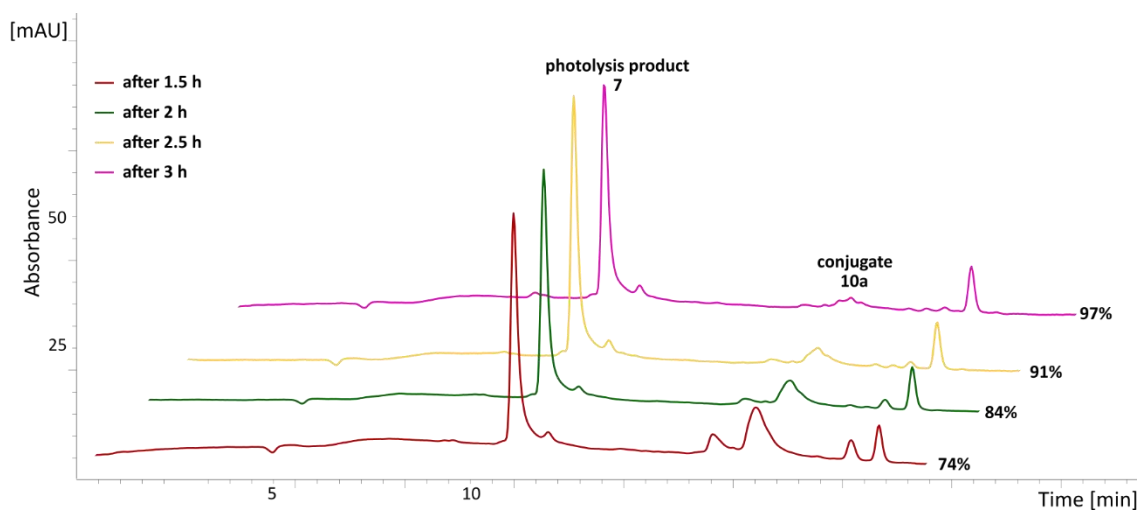


Figure 5. B₁₂-biotin conjugate 10a after 1.5, 2, 2.5, and 3 h blue light irradiation (10 W).

- **Blue light – LEDs 20 W**

An increase in the LED's power to 20 W affected the release rate but selectivity. Full conversion of conjugate 10a was achieved just after 1 h (95%) with practically the same selectivity (Figure 6).

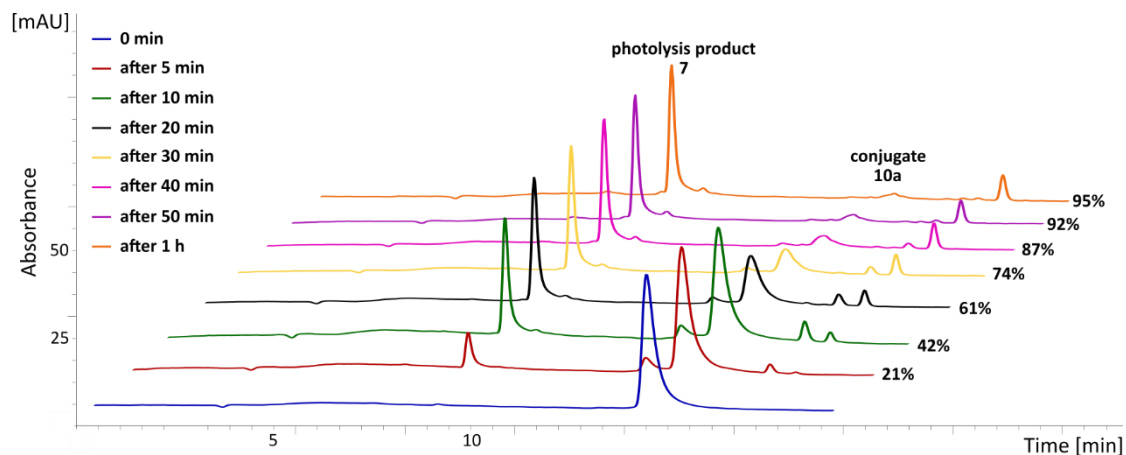


Figure 6. Control during 1 h of B₁₂-biotin conjugate 10a blue light irradiation (20 W).

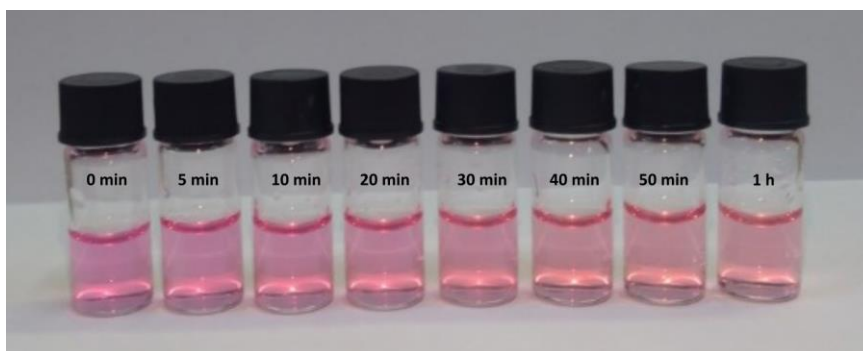


Figure 7. The colour change due to irradiation (blue LED, 20 W) of the sample 10a (46 μM).

- **Blue light – LEDs 40 W**

Under 40 W blue LEDs the release was fast and was controlled every 2.5 minutes (Figure 8). A significant increase in the conversion of conjugate **10a**, which was 32% after 5 minutes (2.5 min – 18%, 7.5 min – 52%, 10 min – 63%) was observed. 50% of the conversion was achieved just after 7 minutes, which indicates a significant acceleration of the release process.

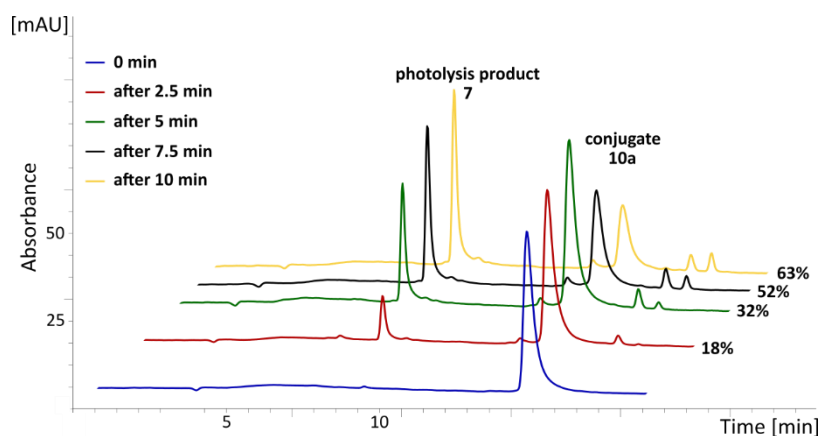


Figure 8. Control during 10 minutes of B₁₂-biotin conjugate **10a** blue light irradiation (40 W).

While the conversion of biotin substrate **10a** was almost full (95%) after 1 h using 20 W, the effect was practically identical (97%) when the sample was irradiated using 40 W for 30 min (15 min – 85%, 20 min – 92%, 25 min – 96%) (Figure 9).

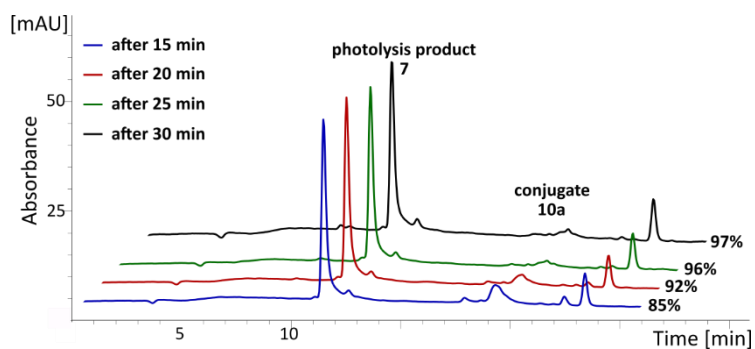


Figure 9. B₁₂-biotin conjugate **10a** after 15, 20, 25 and 30 minutes blue light irradiation (40 W).

Please note that photo-release (using the same photocleavable linker **2**) was performed under blue light irradiation (450 nm) while according to two independent research by Nakanishi² and Wegner³ groups, linker **2** is cleaved under UV light irradiation (365 nm). The regulation of the intensity of light and the time control allowed for the photocleavage of B₁₂-biotin **10a** (conversion 95%) under the most optimal conditions: blue light (peak wavelength of 450 nm), 20 W, 1 hour (Figure 10).

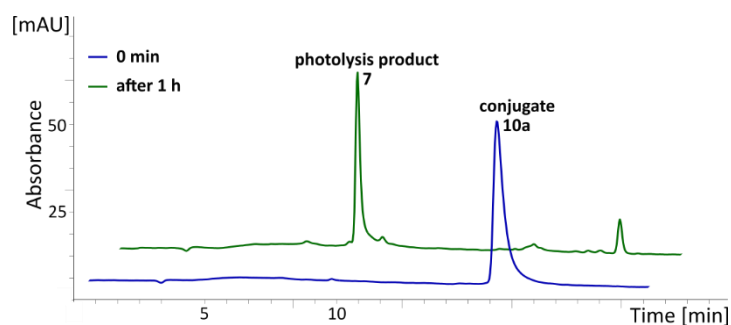


Figure 10. Photocleavage of B₁₂-biotin **10a** under the most optimal conditions: blue light, 20 W, 1 hour.

Analysis of photoreleased products **7** and **15**:

Structures of photolysis products **7** (after spontaneous decarboxylation) and **15** were confirmed by MS HR. The LC-MS analysis displays a signal at $m/z = 765.3403$ corresponding to a double charged ion $[M + 2H]^{2+}$ for the vitamin B₁₂ derivative product **7**. For the biotin derivative product **15**, the LC-MS analysis displays a signal at $m/z = 590.2397$ corresponding to a pseudomolecular ion $[M + H]^+$.

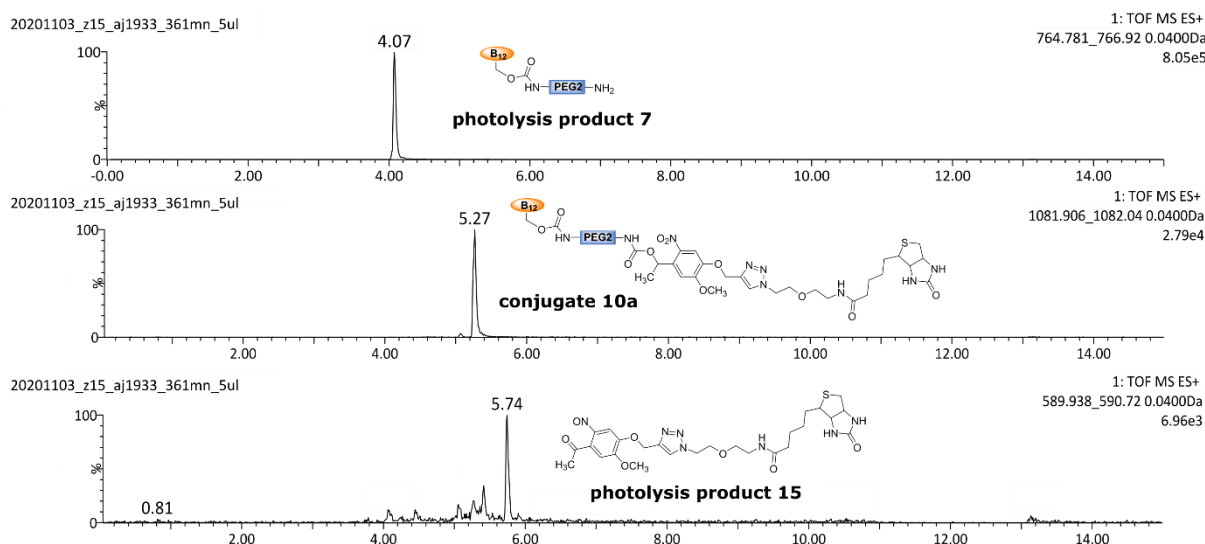


Figure 11. Substrate and products retention times determined by LC-MS.

Table 2. MS HR calculated for photolysis product **7** (retention time = 4.07).

Index	Input m/z	Calc. Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	DBE	Formula	Isotope Match Score
1	765.34030	1530.68240	-1.8012	-1.1767	27.50	C70 H104 N16 O17 P Co	0.000000
2	765.34030	1530.65859	22.0082	14.3781	28.00	C70 H102 N15 O18 P Co	0.000000

Table 3. MS HR calculated for substrate 10a (retention time = 5.27).

Index	Input m/z	Calc. Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	DBE	Formula	Isotope Match Score
1	721.63760	2164.91138	1.4243	0.6579	40.00	C97 H140 N23 O26 P S Co	0.000000
2	721.63760	2164.88757	25.2338	11.6558	40.50	C97 H138 N22 O27 P S Co	0.000000

Index	Input m/z	Calc. Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	DBE	Formula	Isotope Match Score
1	1081.95190	2163.90410	-0.2992	-0.1383	40.50	C97 H139 N23 O26 P S Co	0.000000
2	1081.95190	2163.88029	23.5102	10.8647	41.00	C97 H137 N22 O27 P S Co	0.000000

Table 4. MS HR calculated for photolysis product 15 (retention time = 5.74).

Elements Used:

C: 0-150 H: 0-150 N: 7-7 O: 7-7 S: 0-1

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf %	C	H	N	O	S
590.2397	590.2397	0.0	0.0	12.5	C26 H36 N7 O7 S	249.9	0.000	99.99	26	36	7	7	1
	590.2363	3.4	5.8	17.5	C29 H32 N7 O7	259.6	9.707	0.01	29	32	7	7	

c) Photorelease under green light

We also tested less energetic, green light (peak wavelength of 530 nm). Under irradiation with green light even after 24 hours, little photodecomposition was observed (Figure 12).

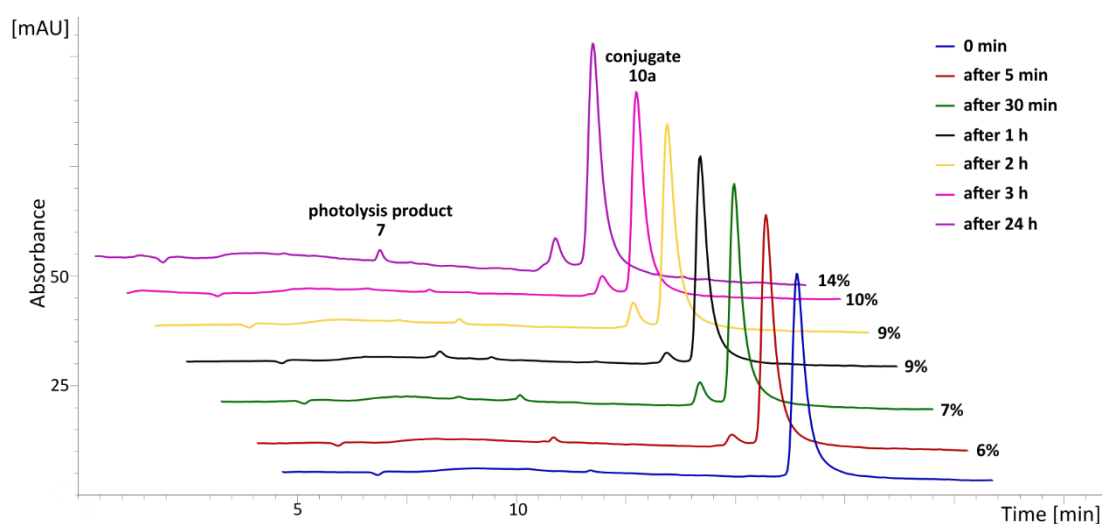
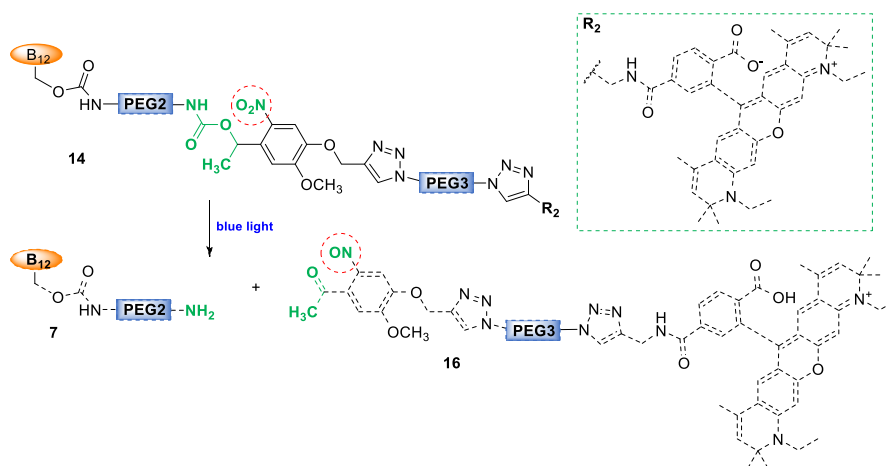


Figure 12. B₁₂-biotin conjugate 10a at time 0 and after 5 min, 30 min, 1 h, 2h, 3 h, and 24 h green light irradiation (40 W).

6.4. Photocontrolled release of cargo from bioconjugates 6a, 6b, and 14

With the optimized procedure in hand, both stereoisomers **6a**, **6b**, and **14** were irradiated with blue light.

Conjugate 14: For conjugate **14**, containing fluorescent dye **13**, the same photo-release pathway as for B₁₂-biotin conjugate **10a** was observed. As a result, photolysis product **7** (which formed after spontaneous decarboxylation) and fluorescent dye **16** with photocleavable linker moiety are formed (Scheme 4). Conversion of the substrate **14** (0.1 mg, 0.037 μmol, 37 μM) was almost full after 1 h – 96% (Figure 13).



Scheme 4. Photocontrolled release of modified fluorescent dye **16** from B₁₂ conjugate **14**.

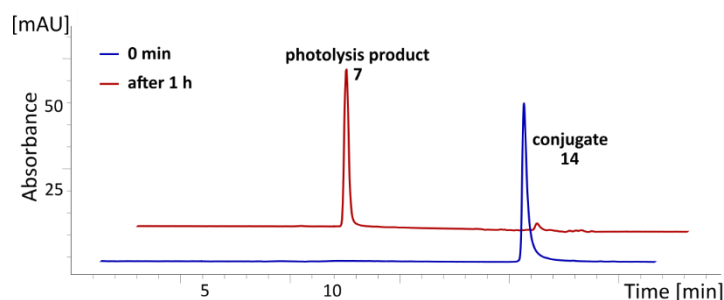


Figure 13. B₁₂-fluorescent dye conjugate **14** at time 0 and after 1 h blue light irradiation (20 W).

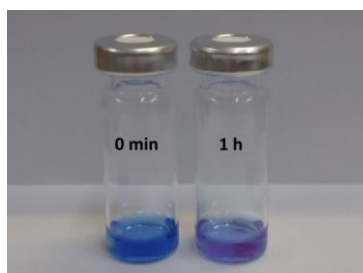


Figure 14. The colour change of the solution of **14** (37 μM) after irradiation (blue LED, 20 W).

Analysis of photoreleased products 7 and 16:

Structures of products **7** (after spontaneous decarboxylation) and **16** were also confirmed by MS HR. The LC-MS analysis displays a signal at $m/z = 765.3414$ corresponding to a double charged ion $[M + 2H]^{2+}$ for the vitamin B₁₂ derivative product **7**. For the fluorescent dye derivative product **16**, the LC-MS analysis displays a signal at $m/z = 1105.5171$ corresponding to a molecular ion $[M]^+$ (ATTO exists as an ion).

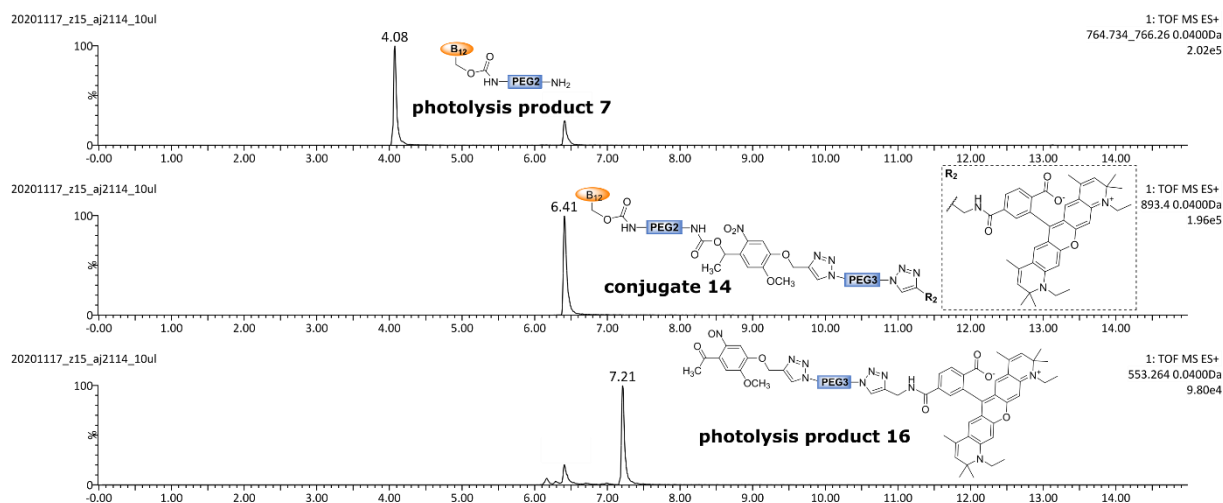


Figure 15. Substrate and products retention times determined by LC-MS.

Table 5. MS HR calculated for photolysis product 7 (retention time = 4.08).

Index	Input m/z	Calc. Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	DBE	Formula	Isotope Match Score
1	765.34140	1530.68240	0.3988	0.2605	27.50	C70 H104 N16 O17 P Co	0.000000

Table 6. MS HR calculated for substrate 14 (retention time = 6.41).

Index	Input m/z	Calc. Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	DBE	Formula	Isotope Match Score
1	893.39890	2680.18641	10.2892	3.8390	59.00	C131 H173 N26 O30 P Co	0.000000

Index	Input m/z	Calc. Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	DBE	Formula	Isotope Match Score
1	1339.59380	2679.17913	8.4657	3.1598	59.50	C131 H172 N26 O30 P Co	0.000000

Table 7. MS HR calculated for photolysis product 16 (retention time = 7.21).

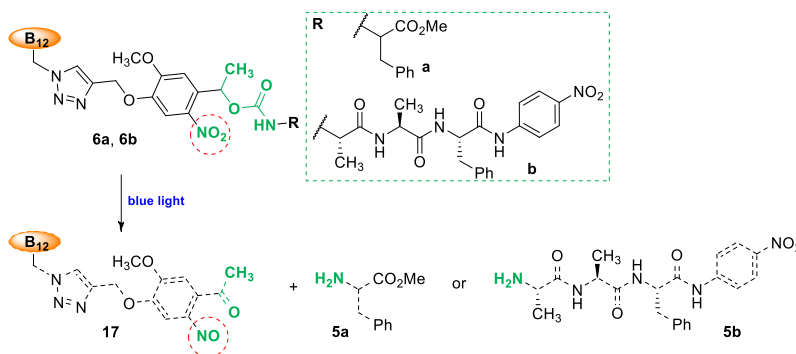
Elements Used:

C: 0-150 H: 0-150 N: 10-12 O: 10-12

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf %	C	H	N	O
1105.5171	1105.5147	2.4	2.2	31.5	C60 H69 N10 O11	251.3	n/a	n/a	60	69	10	11

Conjugates 6a and 6b: The second pathway assumed that after irradiation photocleavable moiety is attached to vitamin B₁₂ moiety, while biologically active molecules are released in the unmodified form (after spontaneous decarboxylation). This approach works for conjugates **6a** and **6b**, which after irradiation give cobalamin derivative **17** with photocleavable linker moiety and pure bioactive molecules: phenylalanine methyl ester (**5a**) or tripeptide Ala-Ala-Phe-pNA (**5b**), respectively for both stereoisomers **6a** and conjugate **6b** (Scheme 5). Conversions of both stereoisomers **6a** (0.1 mg, 0.054

μmol , $54 \mu\text{M}$) was 100% (Figure 16), and of bioconjugate **6b** (0.1 mg , $0.048 \mu\text{mol}$, $48 \mu\text{M}$) – 97% (Figure 19).



Scheme 5. Photocontrolled release of phenylalanine methyl ester (5a**) and Ala-Ala-Phe-pNA (**5b**).**

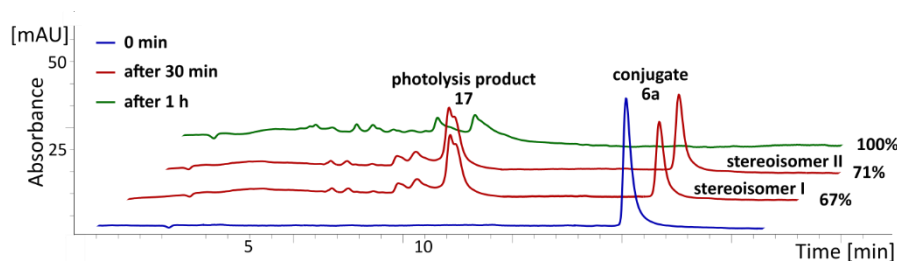


Figure 16. B₁₂-phenylalanine conjugate **6a at time 0, after 30 min and 1 h blue light irradiation (20 W).**

Due to the fact, that HPLC chromatograms for both stereoisomers **6a** were practically identical, only one graph (Figure 16) is provided. The only difference is in retention times between starting stereoisomers (conjugates **6a**), on the LC-MS HR analysis (for the first stereoisomer $r_t = 5.99$, for the second $r_t = 6.17$). The structures of products **17** and **5a** (not visible on Figure 16) were confirmed by MS HR. Due to the fact, that after irradiation cobalamin derivative **17** still bears photocleavable linker moiety, it most likely undergoes further changes/disconnections (we noticed this based on the finally decreasing the amount of compound **17**) – the same situation was observed in the case of products **15** and **16**.

Analysis of photoreleased products **5a and **17**:**

The LC-MS analysis displays a signal at $m/z = 180.1024$ corresponding to a pseudomolecular ion $[M + H]^+$ for the phenylalanine methyl ester (**5a**). For the vitamin B₁₂ derivative product **17**, the LC-MS analysis displays a signal at $m/z = 807.3295$ corresponding to a double charged ion $[M + 2H]^{2+}$.

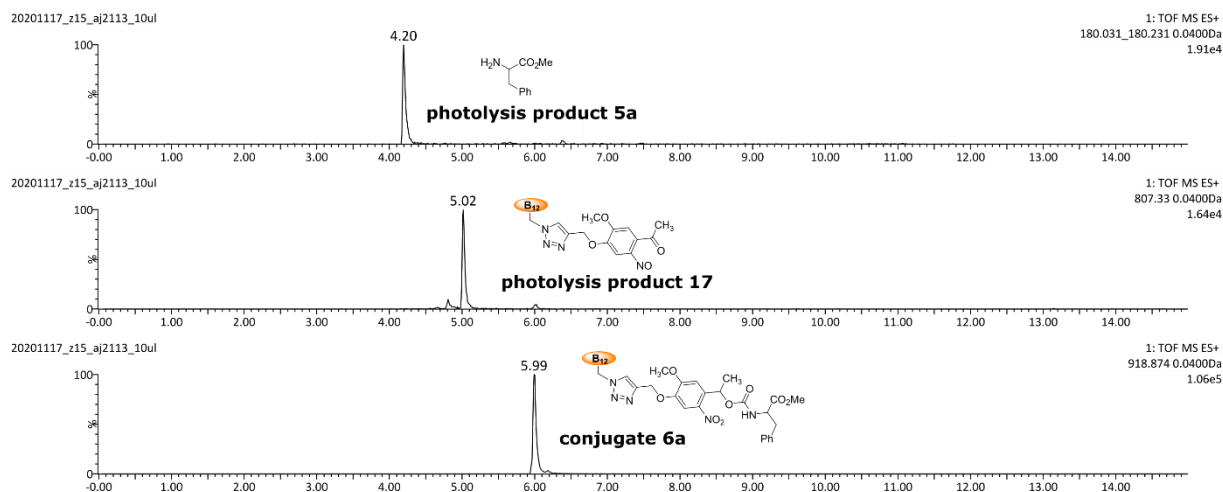


Figure 17. Substrate and products retention times determined by LC-MS for conjugate 6a, stereoisomer I.

Table 8. MS HR calculated for photolysis product 5a (retention time = 4.20).

Elements Used:

C: 0-150 H: 0-150 N: 0-2 O: 0-2

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf %	C	H	N	O
180.1024	180.1025	-0.1	-0.6	4.5	C10 H14 N O2	336.9	n/a	n/a	10	14	1	2

Table 9. MS HR calculated for photolysis product 17 (retention time = 5.02).

Index	Input m/z	Calc. Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	DBE	Formula	Isotope Match Score
1	807.32950	1614.65725	1.7509	1.0844	35.50	C75 H100 N18 O17 P Co	0.000000

Table 10. MS HR calculated for substrate 6a (retention time = 5.99).

Index	Input m/z	Calc. Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	DBE	Formula	Isotope Match Score
1	918.87180	1837.74171	1.8929	1.0300	40.50	C86 H113 N19 O21 P Co	0.999989

For the second of the stereoisomers **6a**: the LC-MS analysis displays a signal at $m/z = 180.1027$ corresponding to a pseudomolecular ion $[M + H]^+$ for the phenylalanine methyl ester (**5a**). For the vitamin B₁₂ derivative product **17**, the LC-MS analysis displays a signal at $m/z = 807.3300$ corresponding to a double charged ion $[M + 2H]^{2+}$.

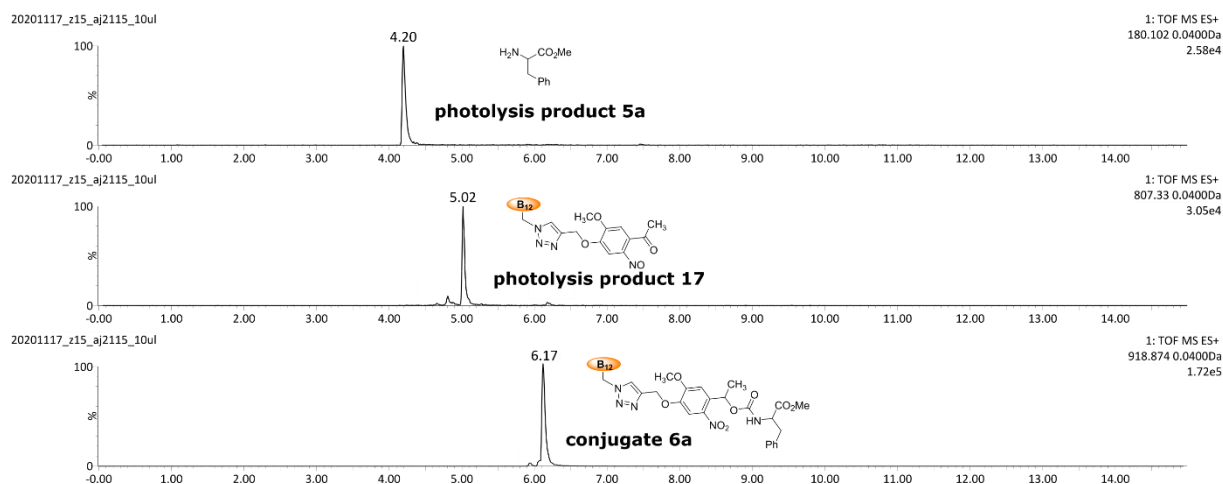


Figure 18. Substrate and products retention times determined by LC-MS for conjugate 6a, stereoisomer II.

Table 11. MS HR calculated for photolysis product 5a (retention time = 4.20).

Elements Used:

C: 0-150 H: 0-150 N: 0-2 O: 0-2

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf %	C	H	N	O
180.1027	180.1025	0.2	1.1	4.5	C10 H14 N O2	456.6	n/a	n/a	10	14	1	2

Table 12. MS HR calculated for photolysis product 17 (retention time = 5.02).

Index	Input m/z	Calc. Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	DBE	Formula	Isotope Match Score
1	807.33000	1614.65725	2.7509	1.7037	35.50	C75 H100 N18 O17 P Co	0.000000

Table 13. MS HR calculated for substrate 6a (retention time = 6.17).

Index	Input m/z	Calc. Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	DBE	Formula	Isotope Match Score
1	918.87290	1837.74171	4.0929	2.2271	40.50	C86 H113 N19 O21 P Co	0.999989

Conjugate 6b: Conjugate **6b** (Scheme 5) releases compound **5b**, which after spontaneous decarboxylation gives pure bioactive molecule **5b**. Additionally, in this case, we were able to isolate compound **5b**.

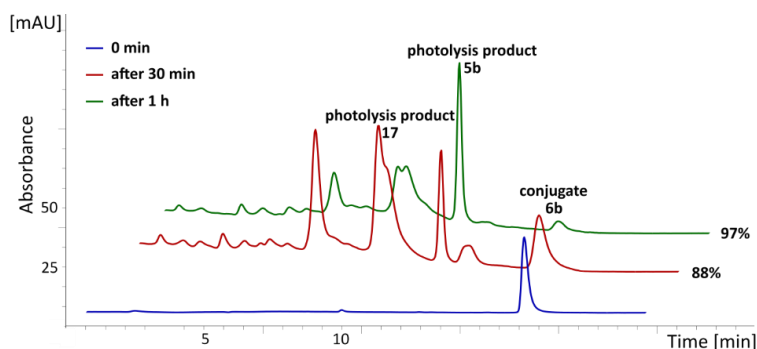


Figure 19. B₁₂-Ala-Ala-Phe conjugate 6b at time 0, after 30 min and 1 h blue light irradiation (20 W).

Analysis of photoreleased products 5b and 17:

Structures of photolysis products **5b** and **17** were confirmed by MS HR. The LC-MS analysis displays a signal at $m/z = 428.1936$ corresponding to a pseudomolecular ion $[M + H]^+$ for the tripeptide Ala-Ala-Phe-pNA (**5b**). For the vitamin B₁₂ derived product **17**, the LC-MS analysis displays a signal at $m/z = 807.3307$ corresponding to a double charged ion $[M + 2H]^{2+}$.

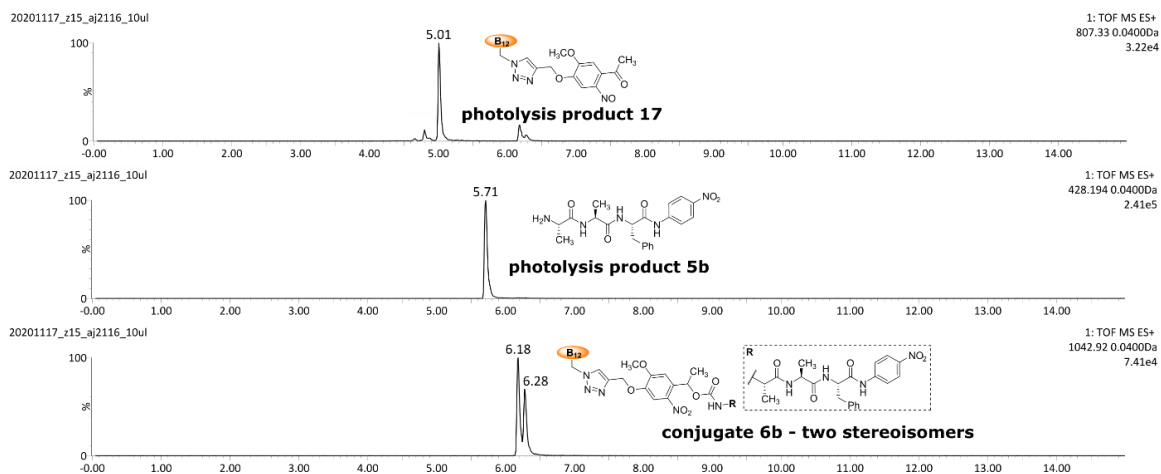


Figure 20. Substrate and products retention times determined by LC-MS for the conjugate 6b.

Table 14. MS HR calculated for photolysis product 17 (retention time = 5.01).

Index	Input m/z	Calc. Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	DBE	Formula	Isotope Match Score
1	807.33070	1614.65725	4.1509	2.5708	35.50	C75 H100 N18 O17 P Co	0.000000

Table 15. MS HR calculated for photolysis product 5b (retention time = 5.71).

Elements Used:
C: 0-150 H: 0-150 N: 0-5 O: 0-5

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf %	C	H	N	O
428.1936	428.1934	0.2	0.5	11.5	C21 H26 N5 O5	634.4	n/a	n/a	21	26	5	5

Table 16. MS HR calculated for the first stereoisomer of substrate 6b (retention time = 6.18).

Index	Input m/z	Calc. Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	DBE	Formula	Isotope Match Score
1	1042.91910	2085.83265	5.5524	2.6620	47.50	C97 H125 N23 O24 P Co	0.000000

Table 17. MS HR calculated for the second stereoisomer of substrate 6b (retention time = 6.28).

Index	Input m/z	Calc. Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	DBE	Formula	Isotope Match Score
1	1042.91920	2085.83265	5.7524	2.7578	47.50	C97 H125 N23 O24 P Co	0.000000

LC-MS analyzes were carried out on samples after photocleavage (after 30 minutes), therefore, in addition to the MS HR for photolysis products, analysis of each sample also includes the substrate analysis.

6.5. Isolation of products after photolysis

In the case of photodecomposition of B₁₂-biotin **10a**, we were able to isolate product **7** in 56% isolated yield, while in the case of compound **6b**, it was pure tripeptide Ala-Ala-Phe-pNA (**5b**), that was isolated in 86% yield. The structure of compounds **7** and **5b** were confirmed by HR MS and NMR spectra. In both cases, the photolysis product with no photolabile linker **2** moiety in its structure was isolated.

Isolated vitamin B₁₂ derivative product 7: To isolate photolysis product **7**, compound **10a** (50 mg, 23 μmol, 231 μM) dissolved in H₂O (100 mL). The resulting solution was divided into 100 vials. Irradiation conditions (blue light, 40 W, 30 min) was optimal for this concentration (0.5 mg in 1 mL). After irradiation, the contents of vials were combined and then concentrated *in vacuo*. The resulting solid was dissolved in H₂O (5 mL) and purified using preparative reverse phase-HPLC, (column B, method 2). Product **7** was isolated as a red powder. Yield: 20 mg, 56%. The structure of product **7** was confirmed by MS HR, the analysis displays a signal at $m/z = 765.3418$ corresponding to a double charged ion $[M + 2H]^{2+}$.

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 7.23 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.59 (s, 1H), 6.25 (d, 1H, $J = 2.9$ Hz), 6.05 (s, 1H), 4.87 – 4.83 (m, 1H), 4.65 (d, 1H, $J = 10.4$ Hz), 4.56 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 4.45 – 4.35 (m, 1H), 4.27 – 4.11 (m, 4H), 3.73 (t, 2H, $J = 5.1$ Hz), 3.69 – 3.62 (m, 6H), 3.59 – 3.54 (m, 2H), 3.42 – 3.47 (m, 1H), 3.30 – 3.21 (m, 2H), 3.18 – 3.12 (m, 2H), 2.93 – 2.83 (m, 2H), 2.73 – 2.34 (m, 9H), 2.59 (d, 6H, $J = 4.2$ Hz), 2.38 (s, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.19 – 1.71 (m, 8H), 1.89 (s, 4H), 1.47 (s, 3H), 1.38 (d, 6H, $J = 4.0$ Hz), 1.33 – 1.28 (m, 1H), 1.26 (d, 3H, $J = 6.3$ Hz), 1.19 (s, 3H), 1.17 – 1.10 (m, 1H), 0.46 (s, 3H).

¹³C NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ 180.2, 178.7, 176.09, 176.06, 176.0, 175.3, 174.1, 174.0, 173.2, 172.9, 165.7, 165.5, 141.9, 136.9, 134.3, 132.6, 129.9, 116.5, 111.0, 107.4, 103.8, 94.2, 86.8, 85.0, 79.9, 79.9, 74.9, 69.9, 69.8, 69.5, 69.1, 66.5, 66.4, 62.9, 58.9, 56.2, 55.5, 53.8, 51.1, 47.0, 45.18, 45.17, 42.5, 41.6, 40.3, 39.4, 39.3, 38.7, 34.8, 33.8, 32.1, 31.7, 31.6, 31.0, 30.9, 28.1, 26.03, 26.00, 19.5, 19.1, 19.0, 18.9, 18.7, 18.5, 16.1, 15.7, 15.0, 14.7.

t_R (RP-HPLC, column A, method 1) = 7.95 min (see HPLC chromatograms).

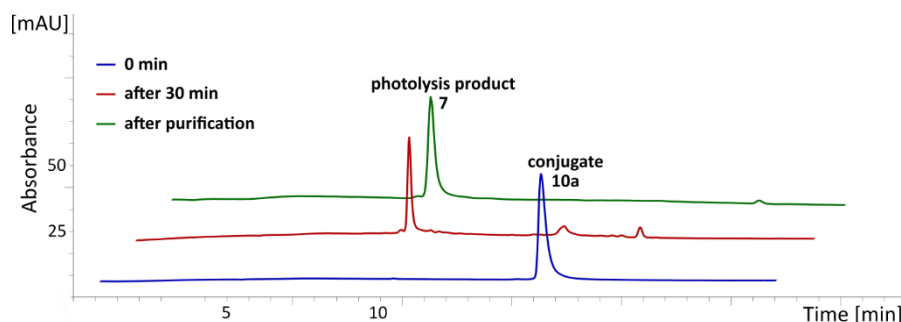


Figure 21. B₁₂-biotin conjugate **10a** at time 0, after 30 min on 40 W blue light irradiation (total of 100 vials), and after purification.

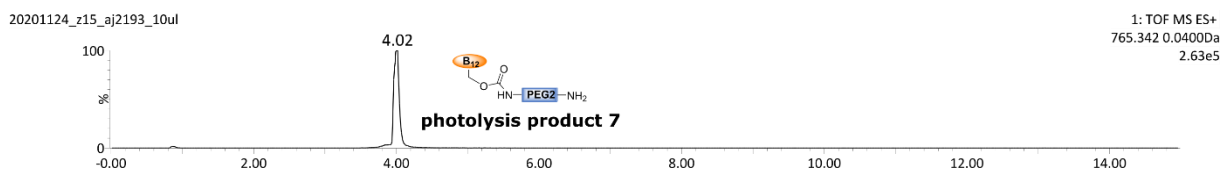


Figure 22. Retention time determined by LC-MS for the isolated photolysis product 7.

Table 18. MS HR calculated for the isolated photolysis product 7 (retention time = 4.02).

Index	Input m/z	Calc. Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	DBE	Formula	Isotope Match Score
1	765.34180	1530.68240	1.1988	0.7832	27.50	C70 H104 N16 O17 P Co	0.000000
2	765.34180	1530.67834	5.2593	3.4359	29.50	C70 H100 N18 O16 Na Co	0.000000

Isolated tripeptide Ala-Ala-Phe-pNA (5b): To isolate product **5b** from the photolysis of conjugate **6b**, we prepared a solution of compound **6b** (30 mg, 14 μ mol, 240 μ M) in a mixture of H₂O and MeOH (50 mL/10 mL, to improve the solubility). The resulting solution was divided equally into 60 vials. Irradiation conditions (blue light, 30 W, 1 h) was optimal for this concentration (0.5 mg in 1 mL). After irradiation, the contents of the vials were combined and then concentrated *in vacuo*. The resulting solid was dissolved in H₂O (5 mL) and purified using preparative reverse phase-HPLC, (column B, method 2) giving product **5b**, as a white powder. Yield: 5.3 mg, 86%. The structure of product **5b** was confirmed by **MS HR**, the analysis display a signal at $m/z = 428.1934$ corresponding to a pseudomolecular ion $[M + H]^+$.

¹H NMR (DMSO-d₆, 600 MHz): δ 10.59 (s, 1H), 8.33 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 8.24 – 8.20 (m, 2H), 7.99 (s, 1H), 7.86 – 7.82 (m, 2H), 7.29 – 7.24 (m, 4H), 7.21 – 7.18 (m, 1H), 4.66 (ddd, 1H, $J = 9.4, 7.7, 5.4$ Hz), 4.26 (q, 1H, $J = 7.0$ Hz), 3.24 (q, 1H, $J = 6.9$ Hz), 3.10 (dd, 1H, $J = 13.9, 5.4$ Hz), 2.93 (dd, 1H, $J = 13.9, 9.3$ Hz), 1.86 (s, 2H), 1.16 (d, 3H, $J = 7.0$ Hz), 1.09 (d, 3H, $J = 6.9$ Hz).

¹³C NMR (DMSO-d₆, 151 MHz): δ 176.0, 172.9, 171.4, 145.3, 142.8, 137.7, 129.6, 128.6, 126.9, 125.4, 119.5, 55.5, 50.6, 48.2, 40.5, 37.6, 21.8, 18.9.

t_R (RP-HPLC, column A, method 1) = 12.83 min (see HPLC chromatograms).

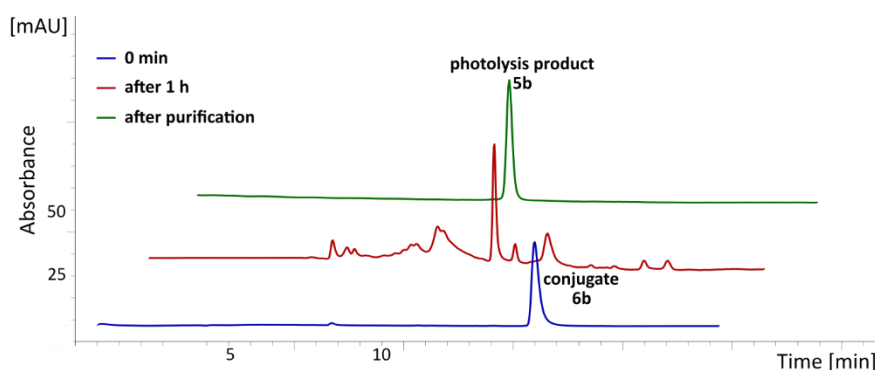


Figure 23. Conjugate 6b at time 0, after 1 h on 30 W blue light irradiation (total of 60 vials), and after purification.

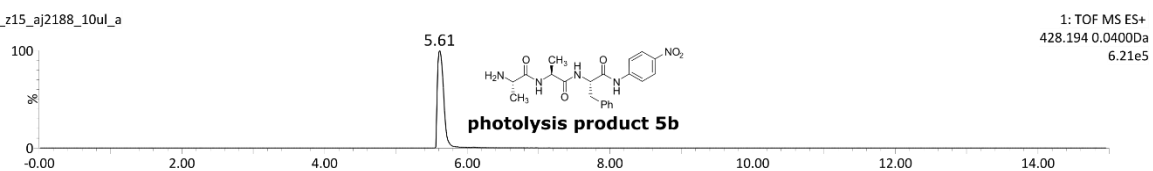


Figure 24. Retention time determined by LC-MS for the isolated photolysis product 5b.

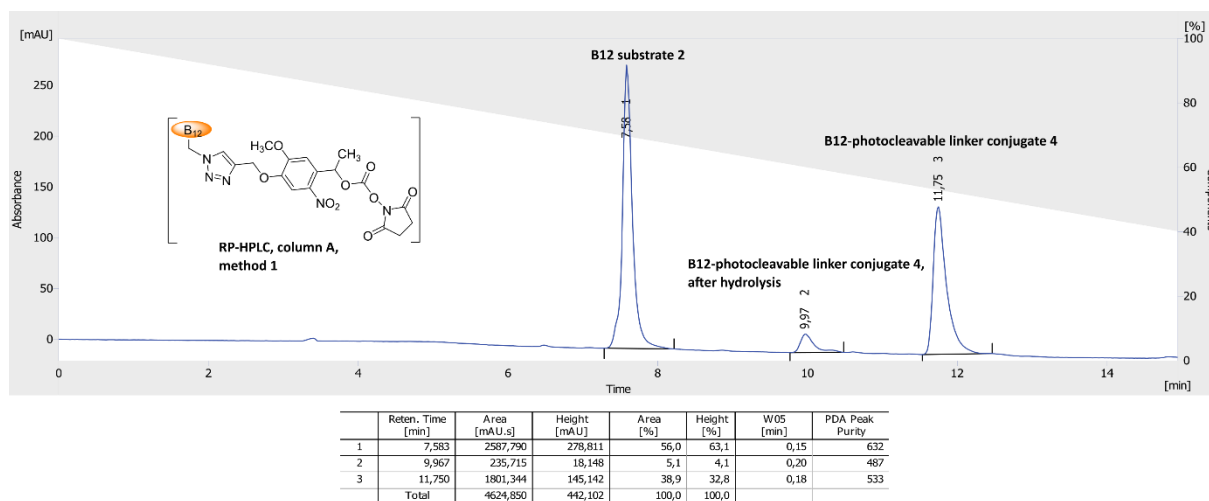
Table 19. MS HR calculated for the isolated photolysis product 5b (retention time = 5.61).

Elements Used:

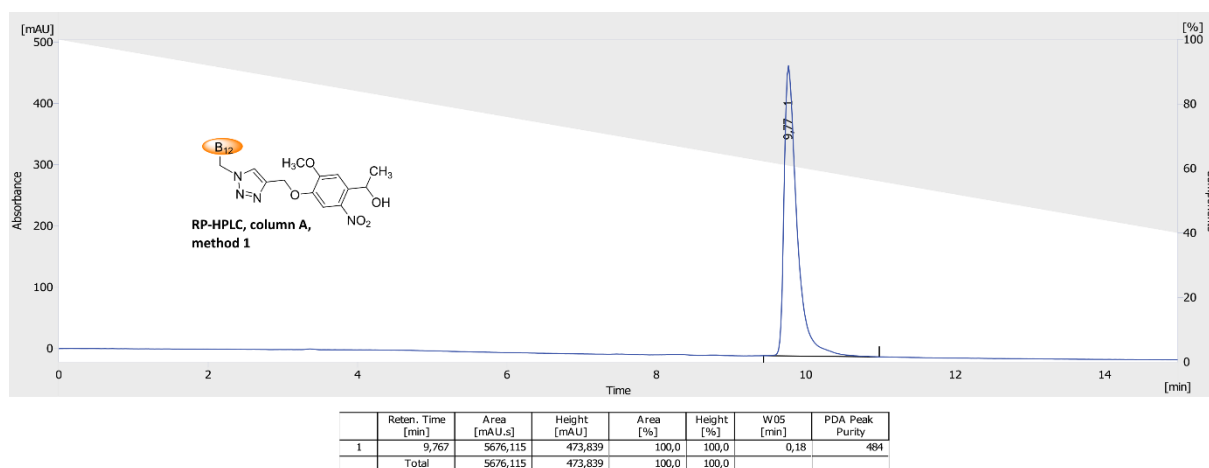
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf %	C	H	N	O	Na
428.1935	428.1934	0.1	0.2	11.5	C21 H26 N5 O5	945.3	1.903	14.92	21	26	5	5	
	428.1923	1.2	2.8	13.5	C20 H23 N9 O Na	945.7	2.336	9.68	20	23	9	1	1
	428.1947	-1.2	-2.8	16.5	C22 H22 N9 O	948.4	5.044	0.64	22	22	9	1	

7. HPLC ANALYSES

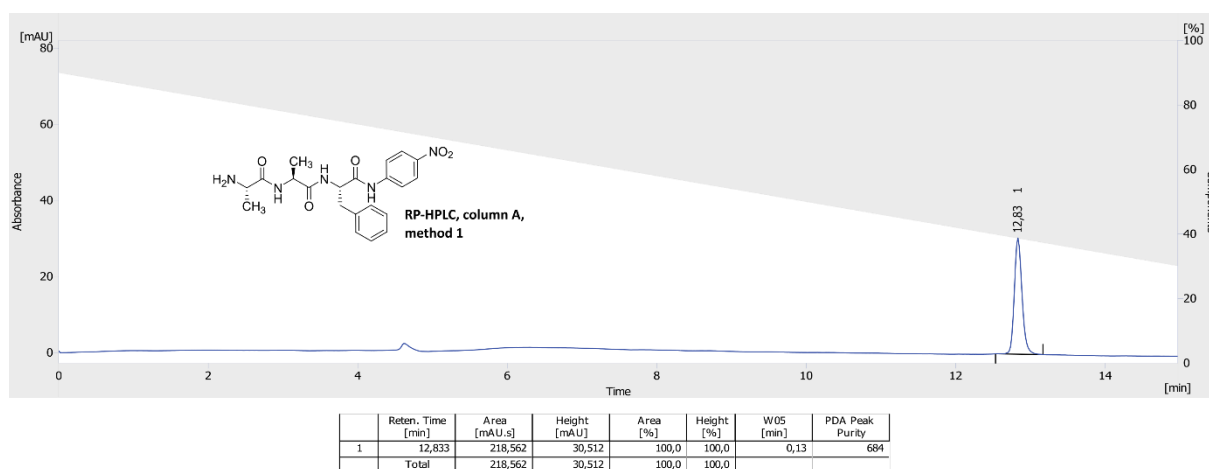
B₁₂-photocleavable linker conjugate 4, reaction mixture after 15 min



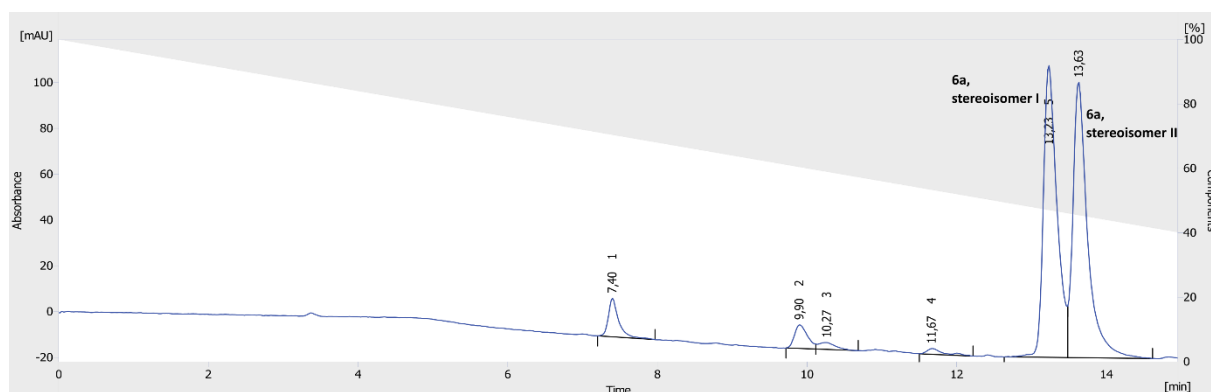
B₁₂-photocleavable linker conjugate 4, after hydrolysis



Compound 5b (after photo-release)

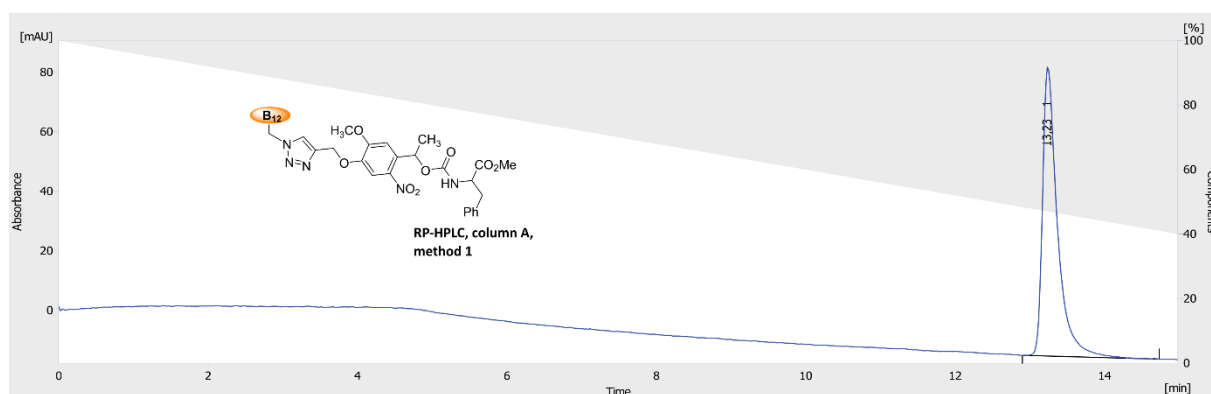


B₁₂-Phe conjugate 6a, reaction mixture after 3 h



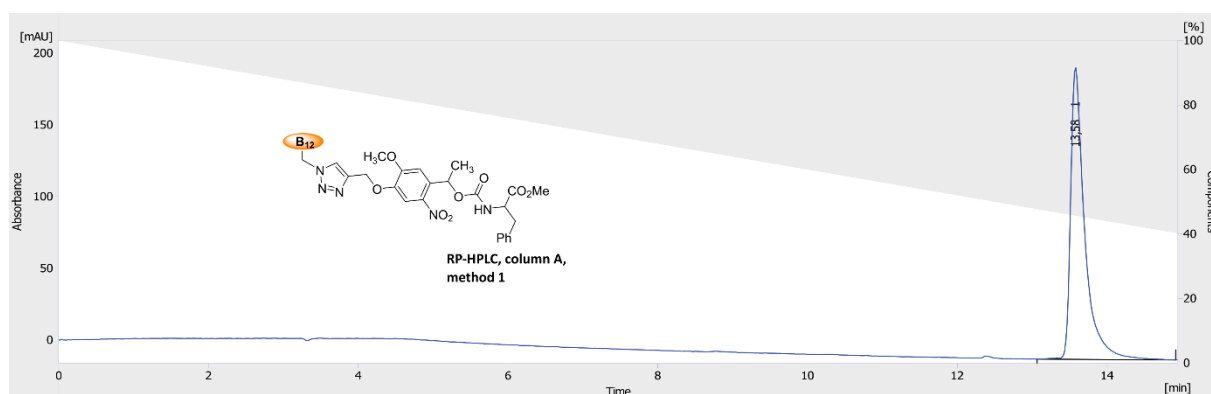
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	7,400	161,304	16,820	4,4	6,0	0,15	395
2	9,900	123,336	10,302	3,4	3,7	0,20	856
3	10,267	49,542	3,019	1,4	1,1	0,27	990
4	11,667	40,395	2,537	1,1	0,9	0,18	995
5	13,233	1599,107	127,359	44,1	45,5	0,20	632
6	13,633	1653,147	120,134	45,6	42,9	0,22	497
Total		3626,831	280,171	100,0	100,0		

B₁₂-Phe conjugate 6a, stereoisomer I



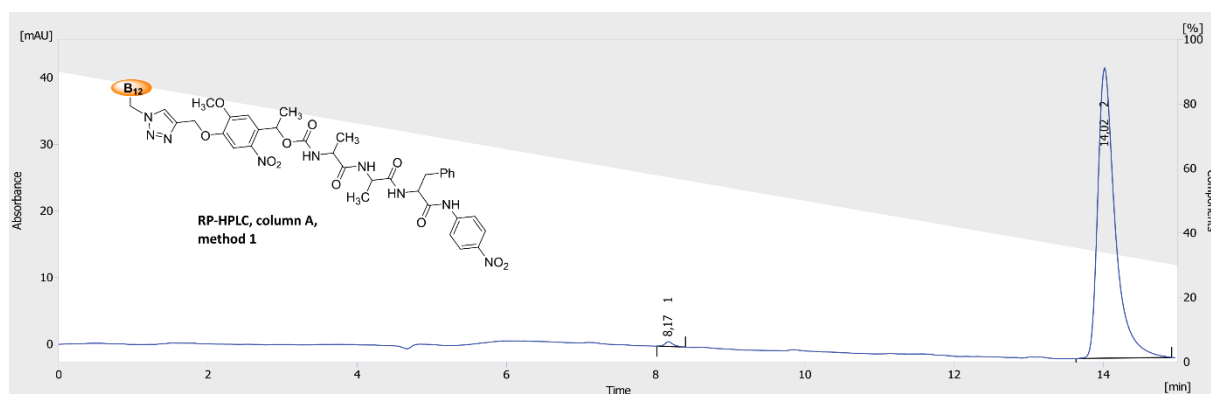
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	13,233	1350,166	97,082	100,0	100,0	0,22	469
Total		1350,166	97,082	100,0	100,0		

B₁₂-Phe conjugate 6a, stereoisomer II



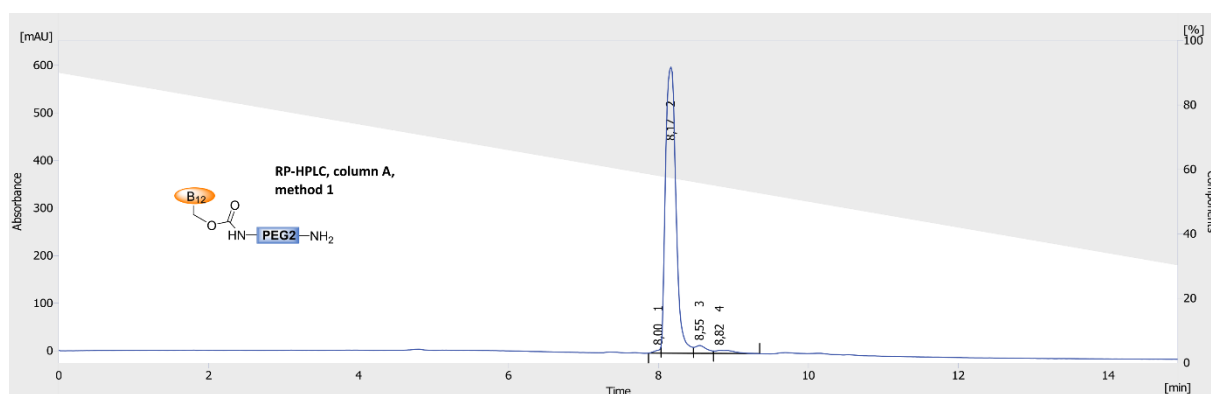
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	13,583	2664,524	203,316	100,0	100,0	0,20	466
Total		2664,524	203,316	100,0	100,0		

B₁₂-Ala-Ala-Phe conjugate 6b



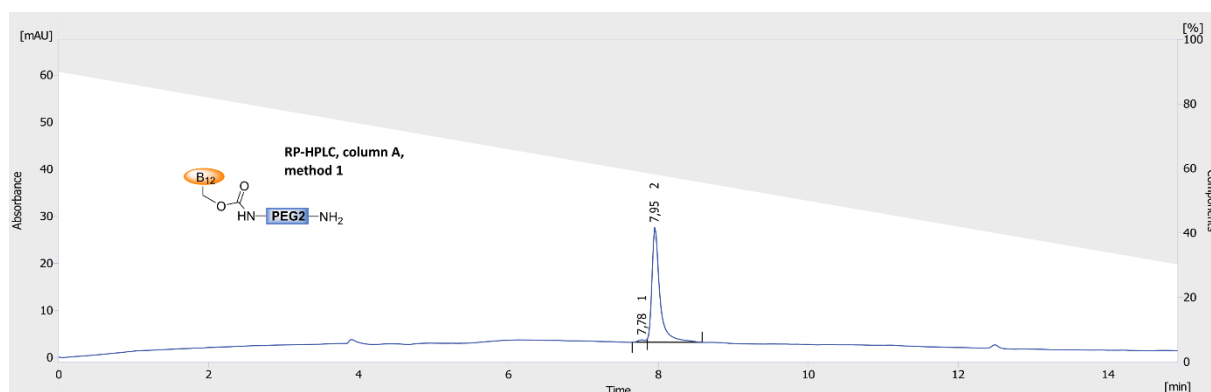
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	8,167	5,669	0,720	0,8	1,6	0,12	777
2	14,017	703,132	43,598	99,2	98,4	0,23	716
Total		708,801	44,317	100,0	100,0		

B₁₂ derivative 7



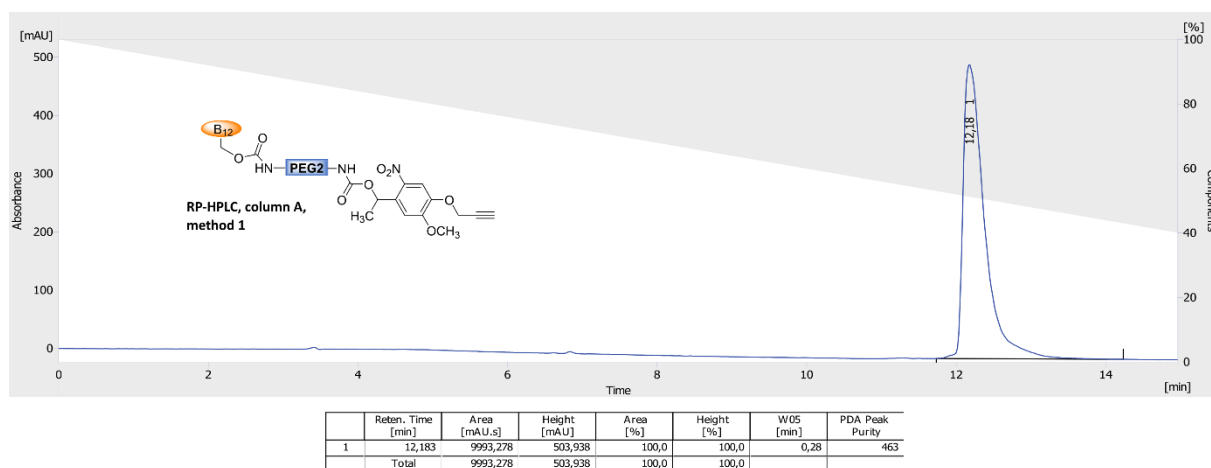
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	8,000	35,977	6,405	0,6	1,0	0,10	980
2	8,167	5837,582	601,450	94,4	95,3	0,17	766
3	8,550	187,842	16,611	3,0	2,6	0,20	995
4	8,817	121,695	6,455	2,0	1,0	0,30	983
Total		6183,096	630,921	100,0	100,0		

B₁₂ derivative 7 (after photo-release)

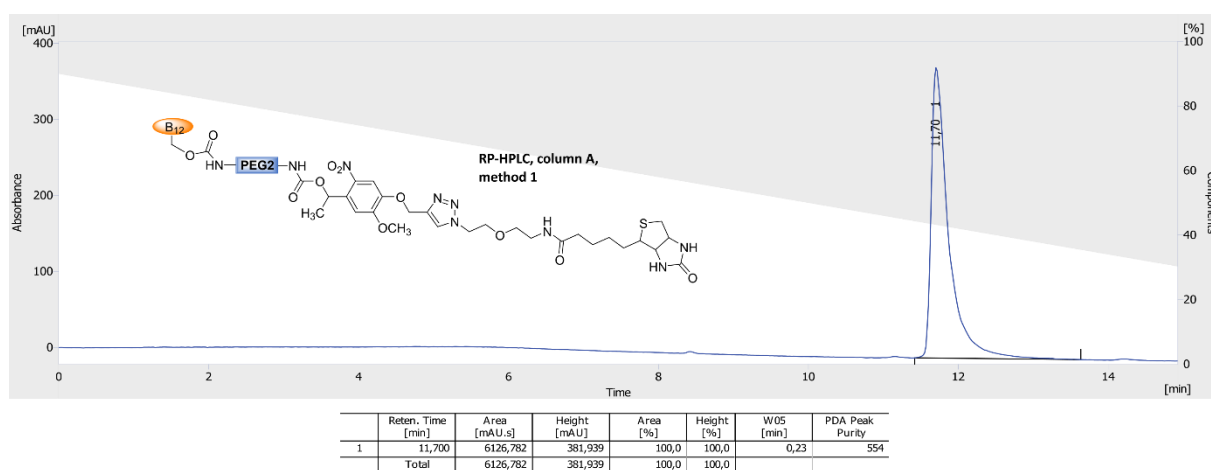


	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	7,783	3,551	0,511	1,9	2,1	0,13	1000
2	7,950	181,274	24,393	98,1	97,9	0,12	968
Total		184,825	24,904	100,0	100,0		

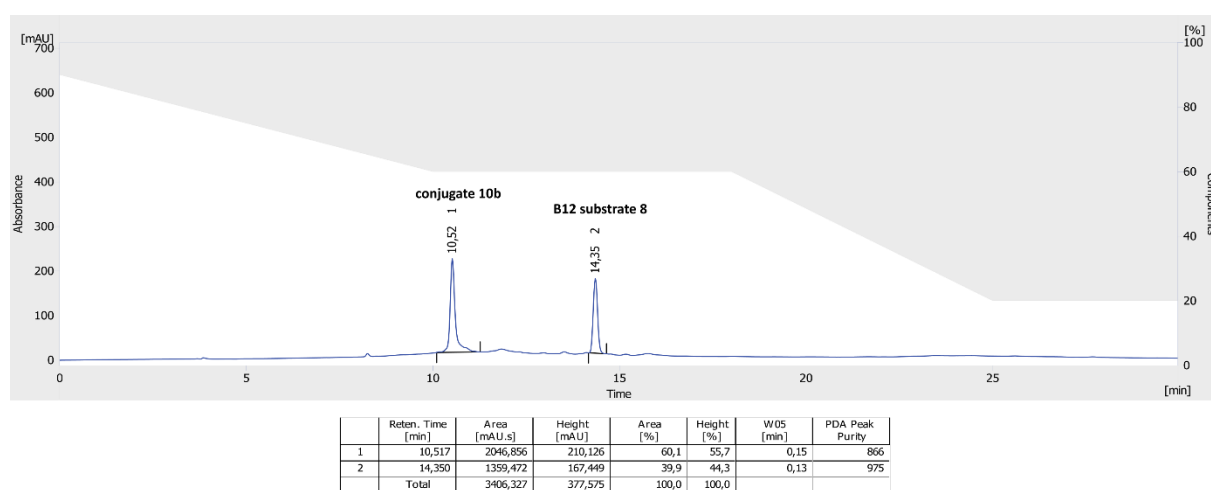
B₁₂-photocleavable linker conjugate 8



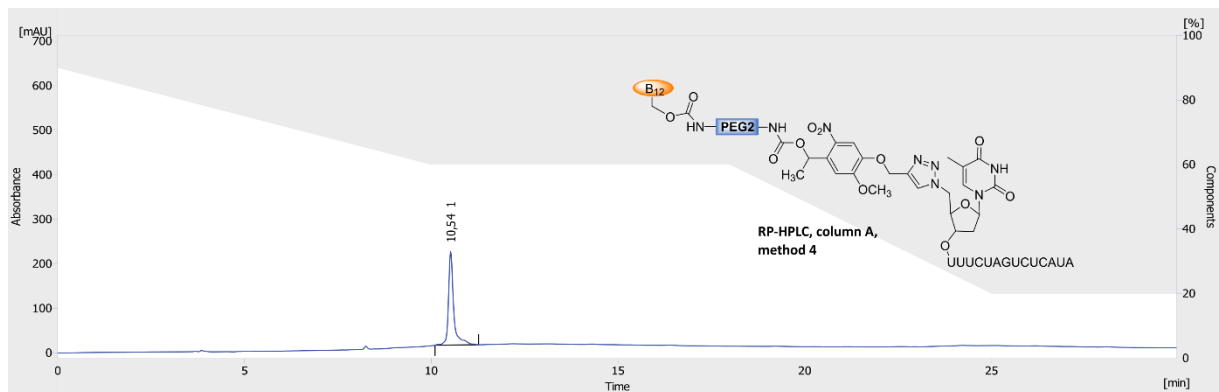
B₁₂-biotin conjugate 10a



B₁₂-RNA, reaction mixture after 16 h

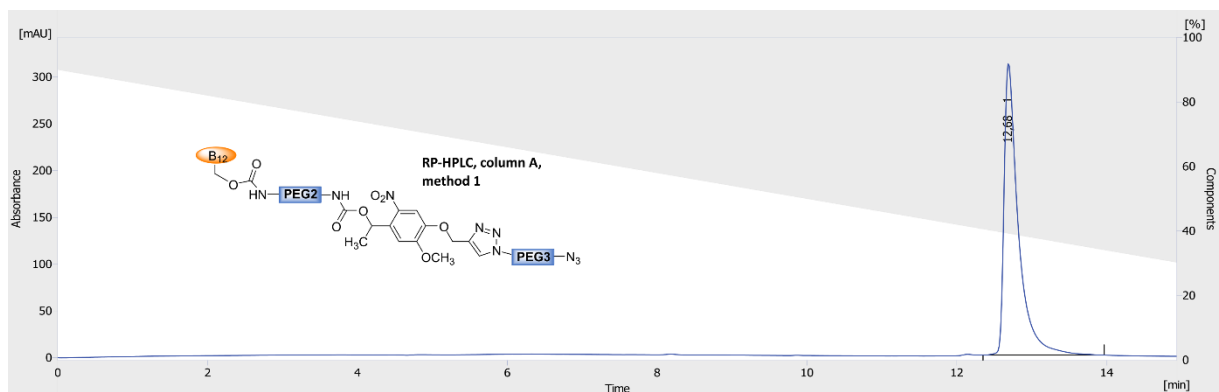


B₁₂-RNA conjugate 10b



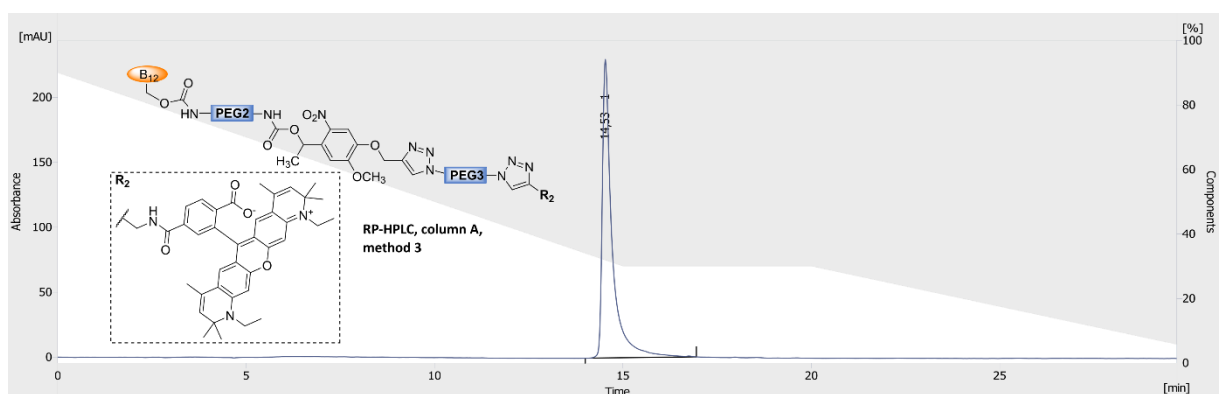
	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	10,537	2046,896	210,126	100,0	100,0	0,15	866
	Total	2046,896	210,126	100,0	100,0		

B₁₂ derivative 12



	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	12,683	4116,590	311,355	100,0	100,0	0,20	724
	Total	4116,590	311,355	100,0	100,0		

B₁₂-ATTO conjugate 14



	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	14,533	4177,473	229,708	100,0	100,0	0,25	407
	Total	4177,473	229,708	100,0	100,0		

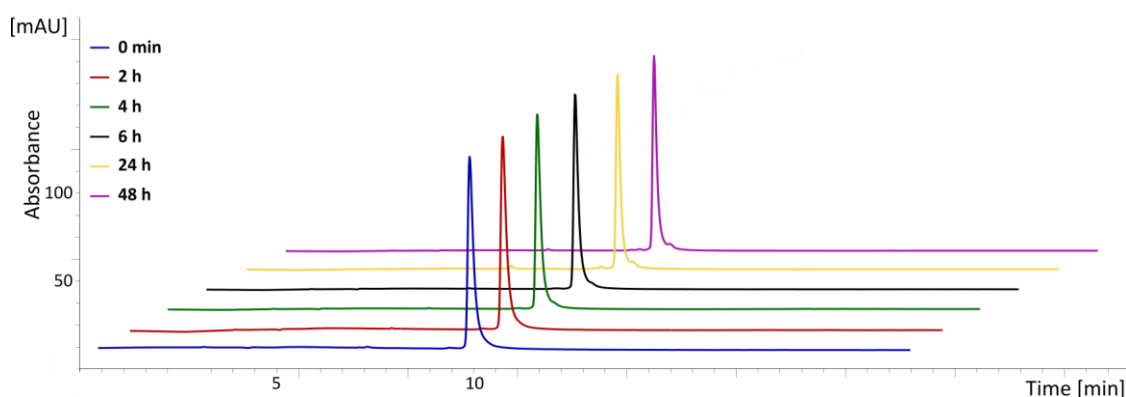
8. STABILITY OF THE BIOCONJUGATES 6B AND 10A

The stability of exemplary bioconjugates **6b** and **10a** at different pH (4.3, 7.4, and 8.7), in the presence of GSH - a model reducing agent and biological nucleophiles were evaluated. Compounds **6b** (0.42 mg, 0.2 μ mol, 0.004 μ M) or **10a** (0.43 mg, 0.2 μ mol, 0.004 μ M) were dissolved in H₂O (50 μ L) in 1.5 mL Eppendorf tubes. Then, either PBS buffer (1.5 mL, pH = 4.3 (100 mM), 7.4 (10 mM) or 8.7 (10 mM)), a solution of GSH in PBS buffer (1.5 mL, 6.7 mM, 50 equiv, pH = 7.4, 10 mM) or a solution of biological nucleophiles (cysteine, lysine, serine, 6.7 mM each in PBS buffer pH = 7.4, 10 mM), was added. *Note: The stability of conjugate **10a** towards nucleophiles was evaluated separately for each nucleophile (cysteine, lysine, and serine) while for compound **6b**, thy was used as a mixture.* Samples were protected from light and mixed in the Thermo SCIENTIFIC MAXQ 4450 shaker (160 rpm, 36.6 °C) for 48 hours. During that time, the purity of conjugates was monitored by HPLC analysis (column A, method 3).

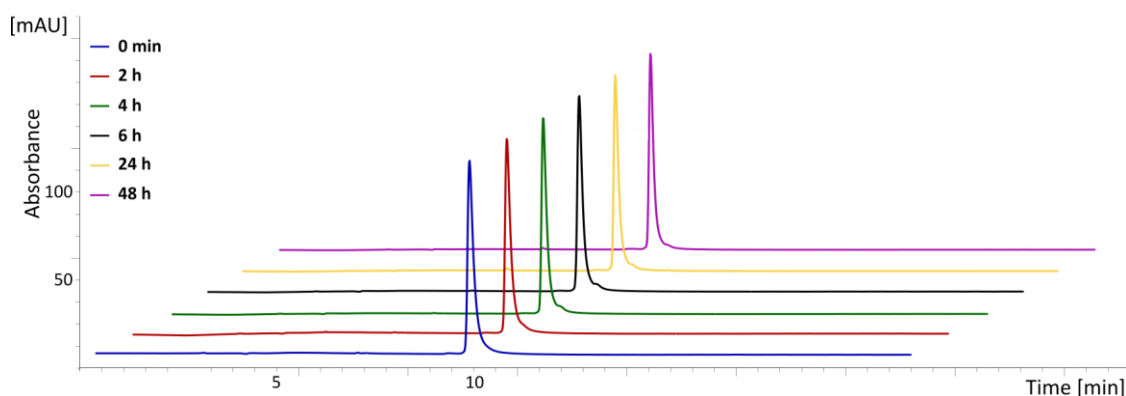
Both of the conjugates **10a** and **6b** were very stable under all conditions.

Stability of B₁₂-biotin conjugate 10a:

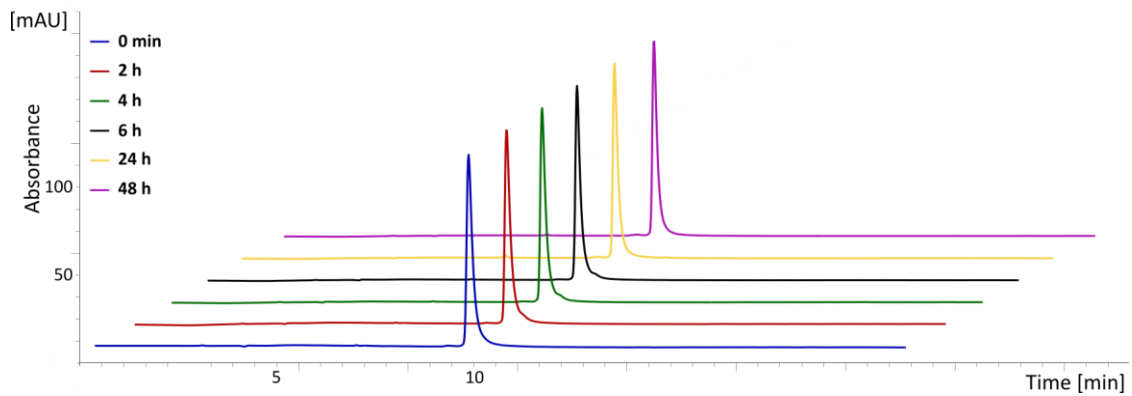
- **at PBS buffer, pH = 4.3, 100 mM**



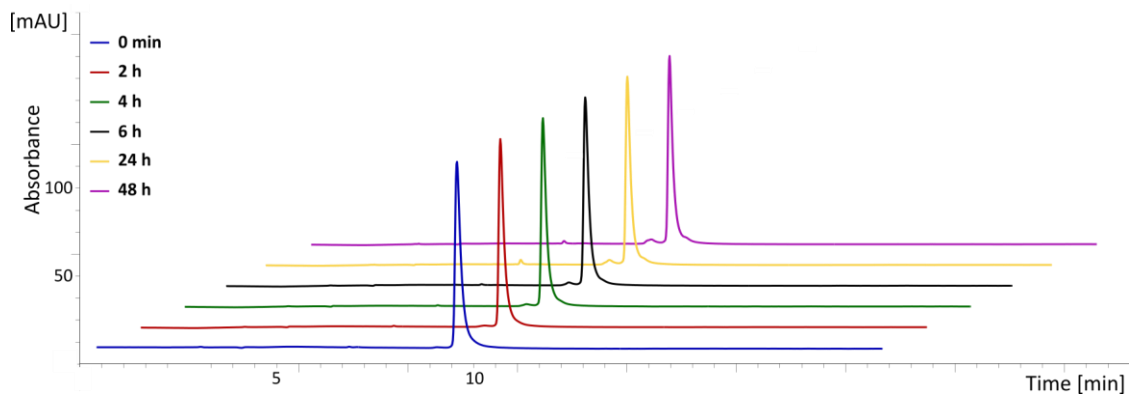
- **at PBS buffer, pH = 7.4, 10 mM**



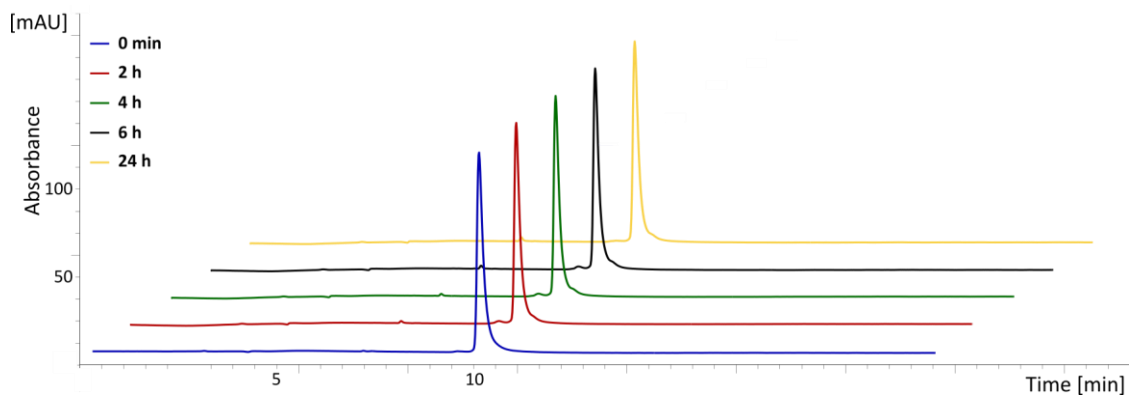
- **at PBS buffer, pH = 8.7, 10 mM**



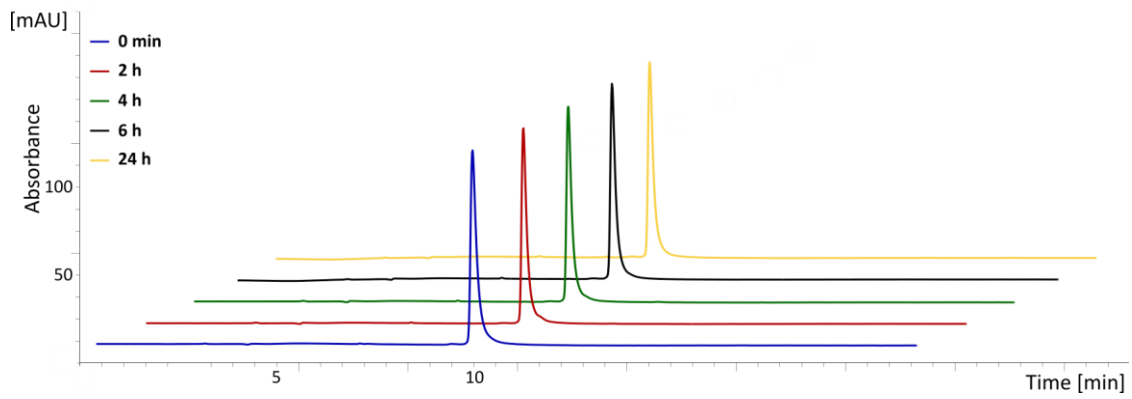
- **in the presence of GSH (50 equiv) dissolved in PBS buffer (pH = 7.4, 10 mM)**



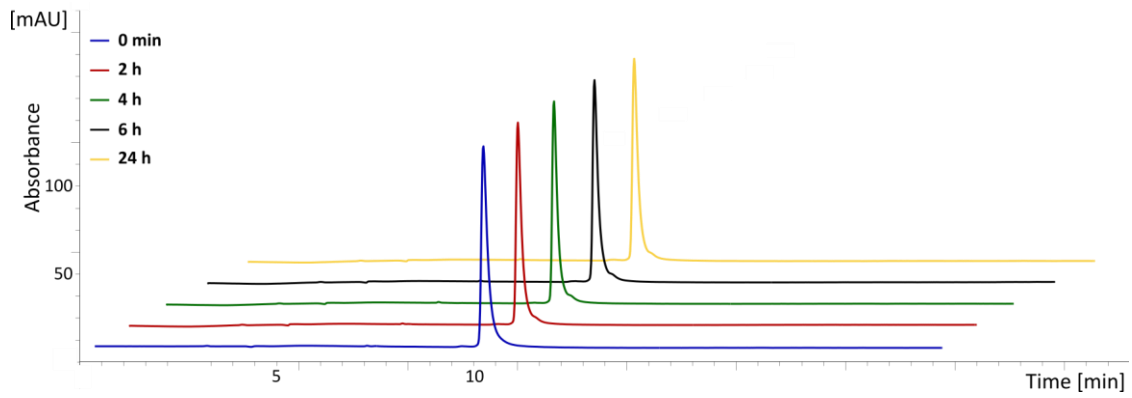
- **in the presence of cysteine (50 equiv) dissolved in PBS buffer (pH = 7.4, 10 mM)**



- *in the presence of lysine (50 equiv) dissolved in PBS buffer (pH = 7.4, 10 mM)*

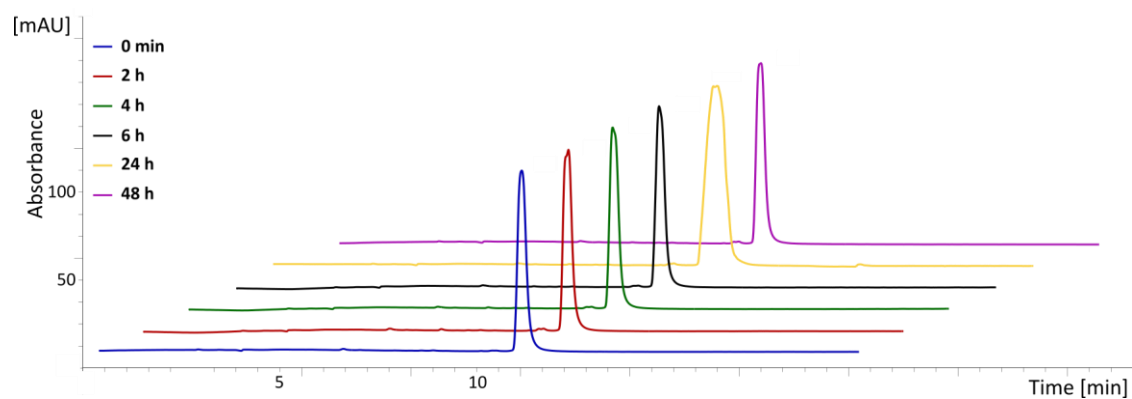


- *in the presence of serine (50 equiv) dissolved in PBS buffer (pH = 7.4, 10 mM)*

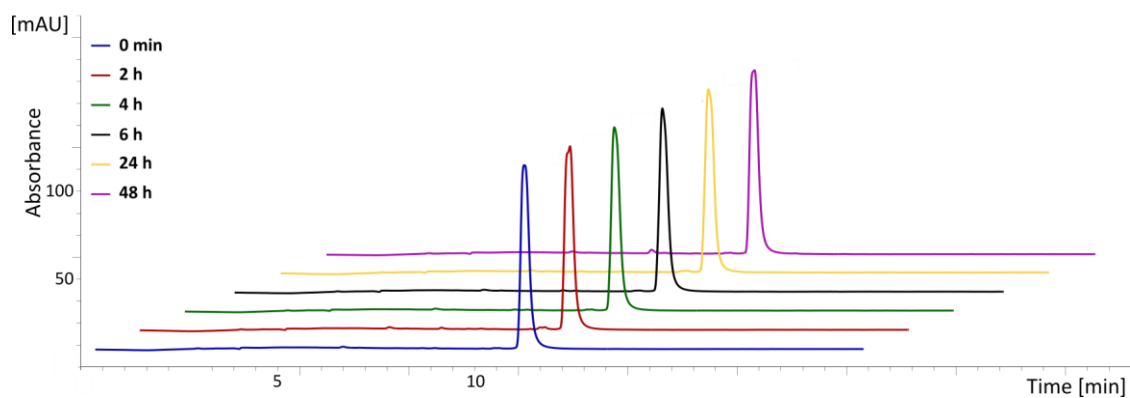


Stability of B₁₂-Ala-Ala-Phe conjugate 6b:

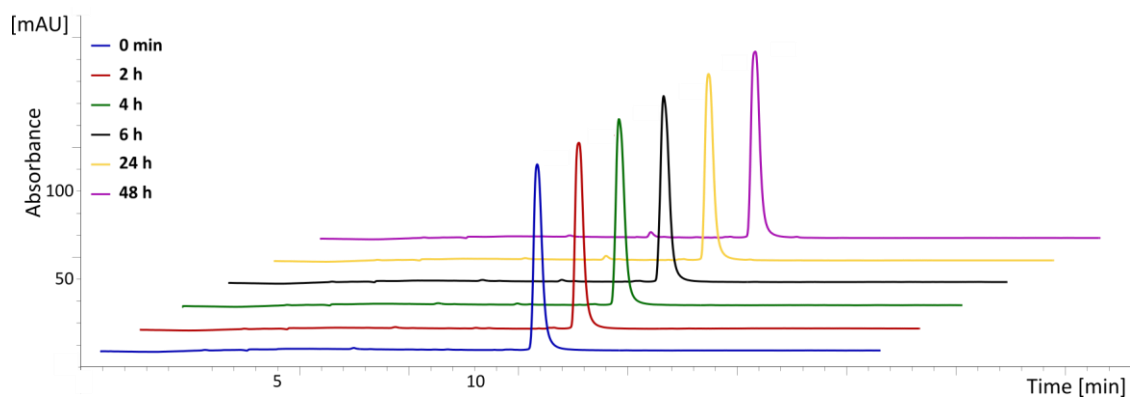
- **at PBS buffer, pH = 4.3, 100 mM**



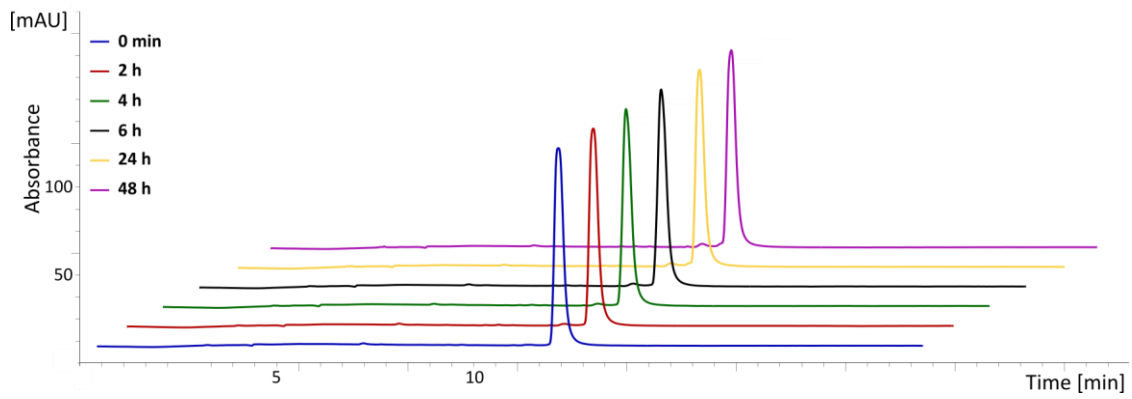
- **at PBS buffer, pH = 7.4, 10 mM**



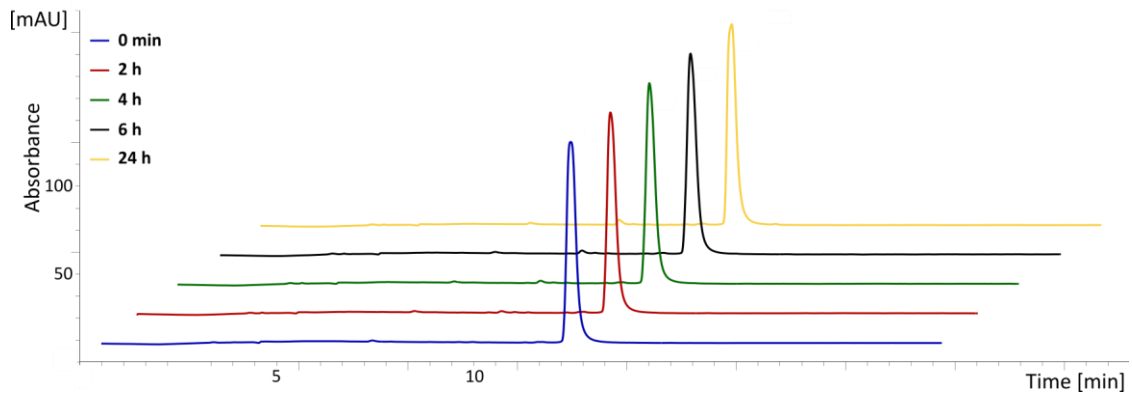
- **at PBS buffer, pH = 8.7, 10 mM**



- ***in the presence of GSH (50 equiv) dissolved in PBS buffer (pH = 7.4, 10 mM)***

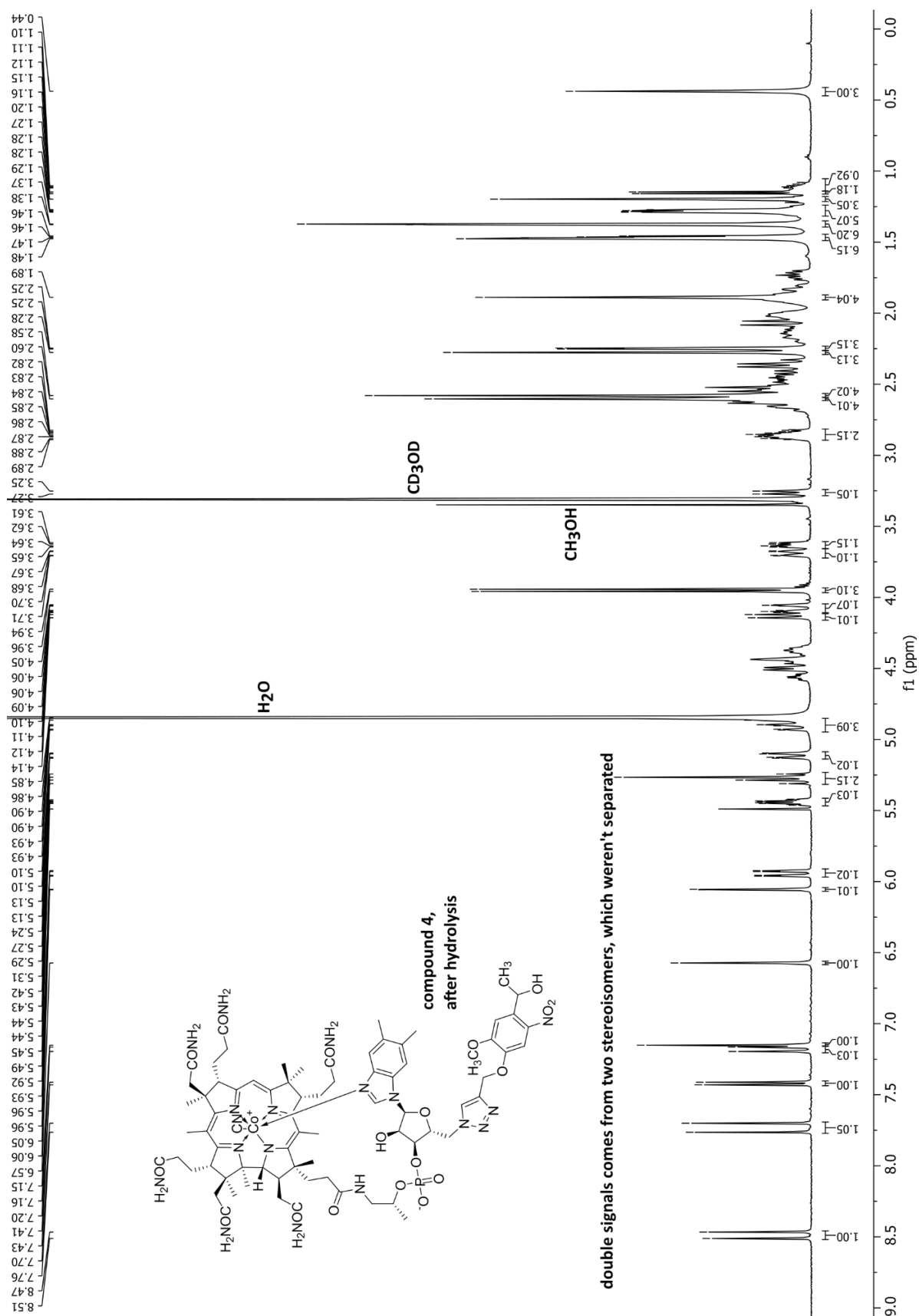


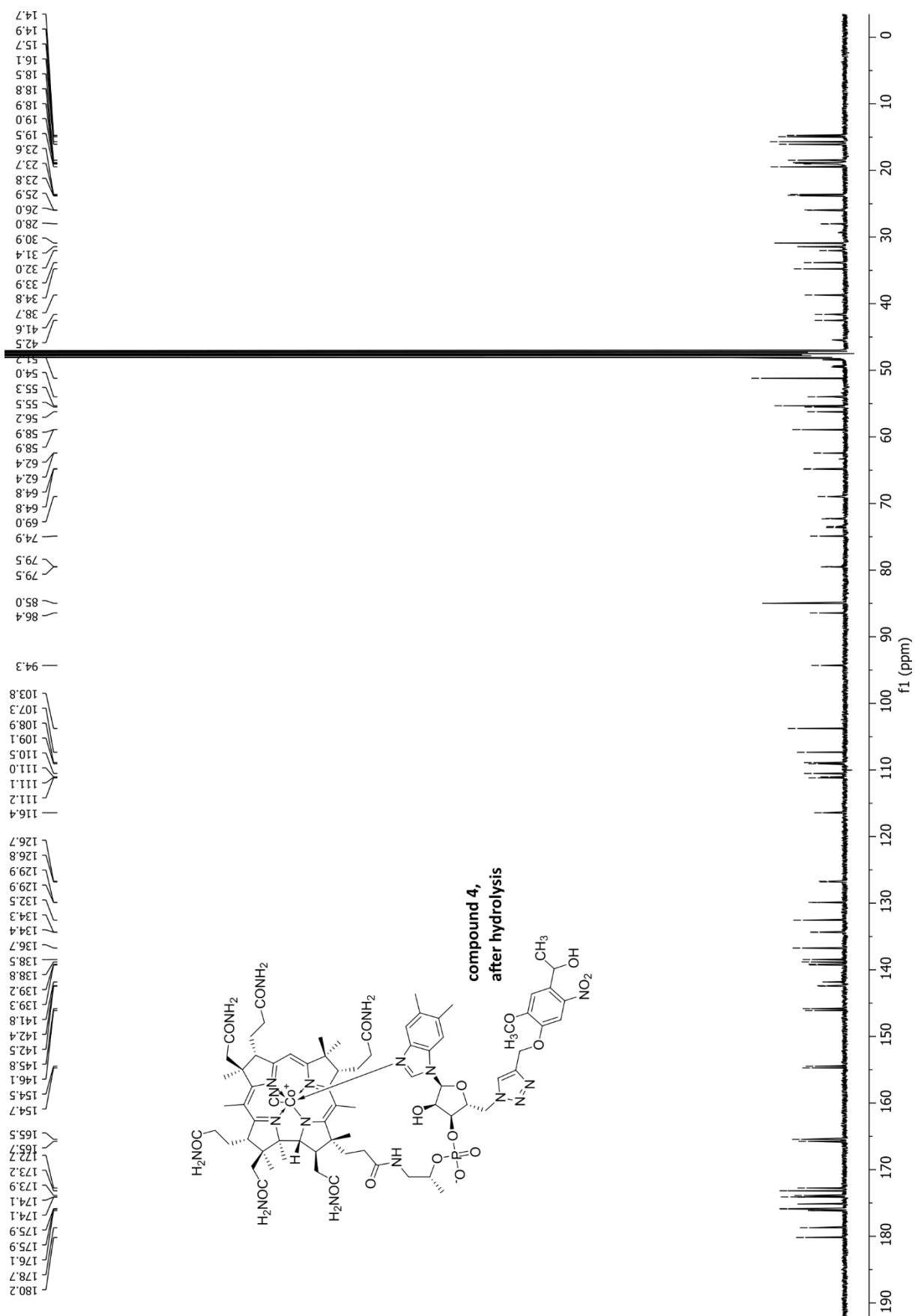
- ***in the presence of the mixture of cysteine (50 equiv), lysine (50 equiv) and serine (50 equiv) dissolved in PBS buffer (pH = 7.4, 10 mM)***



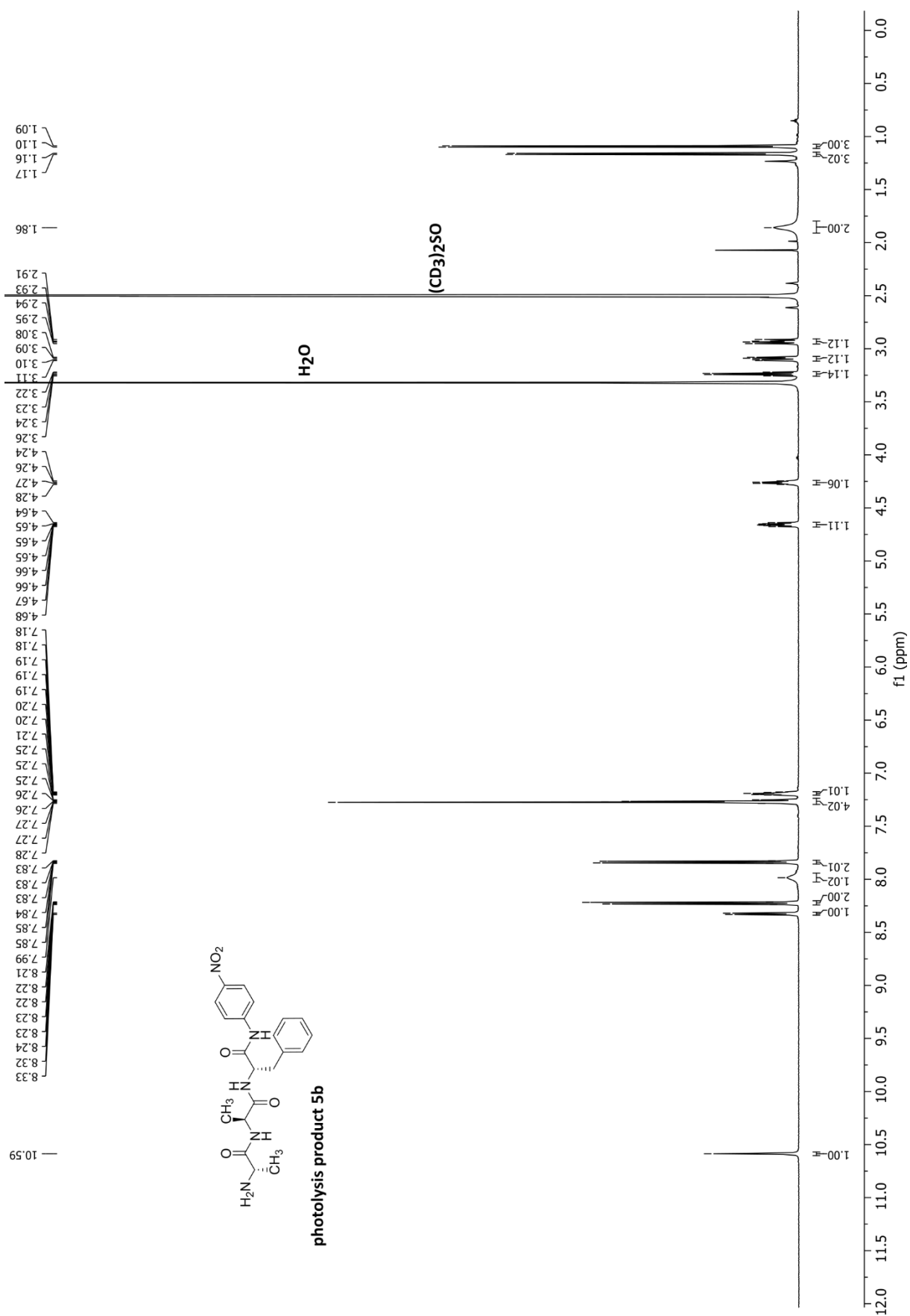
9. ^1H AND ^{13}C NMR SPECTRA

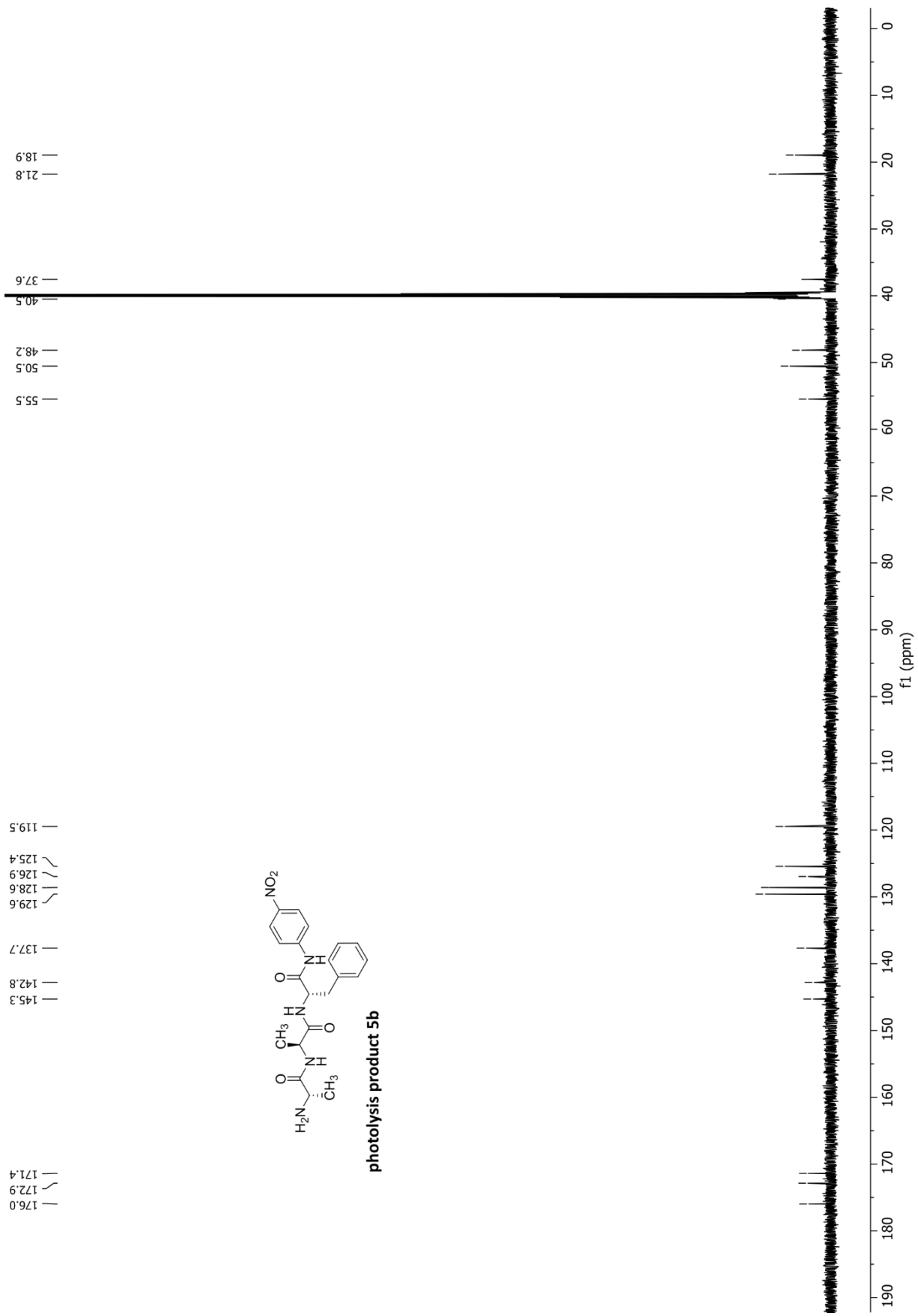
9.1. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound 4 (after hydrolysis) in CD_3OD (for clarity only well-isolated signals are integrated)



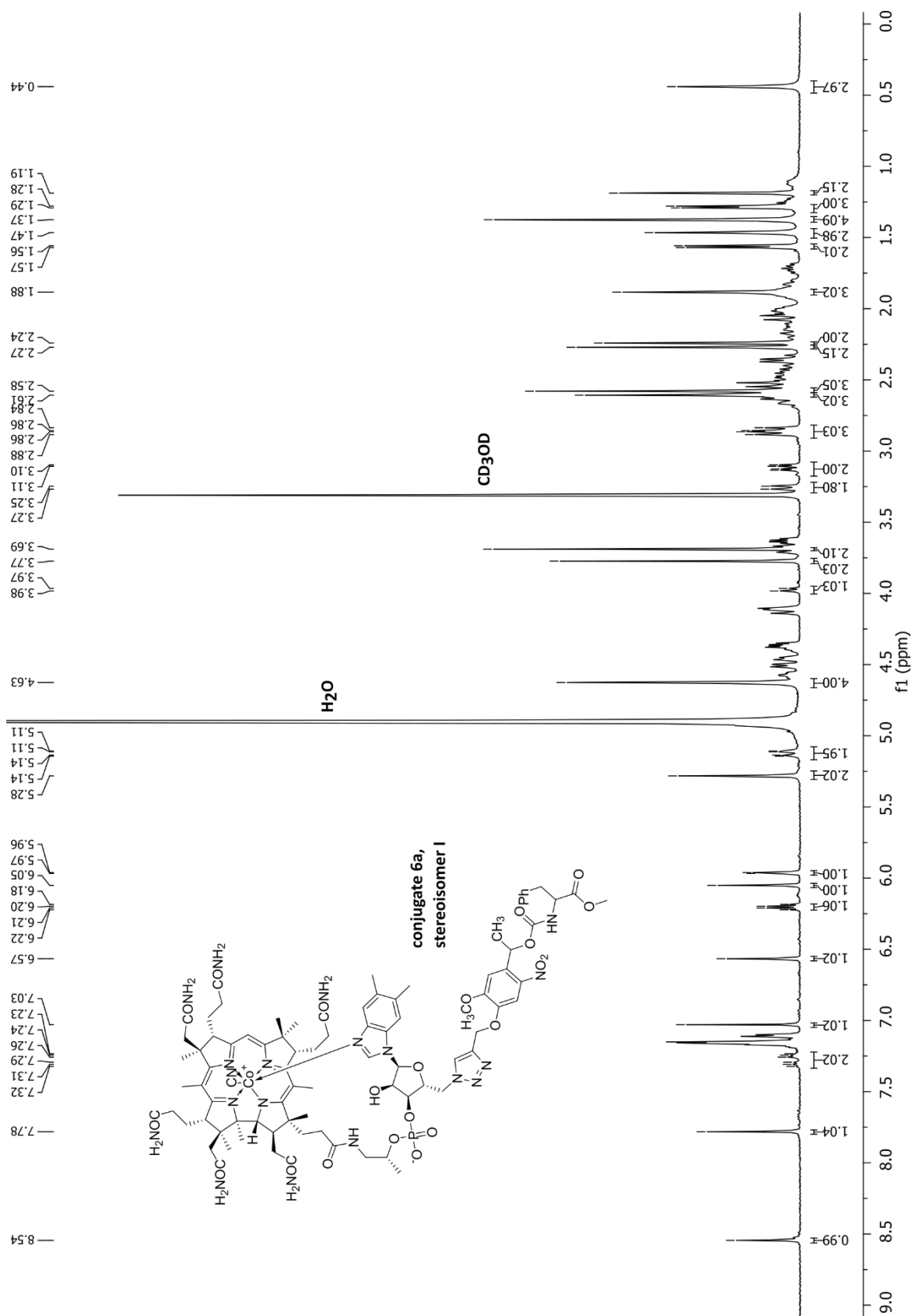


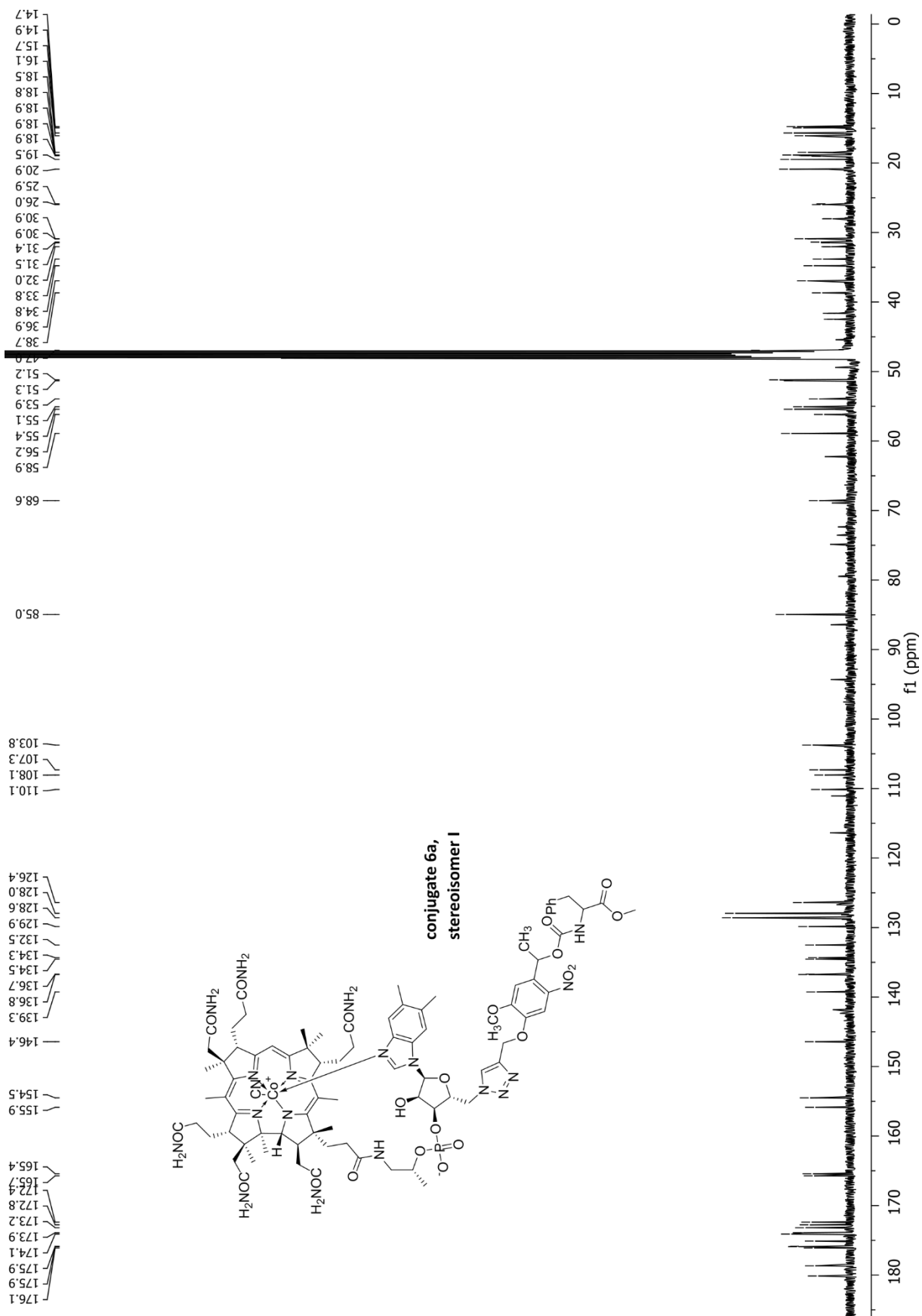
9.2. ^1H NMR (600 MHz) and ^{13}C NMR (151 MHz) of compound 5b (isolated after photo-release) in DMSO-d_6



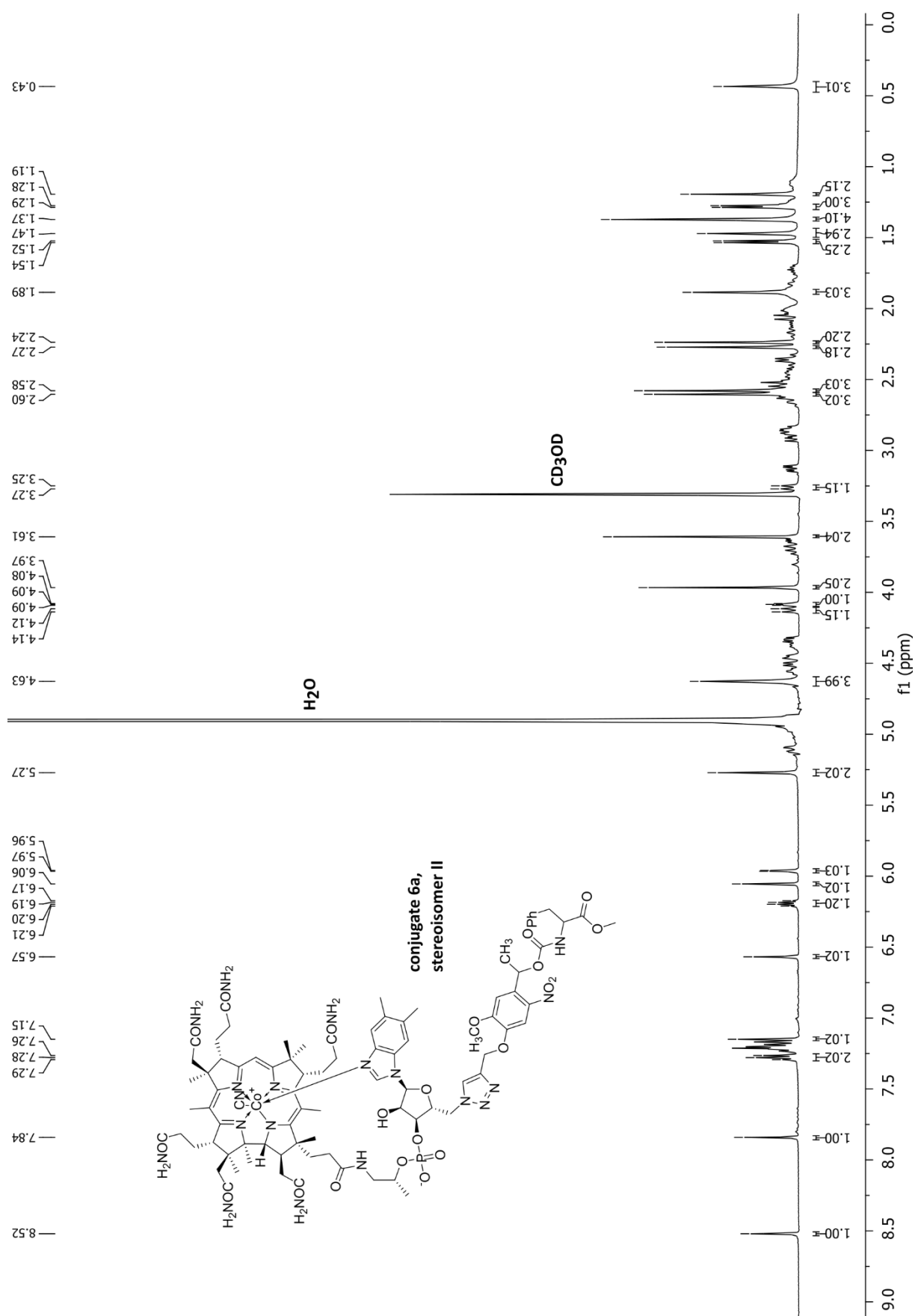


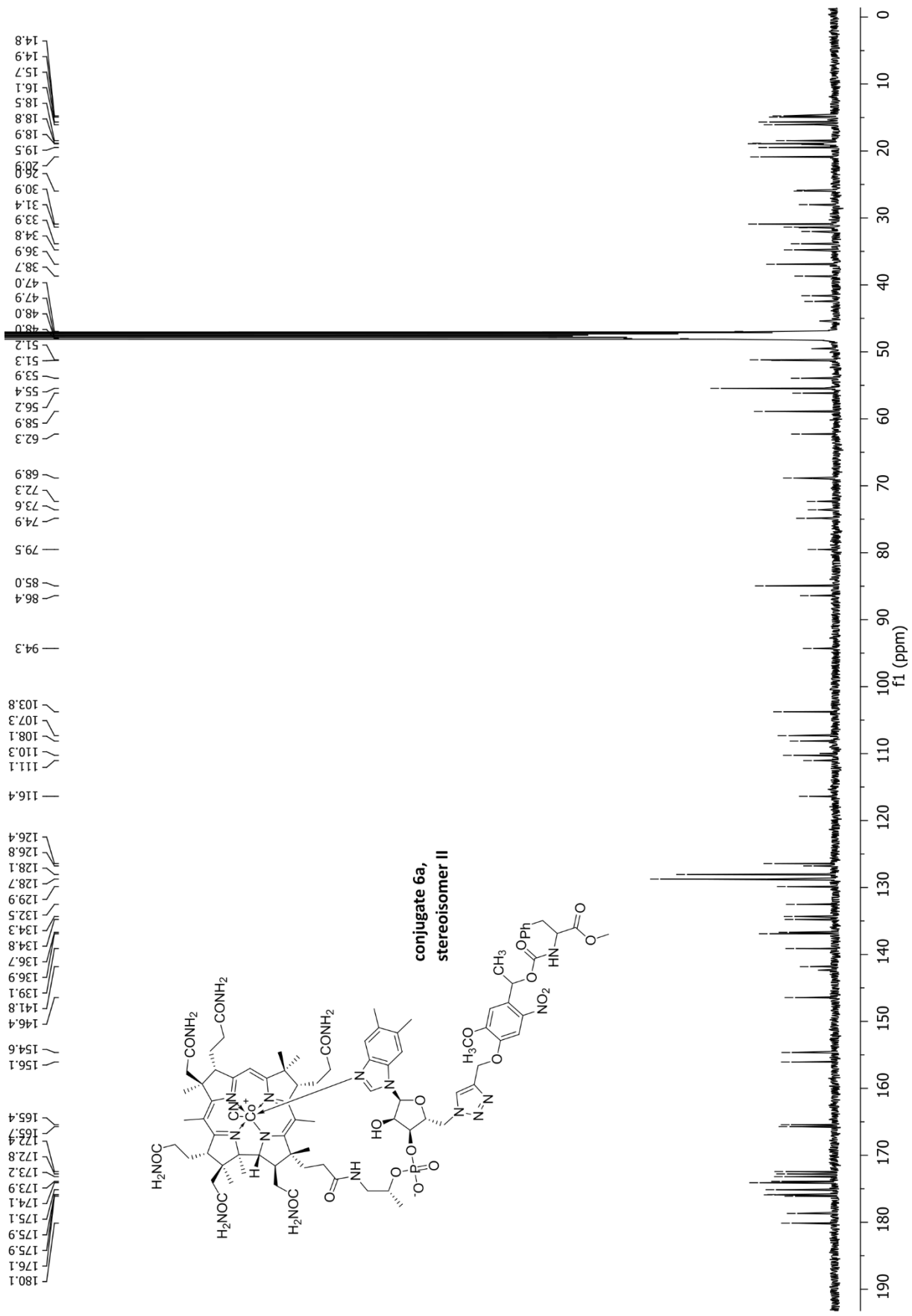
9.3. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound 6a, stereoisomer I in CD_3OD
 (for clarity only well isolated signals are integrated)



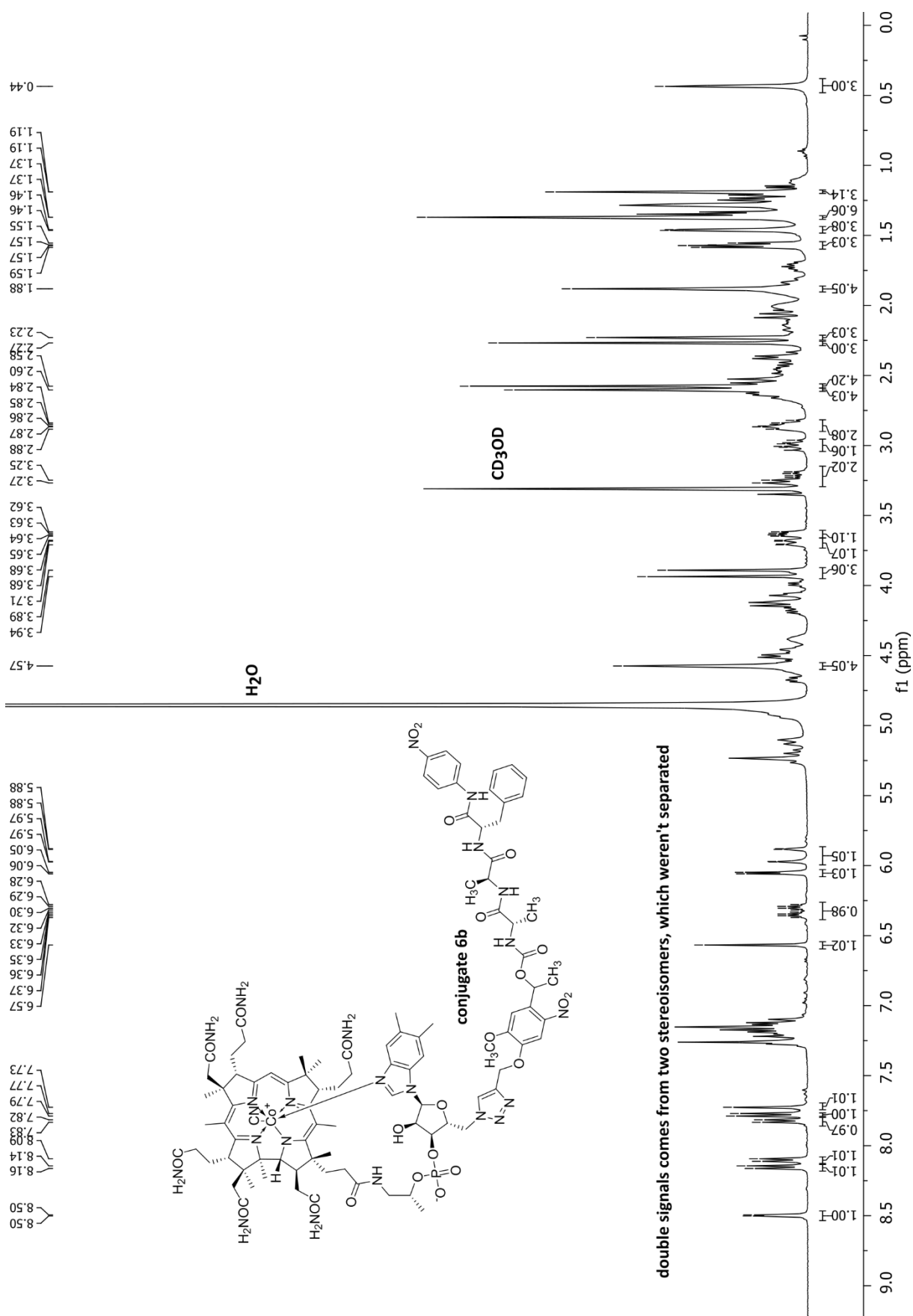


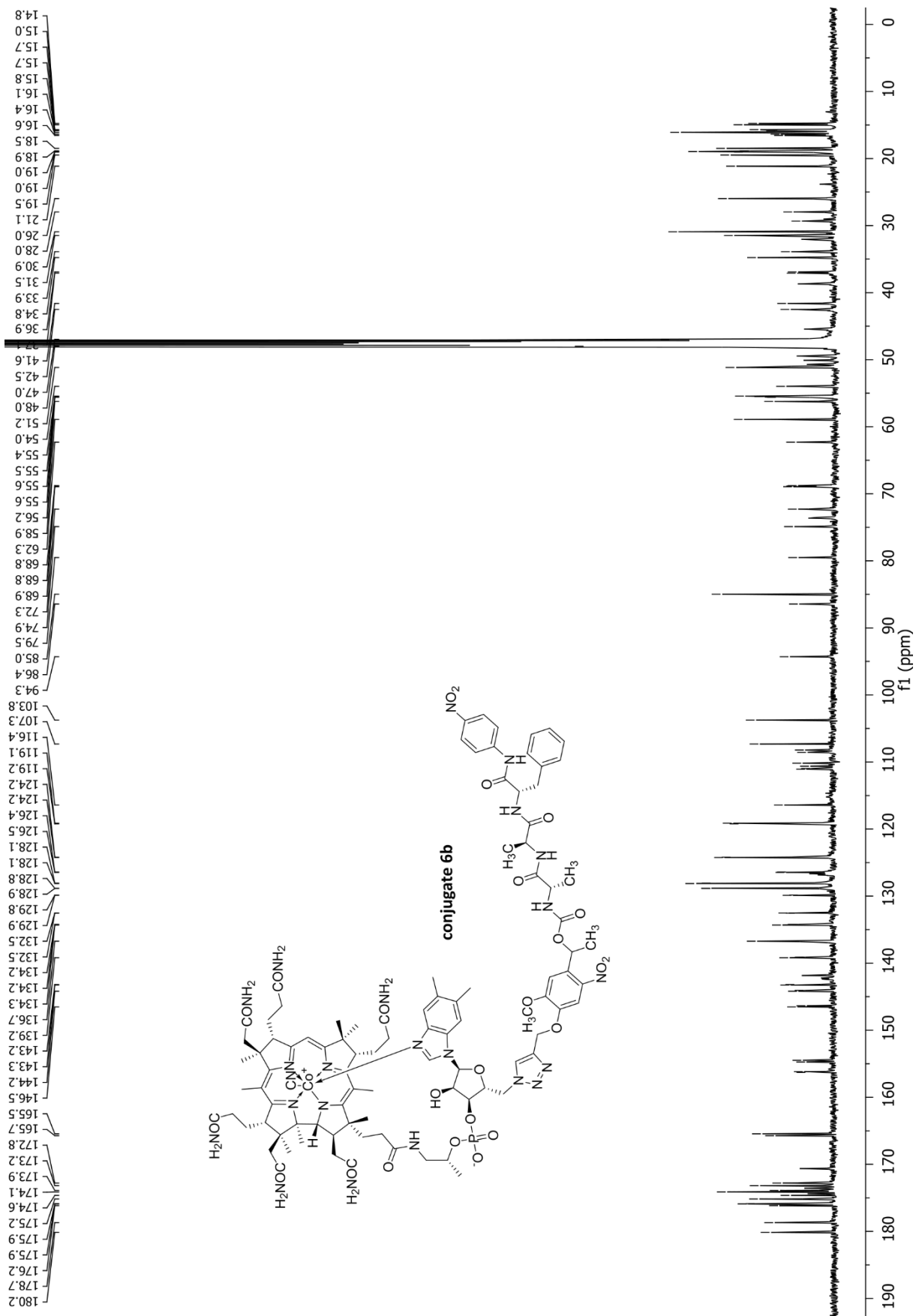
^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound 6a, stereoisomer II in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)



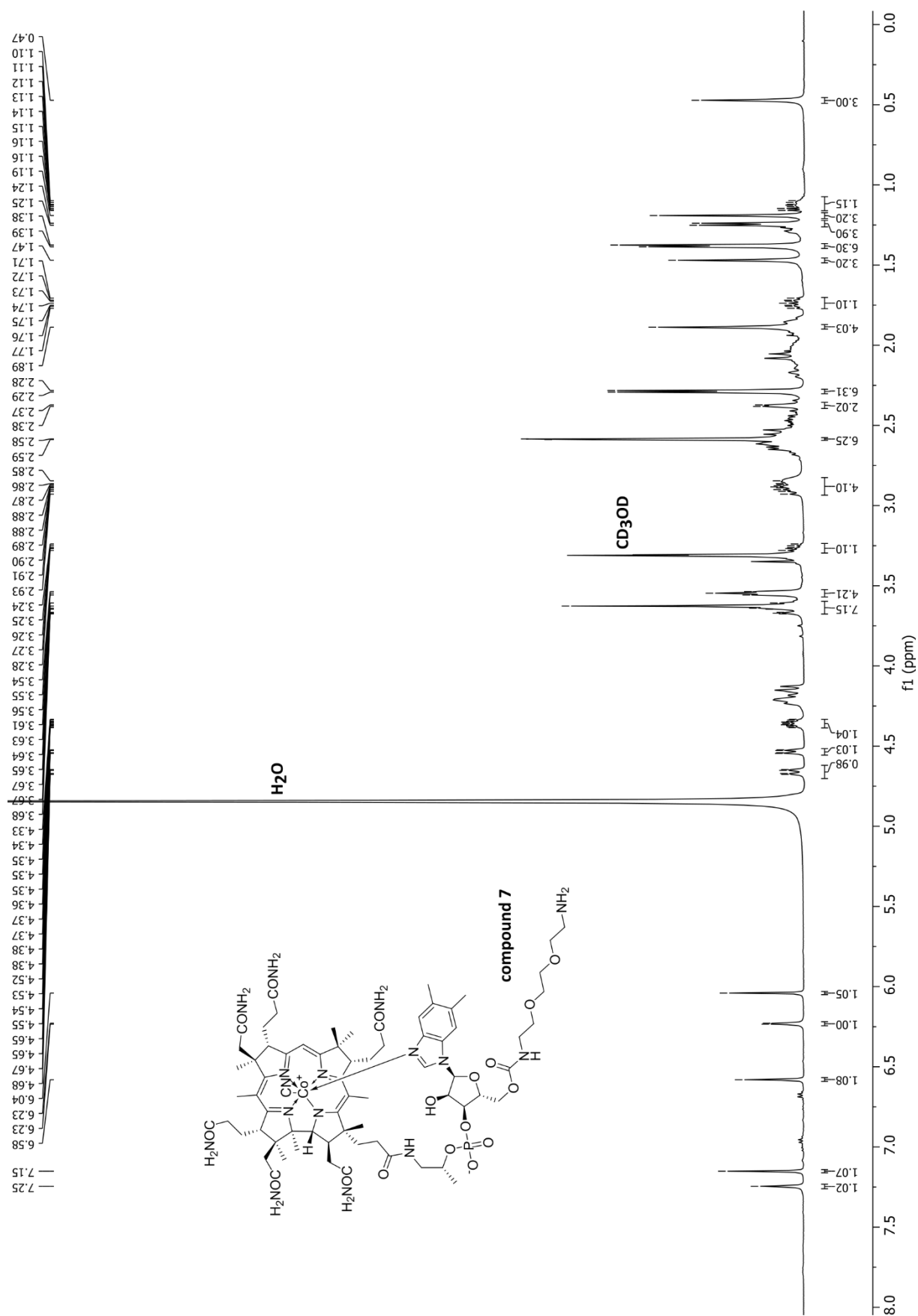


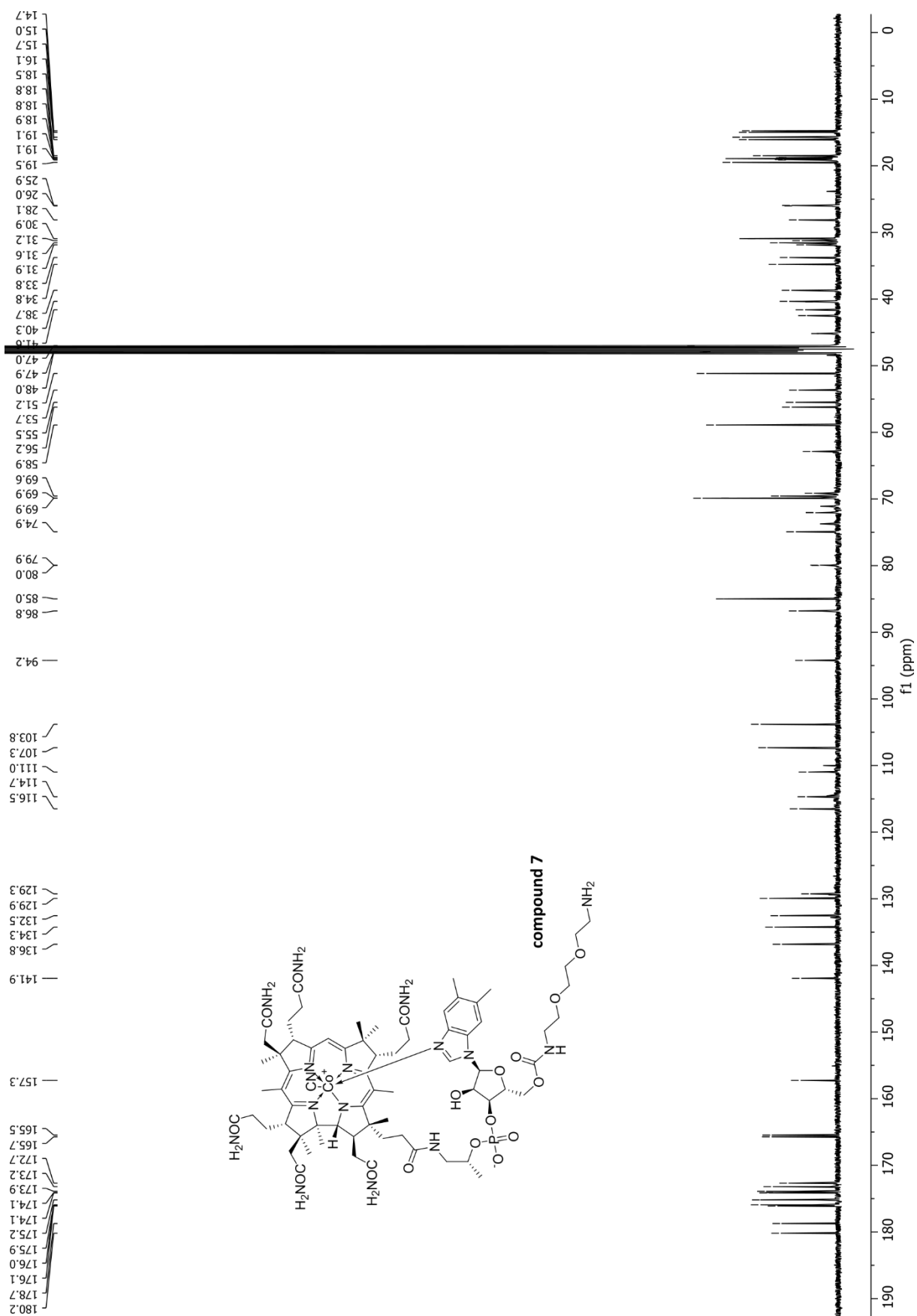
9.4. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound 6b in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)



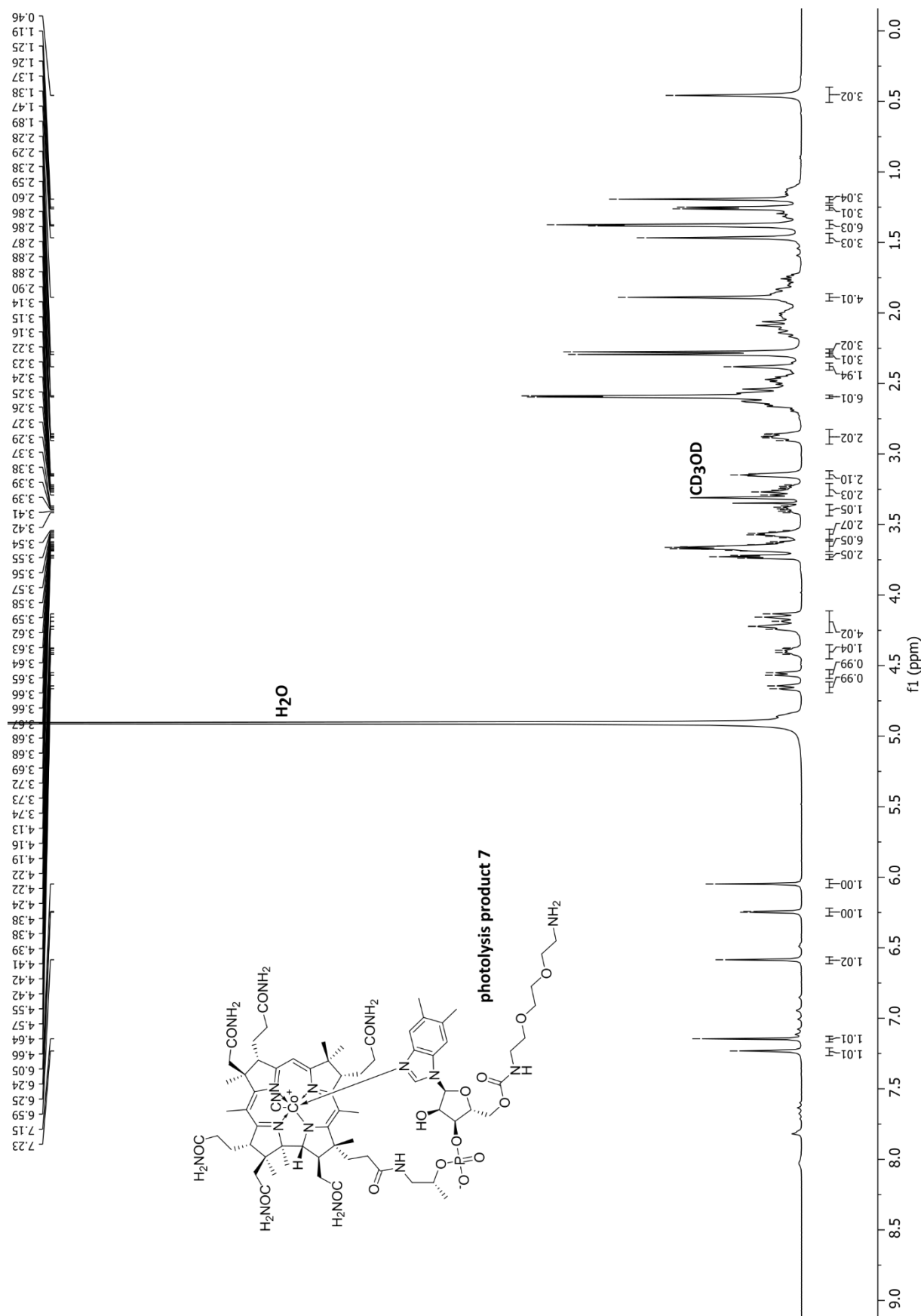


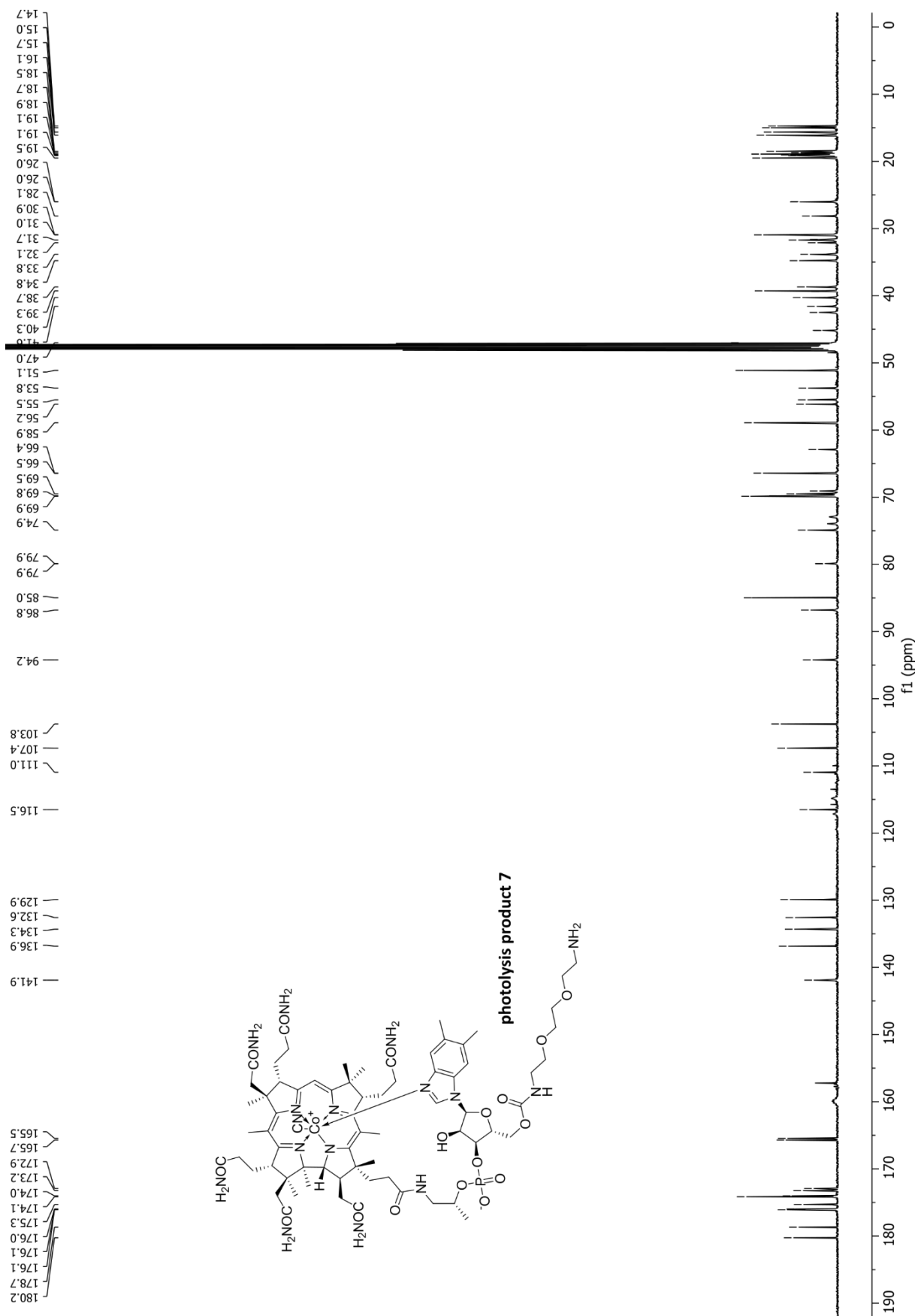
9.5. ¹H NMR (500 MHz) and ¹³C NMR (126 MHz) of compound 7 in CD₃OD (for clarity only well isolated signals are integrated)



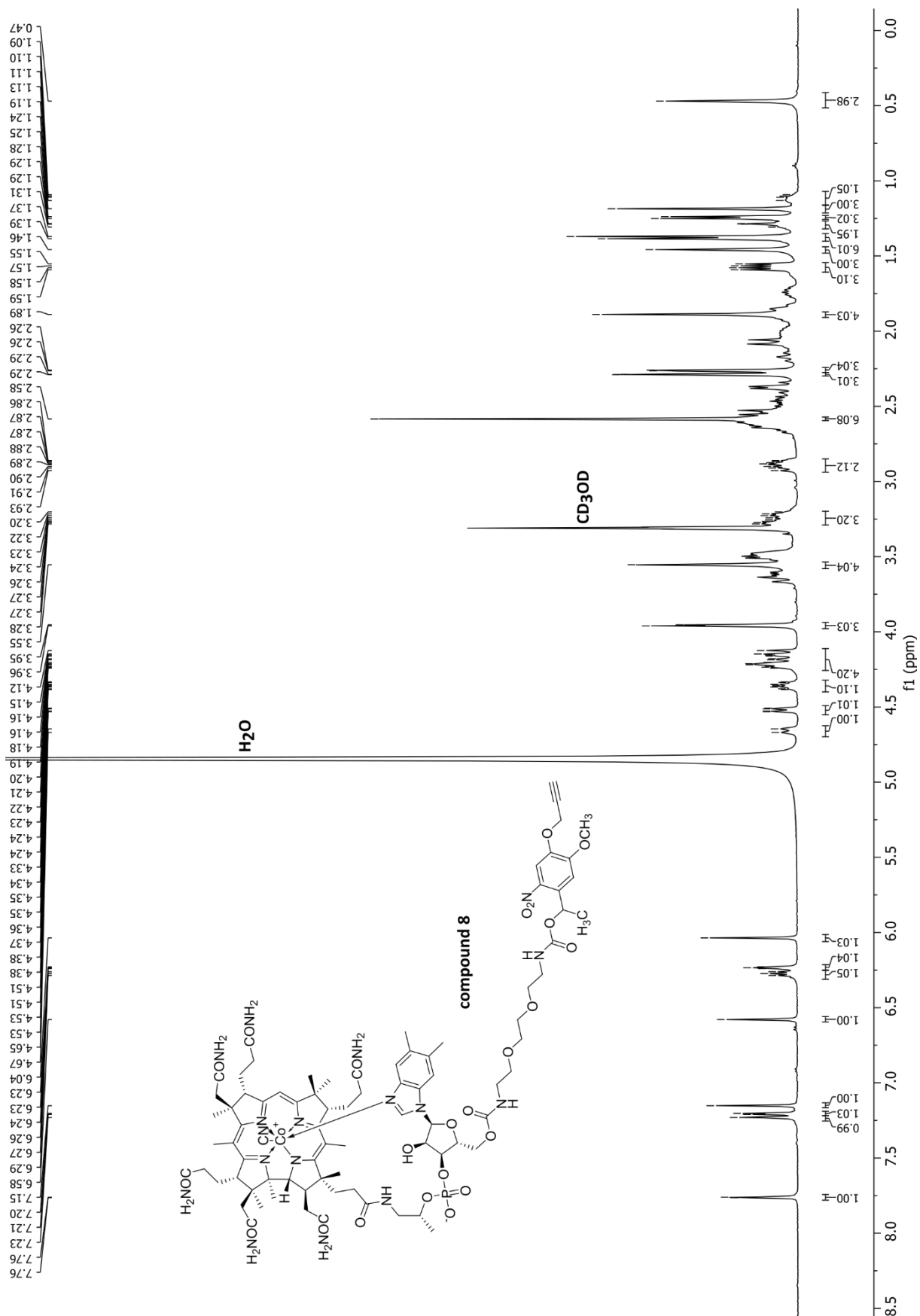


9.6. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound 7 (isolated after photo-release) in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)

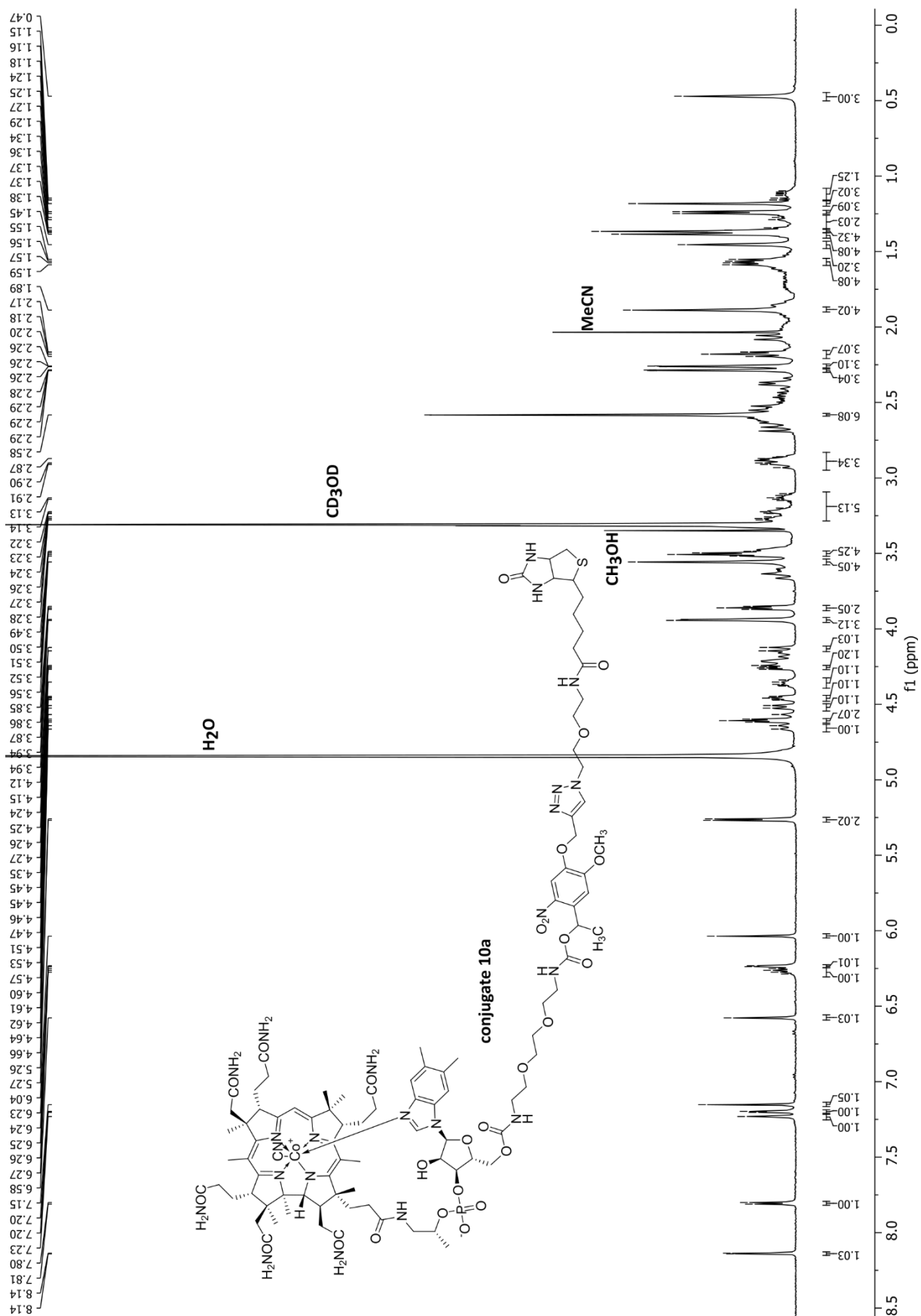


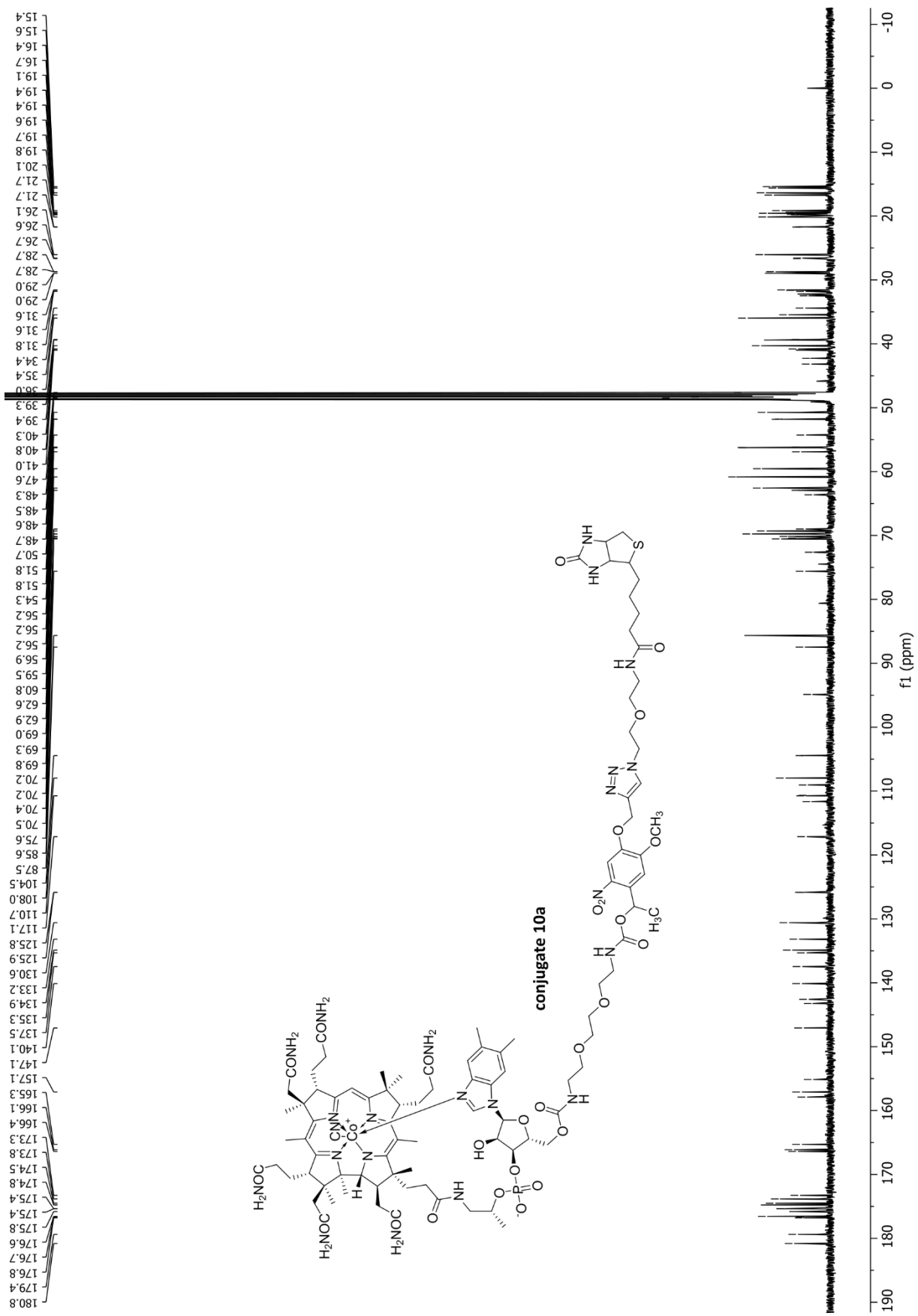


9.7. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound 8 in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)

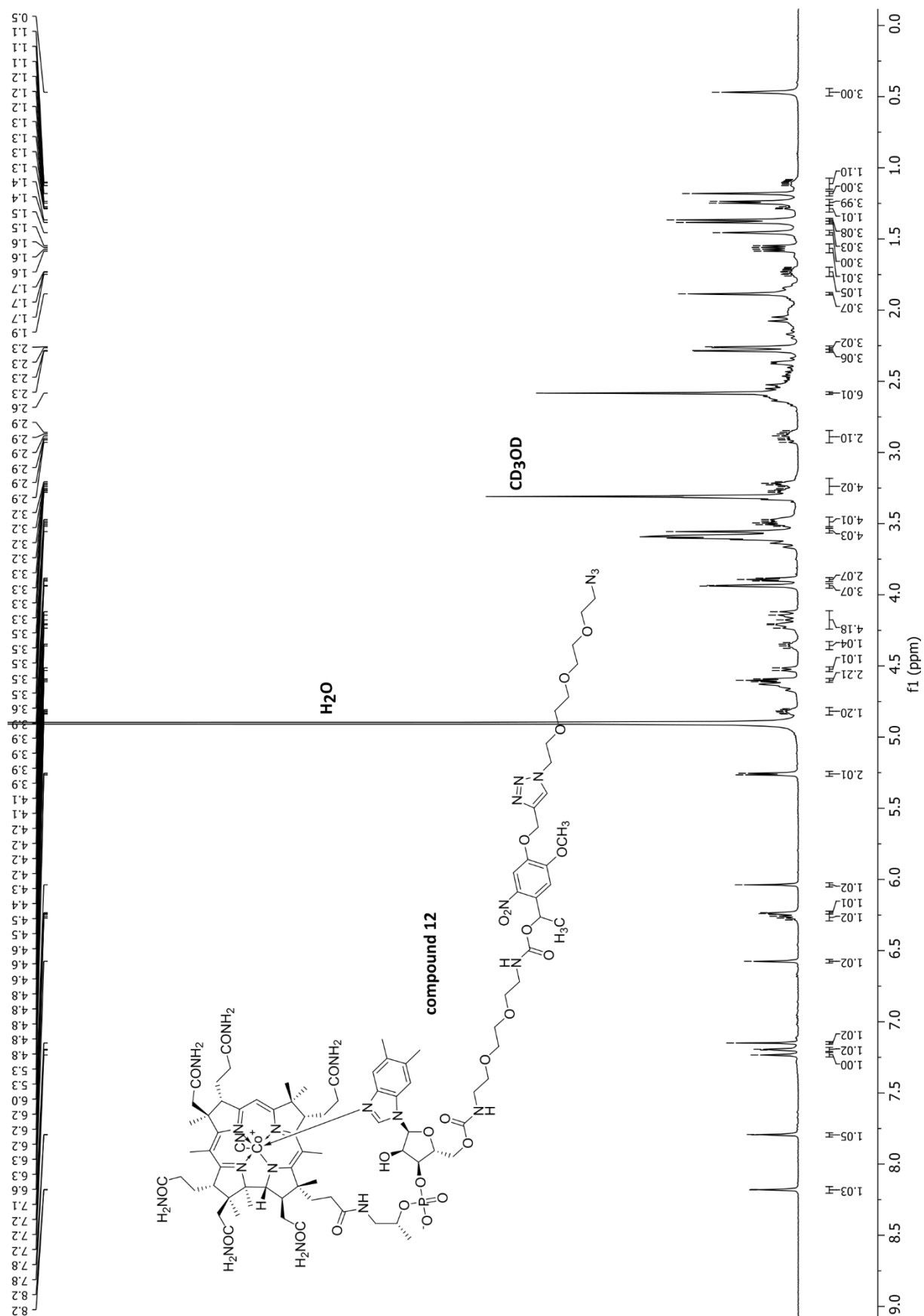


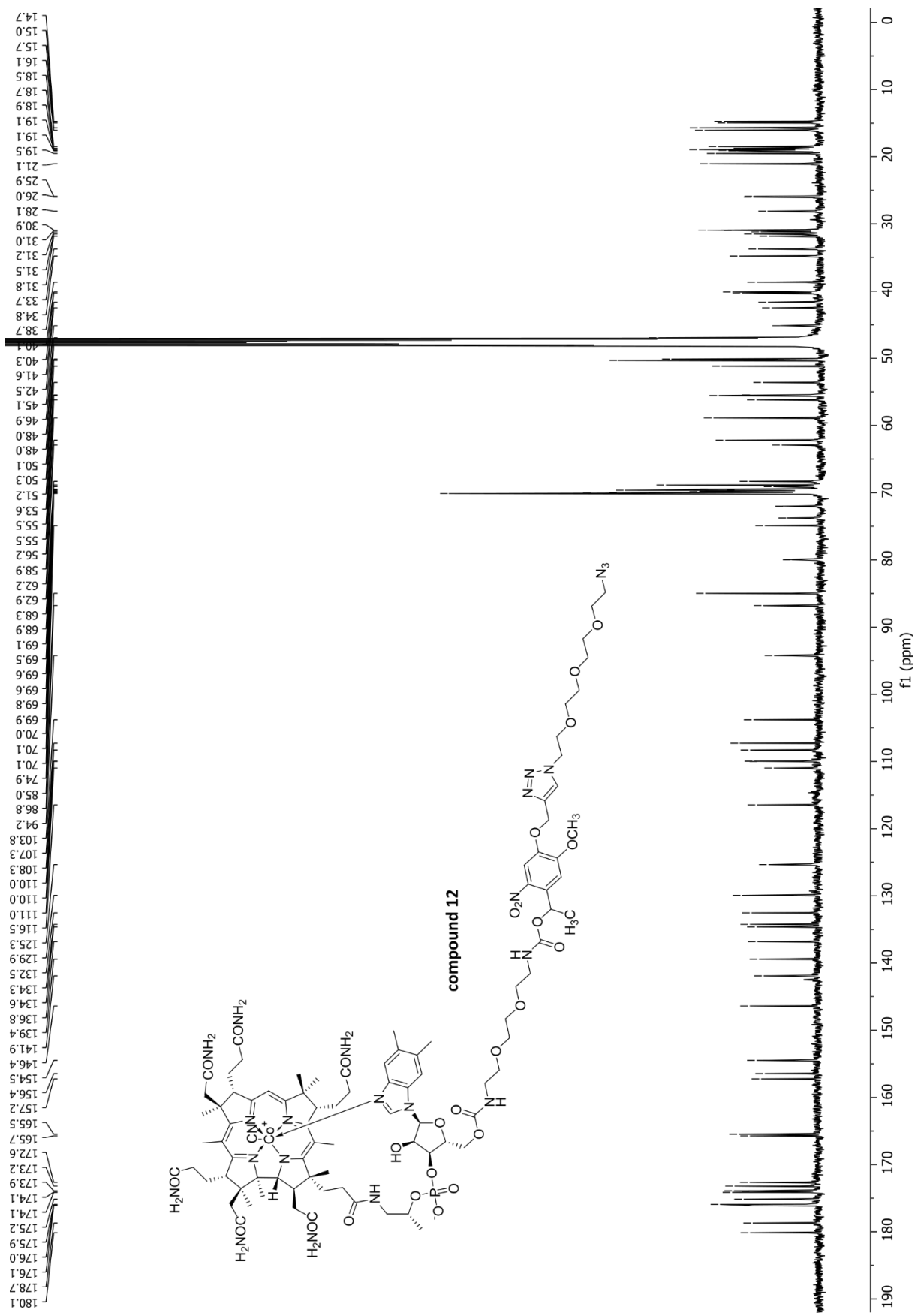
9.8. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound 10a in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)





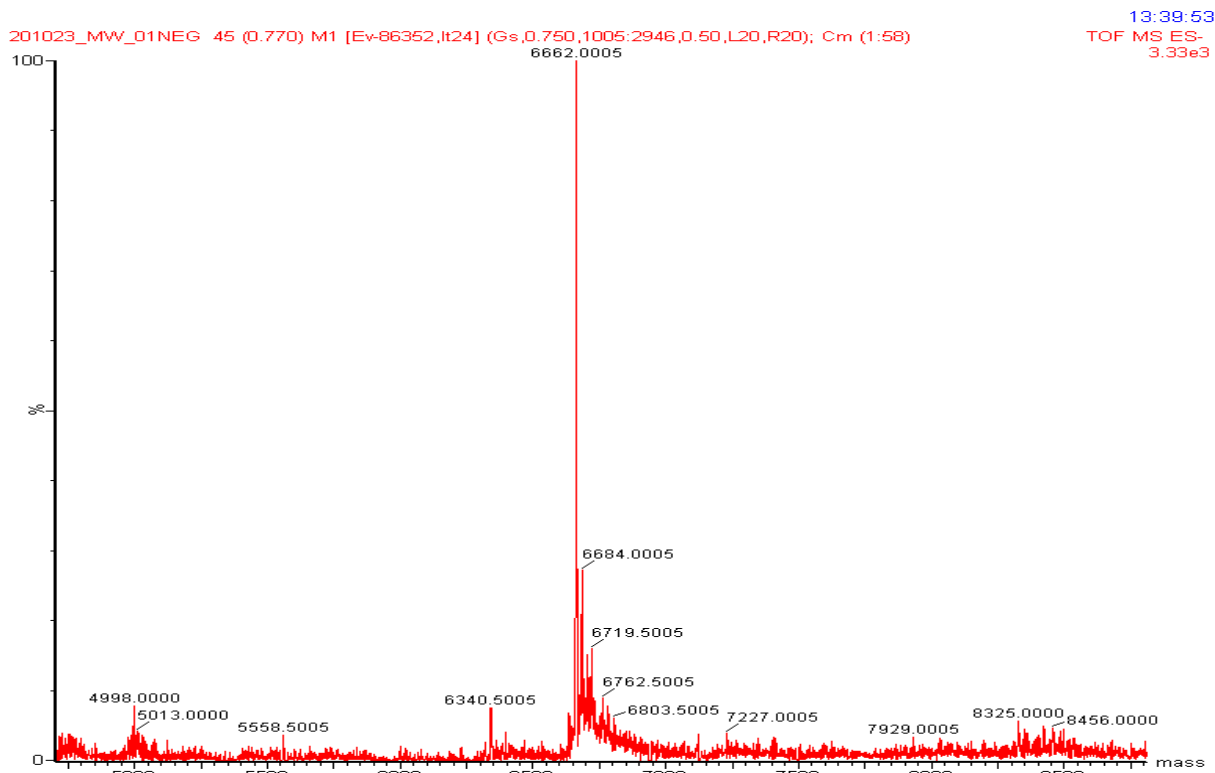
9.9. ^1H NMR (500 MHz) and ^{13}C NMR (126 MHz) of compound 12 in CD_3OD (for clarity only well isolated signals are integrated)





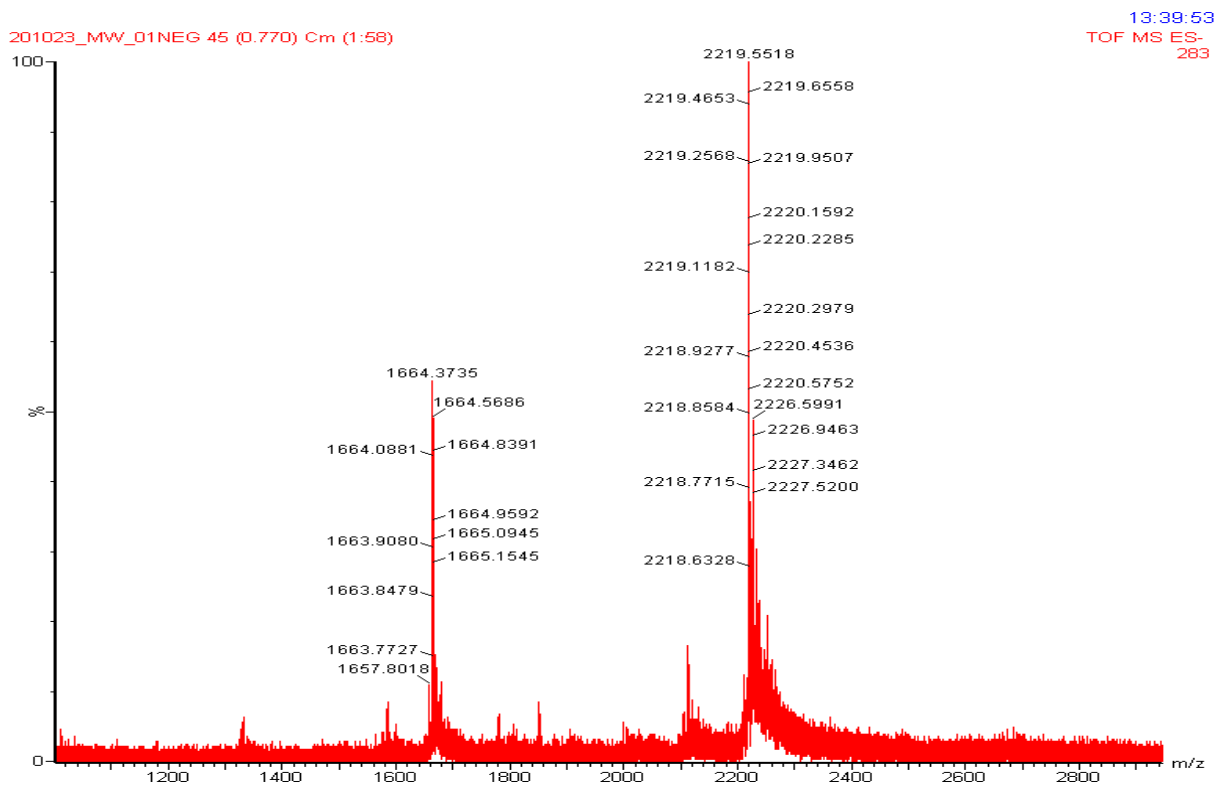
10. MS SPECTRA OF BIOCONJUGATE 10B

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{237}H_{314}N_{65}O_{129}P_{15}Co$ [M - H]⁻: 6657.5500, found 6662.0005.



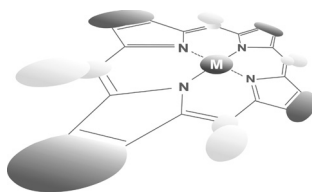
HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{237}H_{312}N_{65}O_{129}P_{15}Co$ [M - 3H]³⁻: 2218.5167, found 2219.5518.

HRMS (ESI) m/z calcd for $C_{237}H_{311}N_{65}O_{129}P_{15}Co$ [M - 4H]⁴⁻: 1663.6375, found 1664.3735.



11. REFERENCES

- (1) Mizuta, H.; Watanabe, S.; Sakurai, Y.; Nishiyama, K.; Furuta, T.; Kobayashi, Y.; Iwamura, M. Design, synthesis, photochemical properties and cytotoxic activities of water-Soluble caged L-Leucyl-L-leucine methyl esters that control apoptosis of immune cells. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 675–683.
- (2) Kaneko, S.; Nakayama, H.; Yoshino, Y.; Fushimi, D.; Yamaguchi, K.; Horiike, Y.; Nakanishi, J. Photocontrol of cell adhesion on amino-bearing surfaces by reversible conjugation of poly(ethylene glycol) via a photocleavable linker. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 4051–4059.
- (3) Wegner, S. V.; Sentürk, O. I.; Spatz J. P. Photocleavable linker for the patterning of bioactive molecules. *Sci. Rep.* **2016**, *5*, 18309.



Truncated vitamin B₁₂ derivative with the phosphate group retained

Sidra Hassan, Agnieszka Jackowska and Dorota Gryko*[◇]

Institute of Organic Chemistry Polish Academy of Sciences, Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland

This paper is part of the 2019 Women in Porphyrin Science special issue.

Received 17 December 2018

Accepted 14 March 2019

ABSTRACT: Cobyric acid and cobinamide are valuable building blocks for the synthesis of artificial cobalamins modified at the nucleotide loop. However, truncated vitamin B₁₂ derivatives are devoid of the phosphate group. We have found that 2-iodoxy benzoic acid-mediated phosphorolysis leads to the cleavage of only one of the phosphodiester bond giving a vitamin B₁₂ analogue with the phosphate moiety preserved. Subsequent alkylation with an organic halide establishes its role as a precursor for the synthesis of vitamin B₁₂ mimics modified at the nucleotide loop.

KEYWORDS: vitamin B₁₂, IBX, incomplete corrinoids, nucleotide loop, phosphorolysis, artificial cobalamins.

INTRODUCTION

Vitamin B₁₂ (**1**, Fig. 1), also referred to as cobalamin or cyanocobalamin (abbreviated as (CN)Cbl when L_β = CN), possesses a remarkably complex structure, sometimes even described as “frightening”. Nonetheless, it is of immense interest to chemists due to its unique biological functions and as such, in addition to being the vitamin, it has been studied as: (a) a transporter of biologically important molecules into cells [1], (b) an antivitamin [2], (c) a catalyst [3], and (d) a probe [4].

Recently, a lot of attention has been devoted to antivitamin, which are defined as compounds that prevent a vitamin from exerting its typical biologic effects. In other words, B₁₂ antivitamin are close analogues of vitamin B₁₂ that are recognized by transporting proteins but do not convert into active B₁₂ cofactors. Most B₁₂ antivitamin fall into one of two categories: organometallic derivatives or cobalamins with various linkers appended instead of the nucleotide loop. To this end, Kräutler’s group developed

organometallic cobalamins bearing strongly coordinating ligands at the β-face of the macrocycle [5–8]. Phenyl and acetylide cobalamins are taken up by cells and suppress B₁₂-dependent enzymes [8]. On the other hand, Zelder *et al.* prepared structurally related artificial cobalamins by introducing a peptide linker in place of the α-ribazole-phosphodiester backbone (a collective term used for α-ribofuranosyl-5,6-dimethyl benzimidazole moiety) [9–12]. Dicyano cobyrinic acid (**2**, L_α = CN) was coupled with peptide building blocks bearing the DMBZ moiety to give derivatives of vitamin B₁₂ that bind to transporting proteins and exhibit reduced catalytic efficacy [12]. The same precursor was used for the synthesis of mimics in which the isopropanol amide unit was replaced by ethanolamide [13] or *n*-propanolamide [14]. Toraya *et al.* studied the coenzymic role of adenosyl cobalamins (Ado)Cbl (where L_β = adenosyl) possessing a modified nucleotide loop [15–19] and microbial growth activities [20]. These compounds were prepared from cobinamide (**3**, Cbi).

Because of the synthetic availability, incomplete corrinoids **2** and **3** were used as precursors for the synthesis of vitamin B₁₂ mimics adequately tailored for specific purposes. In fact, all artificial cobalamins modified at the α-face were prepared starting from either dicyano cobyrinic acid (**2**) or cobinamide (**3**); as a

[◇] SPP full member in good standing

*Correspondence to: Dorota Gryko, Institute of Organic Chemistry Polish Academy of Sciences, Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland, tel.: +48 22 343 2051, fax: +48 22 632 66 81, email: dorota.gryko@icho.edu.pl.

Truncated vitamin B₁₂ derivative with the phosphate group retained

Sidra Hassan, Agnieszka Jackowska, Dorota Gryko

Institute of Organic Chemistry, Polish Academy of Science, Kasprzaka 44/52, 01-224 Warsaw, Poland

Contents

Table S1.	Optimization studies for the synthesis of analogue 4	2
Table S2.	Optimization studies of the phosphate alkylation reaction	3
Fig. S1.	General numbering pattern for compounds 4 and 9	4
Fig. S2.	UV-Vis spectra of (CN)Cbl 1 , cobinamide (Cbi) 3 , phosphate analogue 4 and pyridinyl derivative of phosphate analogue 9	5
Fig. S3.	HPLC Analyses of compound 4	6
Fig. S4.	¹ H NMR of compound 4 in CD ₃ OD.....	7
Fig. S5.	¹³ C NMR of compound 4 in CD ₃ OD... ..	8
Fig. S6.	COSY NMR of compound 4 in CD ₃ OD.....	9
Fig. S7.	HSQC NMR of compound 4 in CD ₃ OD... ..	10
Fig. S8.	³¹ P NMR of compound 4 in CD ₃ OD.....	11
Fig. S9.	¹³ C NMR of compound 4 in CD ₃ OD.....	12
Fig. S10.	³¹ P NMR of compound 4 in CD ₃ OD.....	13
Fig. S11.	HPLC Analyses of compound 9	14
Fig. S12.	¹ H NMR of compound 9 in CD ₃ OD.....	15

Table S1. Optimization studies the synthesis of phosphate analogue 4.

Entry	Reagents (equiv)	Additives (equiv)	Solvent/T °C/	Yield (%)
01	PIDA (1-3)	K ₂ CO ₃ (1-3)	MeCN:H ₂ O (1:1), 50 °C, 24 h	-
02	PIDA (1-3)	K ₂ CO ₃ (1-3), NaCN (1.0)	H ₂ O, 50 °C, 24 h or MW (60-100 °C), 20 min	-
03	PIDA (1-3)	K ₂ CO ₃ (1-3), NaCN (1.0)	DMSO, 50 °C, 24 h	-
04	IBA (5.0)	-	DMSO, 50 °C, 24 h	-
05	IBA (5.0)	NaCN (1.0)	DMSO, 50 °C, 24 h	-
06	IBA (5.0)	K ₂ CO ₃ (5.0)	DMSO, 50 °C, 24 h	-
07	IBA (5.0)	Pyridine (5.0)	DMSO, 50 °C, 24 h	-
08	IBA (5.0)	TMG (5.0)	DMSO, 50 °C, 24 h	-
09	ZnCl ₂ (2-4)	-	H ₂ O, 50 °C, 24 h	-
10	ZnCl ₂ (2-4)	EDA (2.0-4.0)	H ₂ O, 50 °C, 24 h	-

Conditions: (CN)Cbl **1** (10 mg, 0.075 mmol, 1.0 eq), respective solvent (1.0 mL).

Table S2. Optimization studies of phosphate alkylation reaction of truncated phosphate analogue **4**.

Entry	Base (equiv)	Solvent/T °C/	Yield (%) ^a
01	DIPEA (10.0)	NMP	28 ^{b,c}
02	DBU (2.5-5.0)	NMP	16 ^{b,d}
05	DIPEA (5.0)	NMP	34 ^{b,e}
03	DIPEA (5.0)	NMP	15 ^{b,f}
04	DIPEA (5.0)	NMP:DMA (1:1)	47 ^{b,c}
06	DIPEA (5.0-10)	DMSO	- ^{b,c}
07	K ₂ CO ₃ (5.0)	DMSO	- ^{b,c}

^aHPLC Yields, ^bReaction Scale: **3** (5 mg, 0.0044 mmol, 1.0 eq), **8** (5.0 eq), solvent (1.0 mL); ^c60 °C for 24 h; ^dMW, 20-30 min, 70-90 °C, ^eMW, 30 min, 100 °C. ^f40 °C, 24 h.

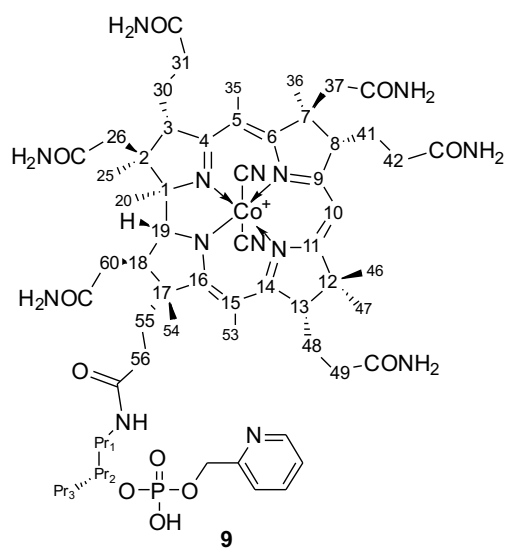
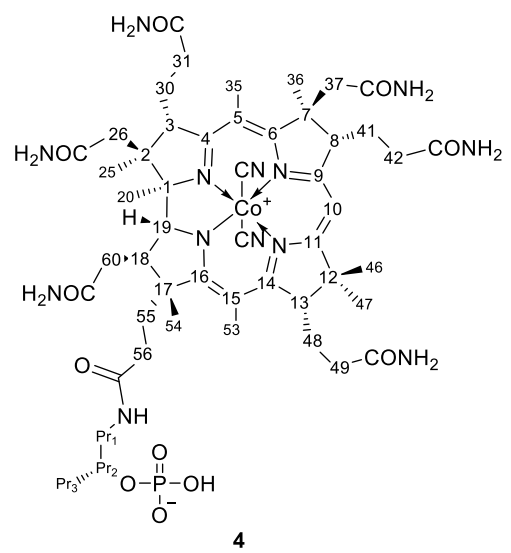


Fig. S1. General numbering pattern for compounds **4** and **9**

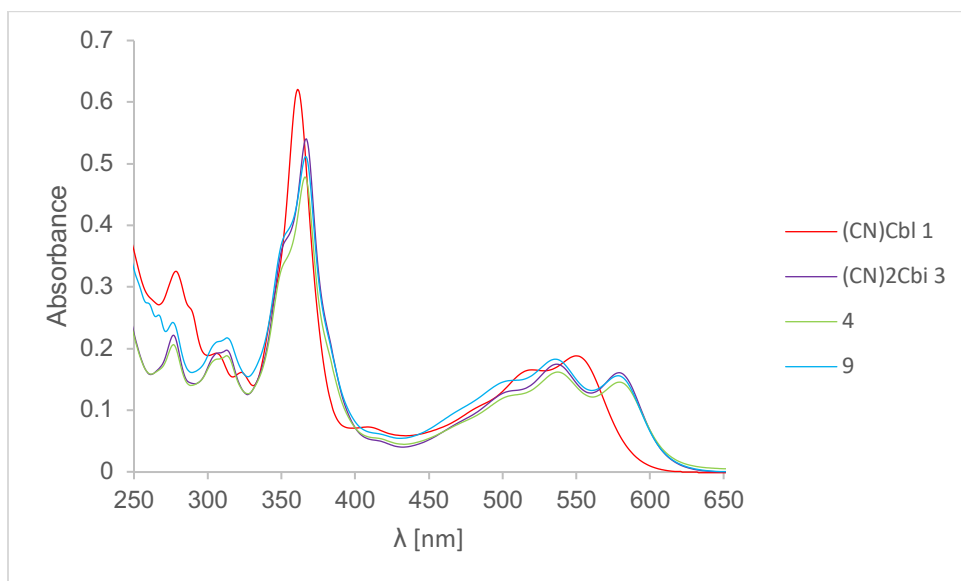


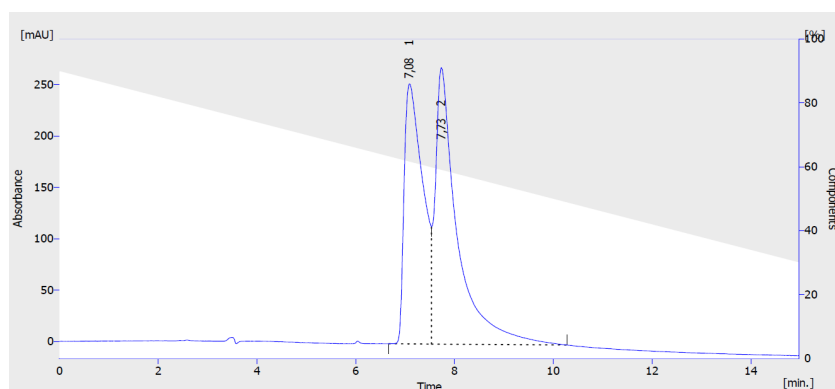
Fig. S2. UV-Vis spectra of (CN)Cbl **1**, (CN)₂Cbl **3**, phosphate analogue **4** and pyridinyl derivative of phosphate analogue **9**

HPLC Method

Time [min]	H ₂ O + 0.05% TFA [%]	MeCN [%]
Initial	90	10
15	30	70

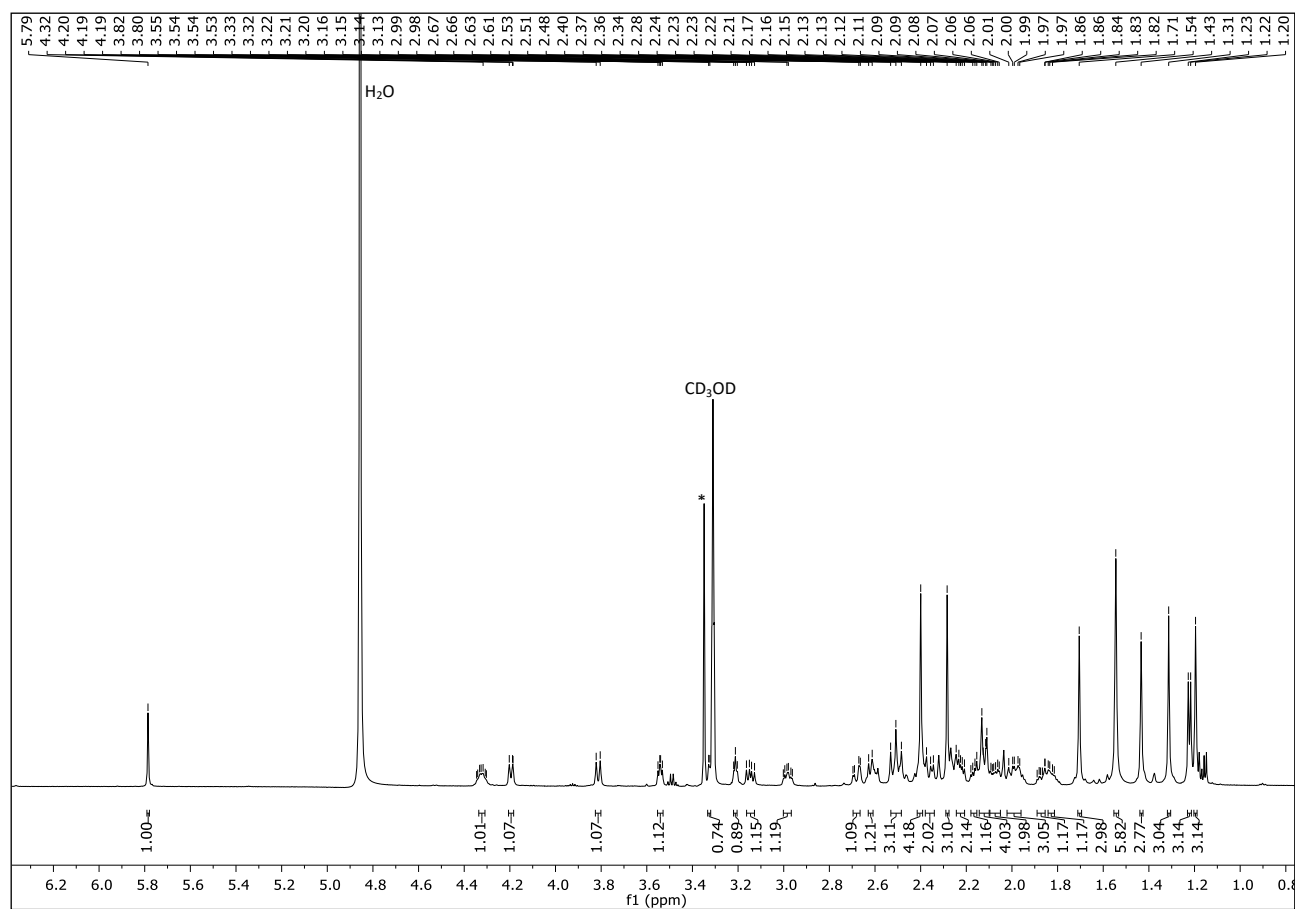
HPLC chromatogram of compound 4

Two signals at 7.08 min., and 7.73 min., are observed for dicyano pyridinyl derivative **4** due to the acidic conditions of the column.



	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	PDA Peak Purity
1	7,083	6609,105	253,343	43,9	48,5	0,52	926
2	7,733	8448,125	269,385	56,1	51,5	0,40	467
Total		15057,229	522,728	100,0	100,0		

Fig. S5. HPLC analyses for compound **4**. The following conditions were used for HPLC analysis: Column: Kromasil Eternity-5-C18, 4.6 × 250 mm; pressure – 16 MPa; flow rate 1 mL/min; room temperature; detection – UV/vis at wavelengths (λ) of 361 nm.



*Residual solvent peak

Fig. S6. ¹H NMR of compound **4** in CD₃OD

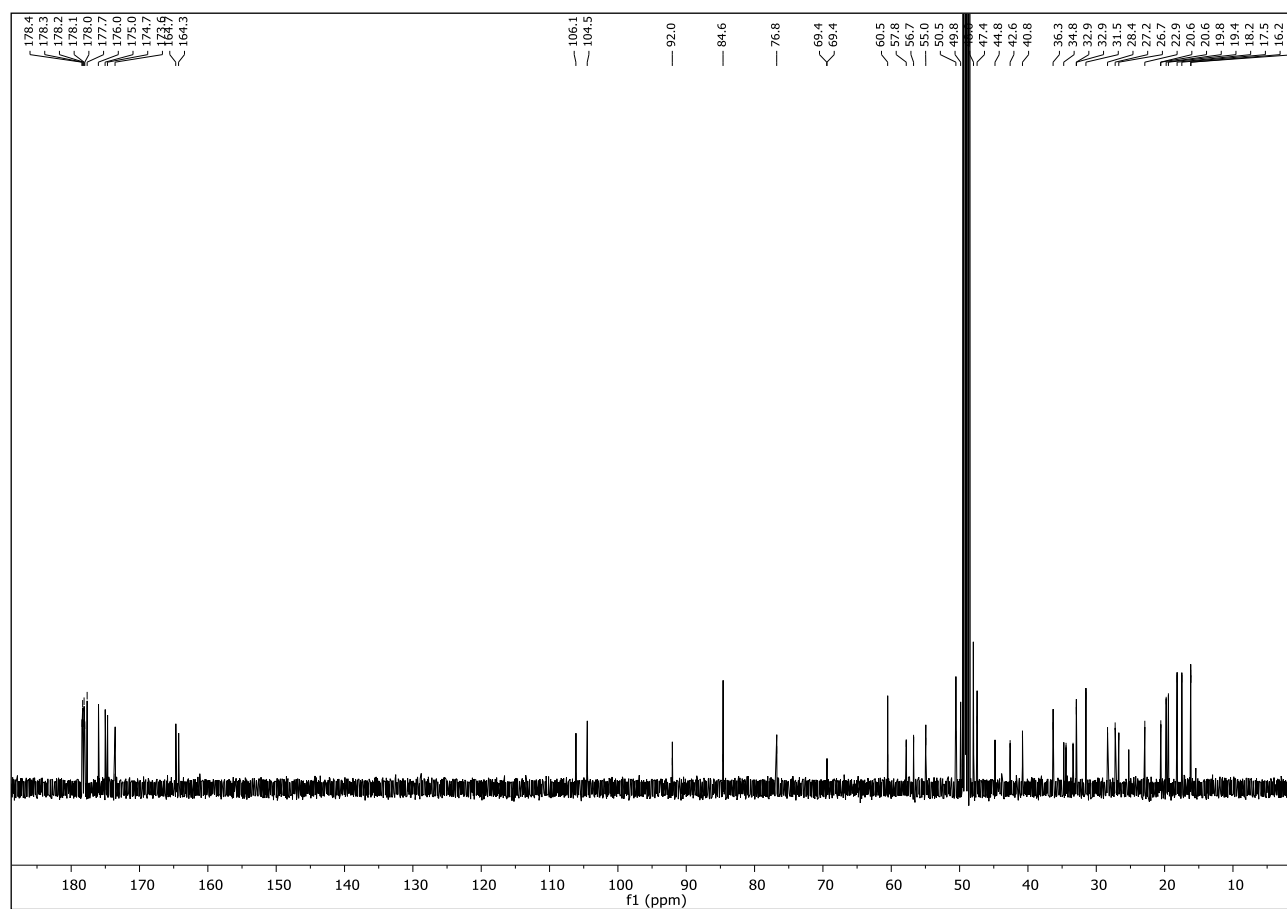


Fig. S7. ^{13}C NMR of compound 4 in CD_3OD

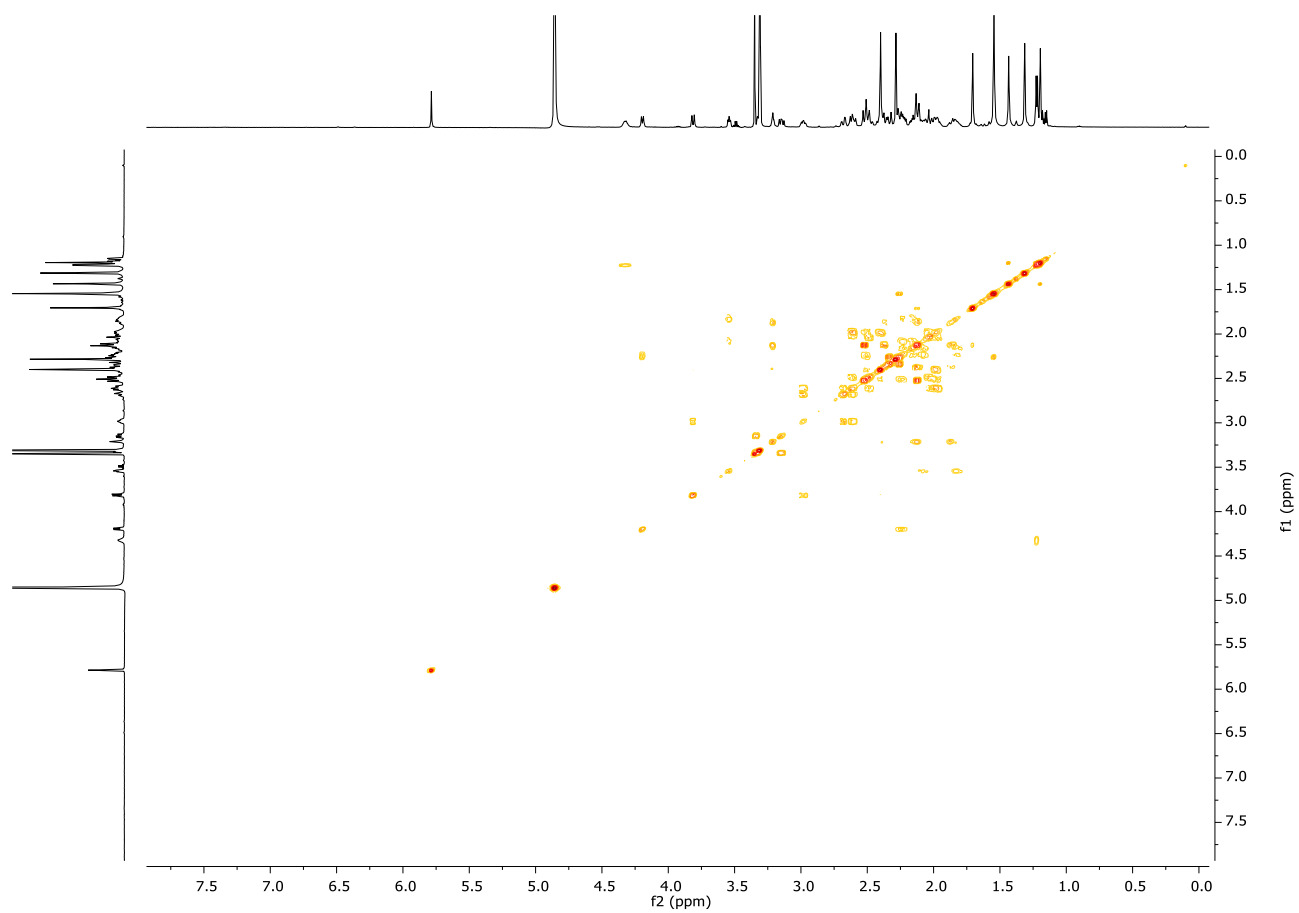


Fig. S8. COSY NMR of compound **4** in CD₃OD

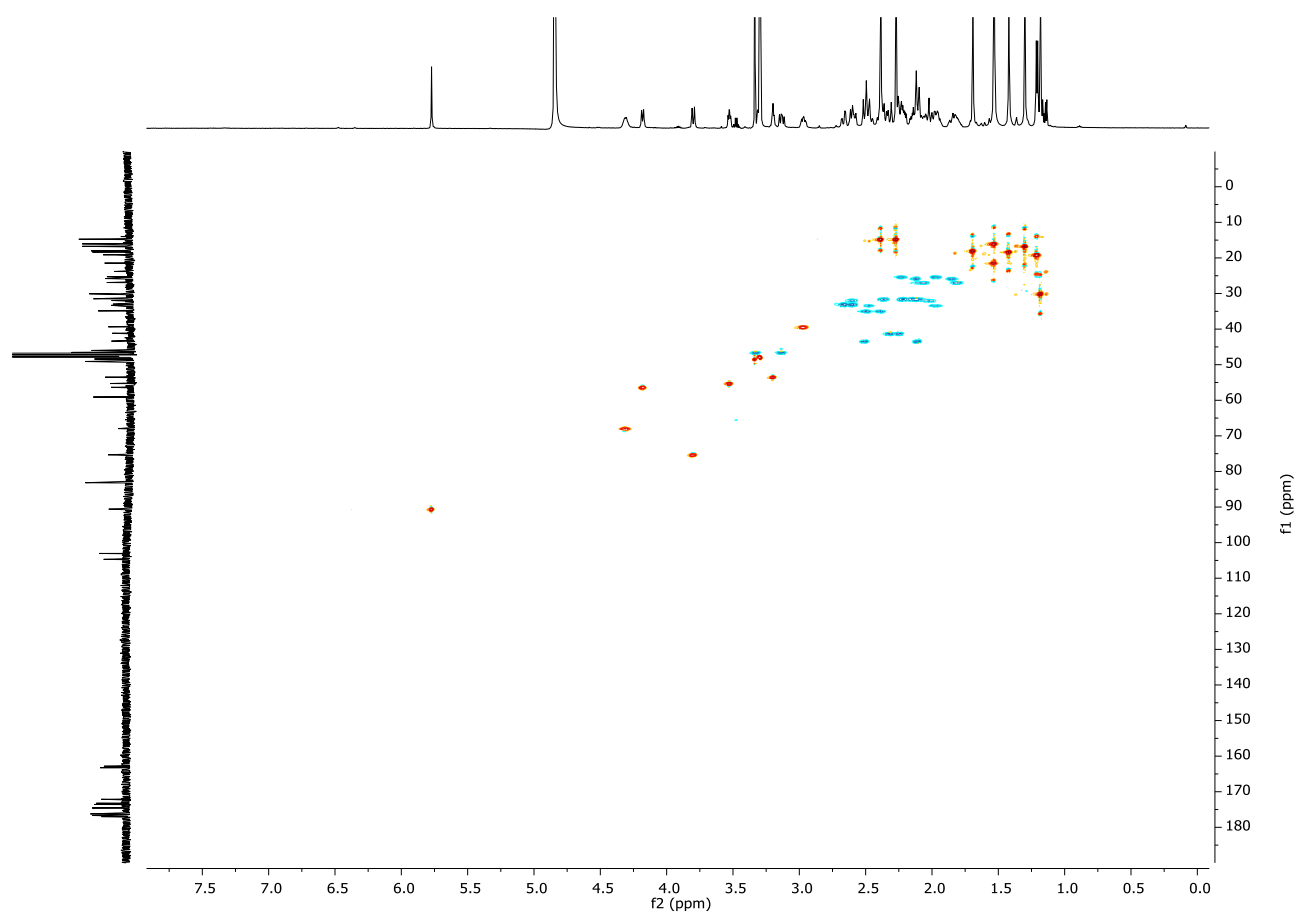


Fig. S9. HSQC NMR of compound 4 in CD₃OD

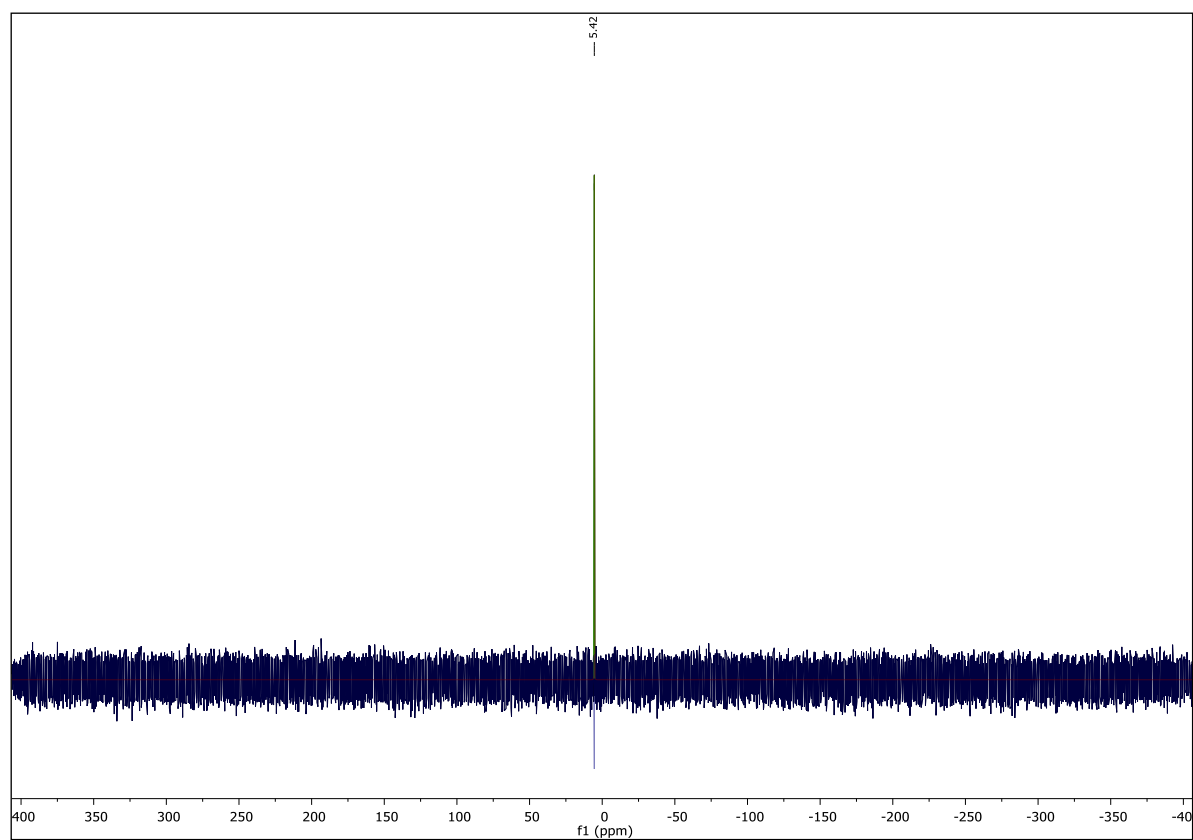


Fig. S10. ^{31}P NMR of compound **4** in CD₃OD

HPLC Method

Time [min]	H ₂ O + 0.02% TFA [%]	MeCN [%]
Initial	90	10
15	30	70

HPLC Chromatogram of 9

Two signals at 6.27 min., and 7.18 min., are observed for dicyano pyridinyl derivative **9** due to the acidic conditions of the column.

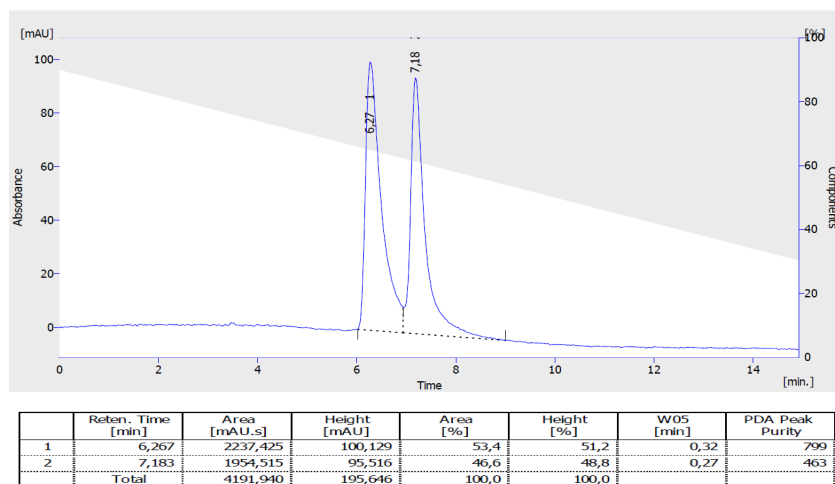
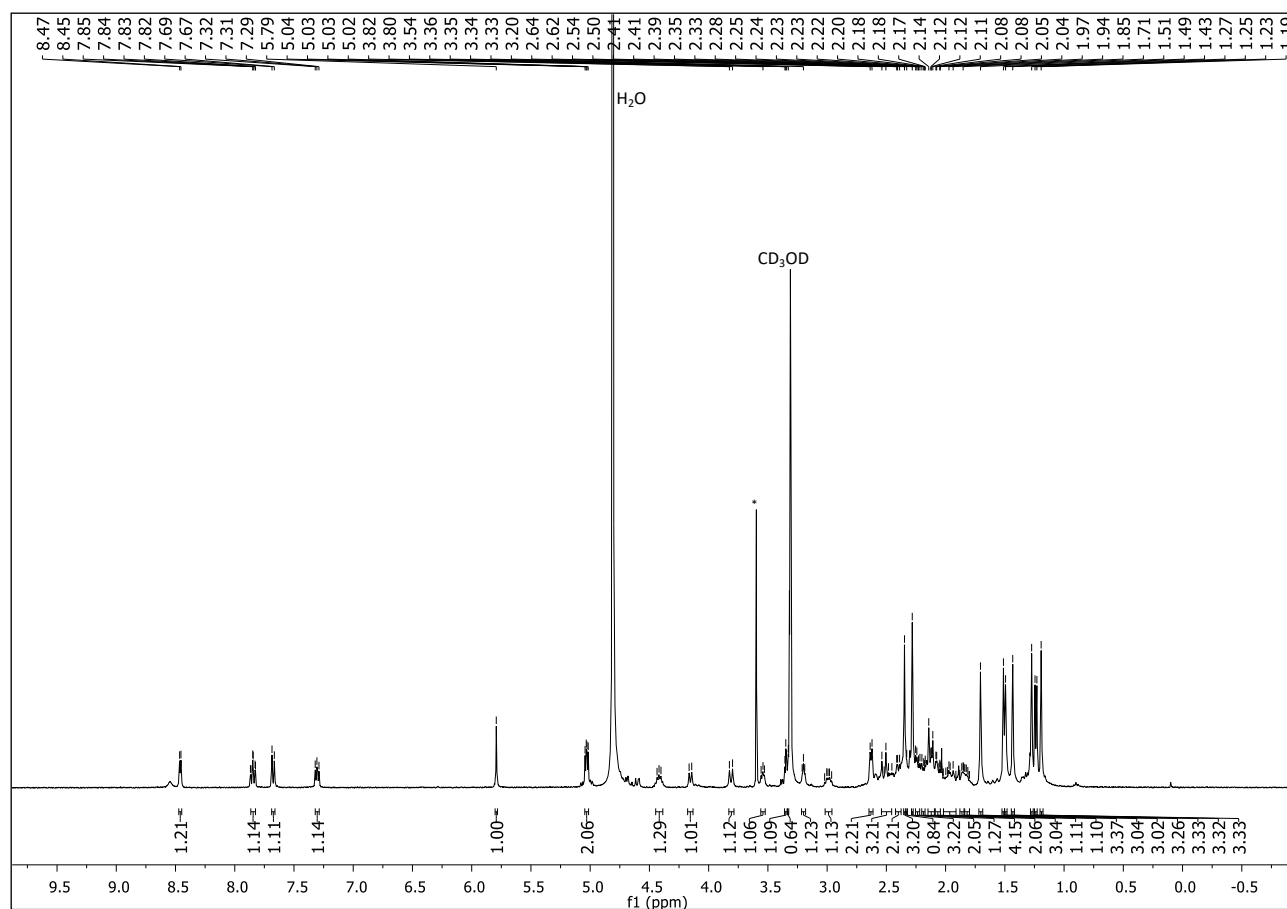


Fig. S11. HPLC analyses for pyridinyl derivative **9**. The following conditions were used for HPLC analysis: Column: Kromasil Eternity-5-C18, 4.6 × 250 mm; pressure – 16 MPa; flow rate 1 mL/min; room temperature; detection – UV/vis at wavelengths (λ) of 361 nm.



*Residual solvent peak

S12. ^1H NMR of compound **9** in CD_3OD

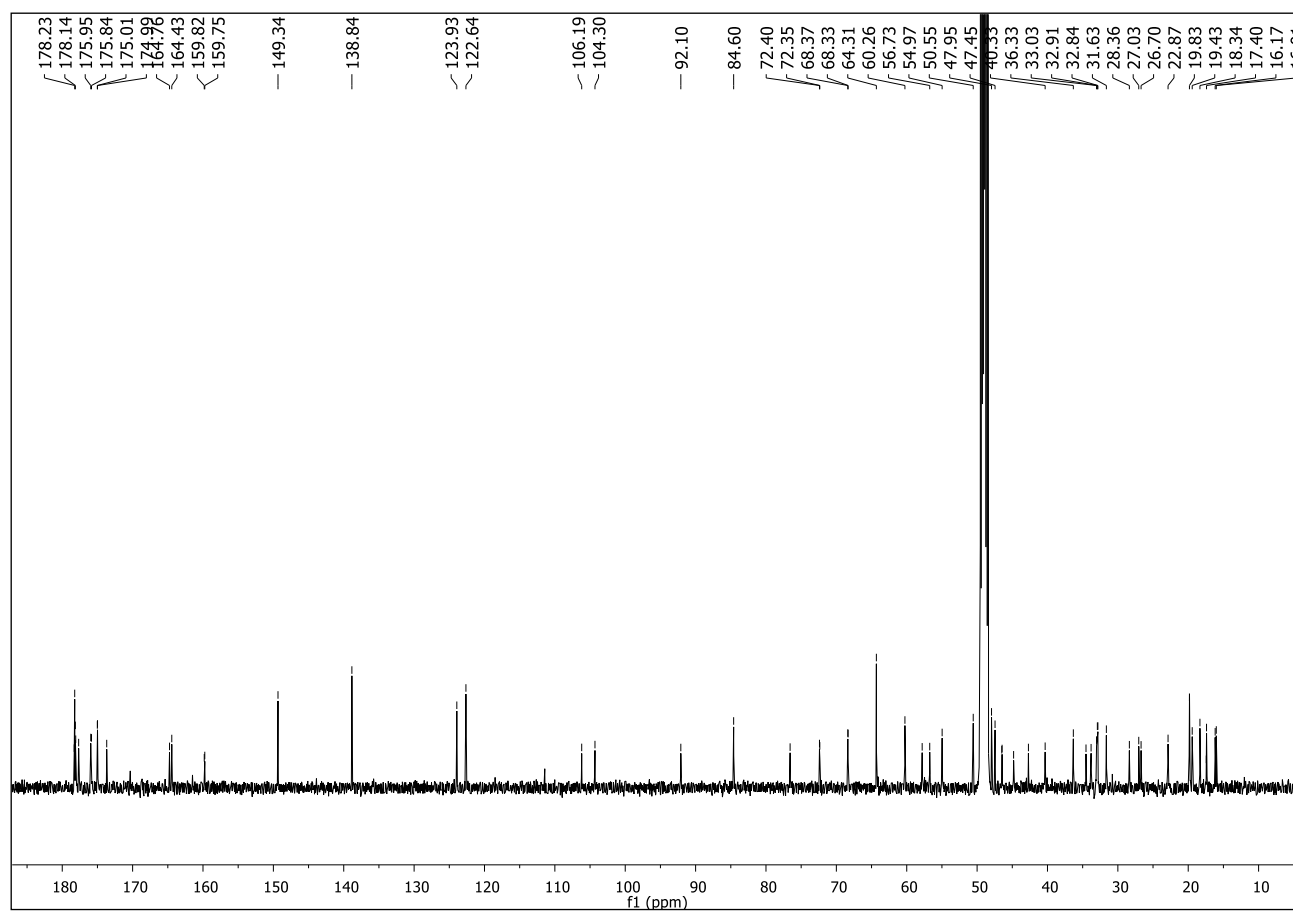


Fig. S13. ^{13}C NMR of compound **9** in CD_3OD

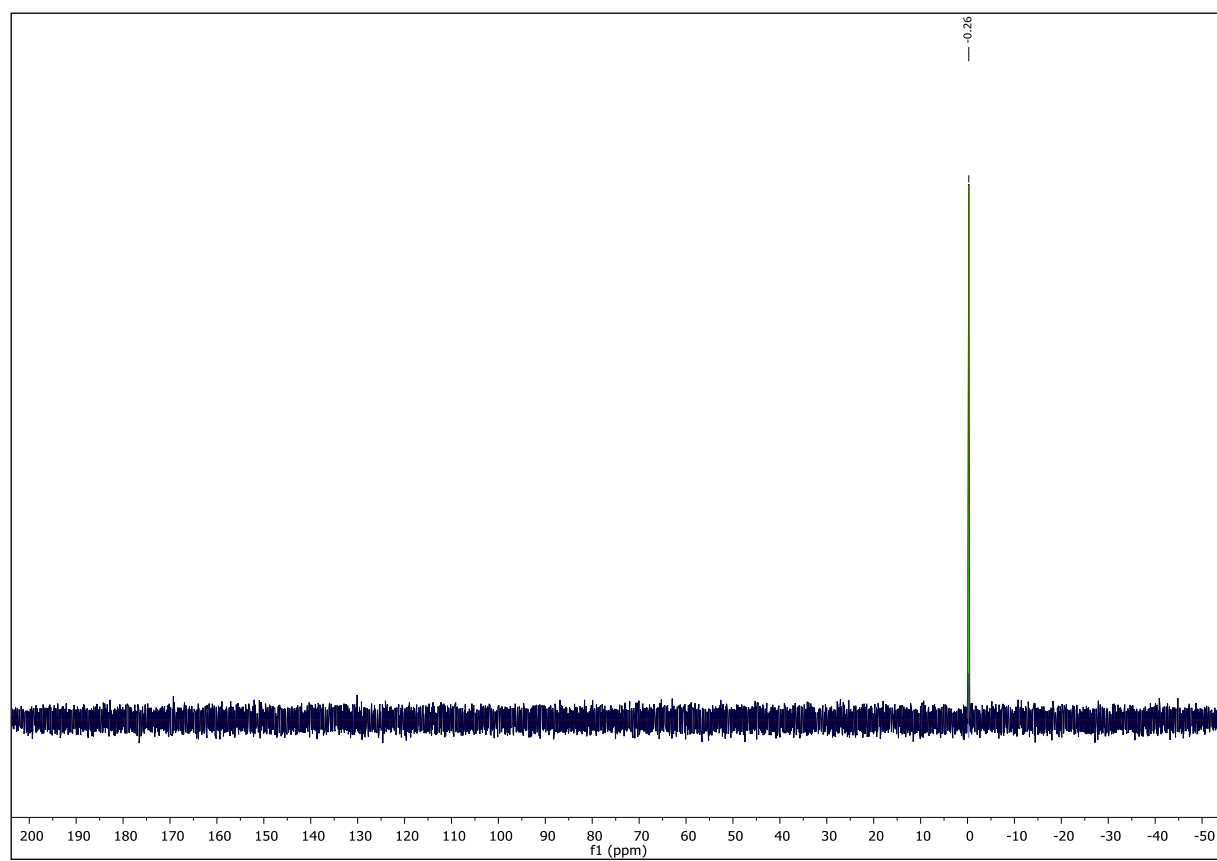


Fig. S14. ^{31}P NMR of compound **9** in CD_3OD

9. Oświadczenia autorów publikacji

1. Agnieszka Jackowska, mgr
2. Dorota Gryko, prof. dr hab.
3. Maciej Giedyk, dr
4. Mikołaj Chromiński, dr
5. Marcin Równicki, dr
6. Monika Kolanowska, dr
7. Joanna Trylska, prof. dr hab.
8. Sidra Hassan, dr



Instytut Chemii Organicznej
Polskiej Akademii Nauk
ul. M. Kasprzaka 44/52
01-224 Warszawa

Warszawa, 10.06.2021

Oświadczam, że mój wkład w powstanie poniższych publikacji naukowych

- › Agnieszka Jackowska, Mikołaj Chromiński, Maciej Giedyk, Dorota Gryko, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 936–943

5'-Vitamin B₁₂ derivatives suitable for bioconjugation via the amide bond

polegał na udziale w opracowaniu koncepcji badań, zaplanowaniu i przeprowadzeniu optymalizacji redukcji związku **2** do pożądanego produktu **5**. Przeprowadziłam wszystkie eksperymenty sprzęgania z aminą **5** (wraz z optymalizacją prowadzącą do otrzymania związku **7b**). Opracowałam i przeprowadziłam syntezę kwasu **8** oraz wszystkich produktów jego sprzęgania. Wszystkie otrzymane związki scharakteryzowałam. Uczestniczyłam w przygotowaniu manuskryptu oraz przygotowałam wszystkie materiały uzupełniające.

- › Maciej Giedyk, Agnieszka Jackowska, Marcin Równicki, Monika Kolanowska, Joanna Trylska, Dorota Gryko, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 763–766

Vitamin B₁₂ transports modified RNA into E. coli and S. Typhimurium cells

polegał na przeprowadzeniu syntezy pochodnej kobalaminy **2** oraz niektórych etapów w syntezie substratów **3a-b**. Wykonałam syntezy docelowych koniugatów witaminy B₁₂ z 2'OMeRNA (**6b-c**), oczyściłam otrzymane związki i scharakteryzowałam. Wszystkie koniugaty B₁₂-2'OMeRNA przetestowałam pod względem stabilności w pożywce bakteryjnej Davis Minimal Broth. Uczestniczyłam w interpretacji wyników eksperymentów chemicznych i badań biologicznych. Uczestniczyłam w przygotowaniu manuskryptu oraz części materiałów towarzyszących.

- › Sidra Hassan, Agnieszka Jackowska, Dorota Gryko, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2019**, *23*, 554–560

Truncated vitamin B₁₂ derivative with the phosphate group retained

polegał na przeprowadzeniu wszystkich eksperymentów dotyczących otrzymania związku **9** (optymalizacja, charakterystyka). Uczestniczyłam w przygotowaniu manuskryptu oraz materiałów uzupełniających.

A. Jackowska



› Agnieszka Jackowska, Dorota Gryko, *Org. Lett.* 2021, DOI: 10.1021/acs.orglett.1c00839

Vitamin B₁₂ Derivatives Suitably Tailored for the Synthesis of Photolabile Conjugates

polegał na współpracowaniu koncepcji badań i interpretacji wyników. Zaplanowałam i przeprowadziłam wszystkie eksperymenty syntetyczne oraz dotyczące fotouwalniania i stabilności. Otrzymane związki w pełni scharakteryzowałam. Uczestniczyłam w przygotowaniu manuskryptu oraz przygotowałam wszystkie materiały uzupełniające.

.....Agnieszka Jackowska.....



Instytut Chemii Organicznej
Polskiej Akademii Nauk
ul. M. Kasprzaka 44/52
01-224 Warszawa

Warszawa, 10.06.2021

Oświadczam, że mój wkład w powstanie poniższych publikacji naukowych:

- › **Agnieszka Jackowska**, Mikołaj Chromiński, Maciej Giedyk, Dorota Gryko, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 936–943

5'-Vitamin B₁₂ derivatives suitable for bioconjugation via the amide bond

polegał na opracowaniu koncepcji badań, interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu.

- › Maciej Giedyk, **Agnieszka Jackowska**, Marcin Równicki, Monika Kolanowska, Joanna Trylska, Dorota Gryko, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 763–766

Vitamin B₁₂ transports modified RNA into E. coli and S. Typhimurium cells

polegał na współopracowaniu koncepcji badań, interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu.

- › Sidra Hassan, **Agnieszka Jackowska**, Dorota Gryko, *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2019**, *23*, 554–560

Truncated vitamin B₁₂ derivative with the phosphate group retained

polegał na opracowaniu koncepcji badań, interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu.

- › **Agnieszka Jackowska**, Dorota Gryko, *Org. Lett.* **2021**, DOI: 10.1021/acs.orglett.1c00839

Vitamin B₁₂ Derivatives Suitably Tailored for the Synthesis of Photolabile Conjugates

polegał na współopracowaniu koncepcji badań, interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptu.

Dorota
Gryko

Digitally signed by Dorota
Gryko
Date: 2021.06.10 14:59:51
+02'00'



Instytut Chemii Organicznej
Polskiej Akademii Nauk
ul. M. Kasprzaka 44/52
01-224 Warszawa

Warszawa, 10.06.2021

Oświadczam, że mój wkład w powstanie poniższych publikacji naukowych

- › Agnieszka Jackowska, Mikołaj Chromiński, Maciej Giedyk, Dorota Gryko, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 936–943

5'-Vitamin B₁₂ derivatives suitable for bioconjugation via the amide bond

polegał na współpracowaniu koncepcji i metodyki badań. Uczestniczyłem w interpretacji wyników eksperymentów oraz w przygotowaniu manuskryptu.

- › Maciej Giedyk, Agnieszka Jackowska, Marcin Równicki, Monika Kolanowska, Joanna Trylska, Dorota Gryko, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 763–766

Vitamin B₁₂ transports modified RNA into E. coli and S. Typhimurium cells

polegał na współpracowaniu koncepcji i metodyki badań oraz wykonaniu przeglądu literaturowego. Przeprowadziłem syntezę niezbędnych substratów, a także wykonałem eksperymenty optymalizacyjne. Wykonałem część syntez docelowych biokonjugatów oraz scharakteryzowałem otrzymane produkty. Uczestniczyłem w interpretacji wyników eksperymentów chemicznych i biologicznych. Uczestniczyłem w przygotowaniu manuskryptu oraz części materiałów towarzyszących.

ul. S. Banacha 2c

02-097 Warszawa

E-mail: m.chrominski@cent.uw.edu.pl

Warszawa, 07.06.2021

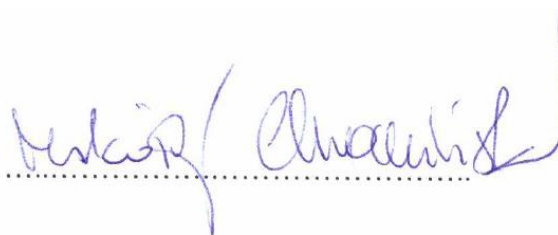
Mikołaj Chromiński, dr

Oświadczam, że mój wkład w powstanie poniższej publikacji naukowej

Agnieszka Jackowska, Mikołaj Chromiński, Maciej Giedyk, Dorota Gryko, *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16*, 936–943

5'-Vitamin B₁₂ derivatives suitable for bioconjugation via the amide bond

polegał na zaplanowaniu i przeprowadzeniu eksperymentów prowadzących do otrzymania kluczowego związku **5** oraz wydzieleniu i charakteryzacji związku **5**.

A handwritten signature in blue ink, reading 'Mikołaj Chromiński', written over a horizontal dotted line.

ul. S. Banacha 2c

02-097 Warszawa

E-mail: marcin.rownicki1@gmail.com

Warszawa, 08.06.2021

Marcin Równicki, dr

Oświadczam, że mój wkład w powstanie poniższej publikacji naukowej

Maciej Giedyk, **Agnieszka Jackowska**, Marcin Równicki, Monika Kolanowska, Joanna Trylska, Dorota Gryko, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 763–766

Vitamin B₁₂ transports modified RNA into E. coli and S. Typhimurium cells

polegał na przeprowadzeniu doświadczeń określających czy witamina B₁₂ transportuje oligomery 2'OMe RNA do bakterii *Escherichia coli* oraz *Salmonella Typhimurium* (hodowla bakterii, inkubacja z oligomerami 2'OMe RNA oraz koniugatami B₁₂-2'OMe RNA, pomiar fluorescencji i absorbancji, analiza, opracowanie i opis wyników).

A handwritten signature in blue ink that reads 'MRównicki'.

Warszawa, 09.06.2021

Monika Kolanowska, dr

Oświadczam, że mój wkład w powstanie poniższej publikacji naukowej

Maciej Giedyk, Agnieszka Jackowska, Marcin Równicki, Monika Kolanowska, Joanna Trylska, Dorota Gryko, *Chem. Commun.* **2019**, 55, 763–766

Vitamin B₁₂ transports modified RNA into E. coli and S. Typhimurium cells

polegał na: przeprowadzeniu eksperymentów oceny cytotoksyczności badanych związków *in vitro* na hodowlach komórkowych HEK-293

.....Monika Kolanowska.....

ul. S. Banacha 2c
02-097 Warszawa
E-mail: joanna@cent.uw.edu.pl

Warszawa, 30.05.2021

Joanna Trylska, prof. dr hab.

Oświadczam, że mój wkład w powstanie poniższej publikacji naukowej

Maciej Giedyk, **Agnieszka Jackowska**, Marcin Równicki, Monika Kolanowska, Joanna Trylska, Dorota Gryko, *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 763–766

Vitamin B₁₂ transports modified RNA into E. coli and S. Typhimurium cells

polegał na nadzorowaniu doświadczeń pobierania koniugatów 2'OMe-RNA z witaminą B₁₂ przez komórki bakterii oraz współudziałe w edycji manuskryptu.

Signature valid

Digitally signed by Joanna
Trylska; UW
Date: 2021.05.30 12:28:56 CEST

Joanna Trylska

Kraków, 10.06.2021

Sidra Hassan, dr

Oświadczam, że mój wkład w powstanie poniższej publikacji naukowej

Sidra Hassan, Agnieszka Jackowska, Dorota Gryko, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 2019,
23, 554–560

Truncated vitamin B₁₂ derivative with the phosphate group retained

polegał na opracowaniu koncepcji badań, przeprowadzeniu części eksperymentów, a także współdziałał w przygotowaniu manuskryptu.


.....



B. Org. 430/21

Biblioteka Instytutu Chemii Organicznej PAN

Org.-B.430/21



80000000343509