1	ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРО	СТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
2	ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ І	БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
3	СИБИРСКОГО ОТДЕ	ЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
4	Лабор	атория структурной биологии
5		
6		
7		На правах рукописи
8		
9		
10	БАРАНОВС	СКАЯ ЕЛИЗАВЕТА ЕВГЕНЬЕВНА
11		
12		
13		НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
14	об основ	ных результатах выполненной
15	научно	э-квалификационной работы
16		
17	Фос	форамидные азольные
18 19	олигонуклеоти	цы: синтез, своиства и применение
20	Направление подготовки	04.06.01 Химические науки
21	Специальность	1.4.9 Биоорганическая химия
22		
23		
24	Аспирант	Е.Е. Барановская
25	Научный руководитель	к.х.н. С.В. Васильева
26		
27		
28		
29		
30		
31		Новосибирск - 2024
32		

- 33 Работа выполнена в Лаборатории структурной биологии ФГБУН Института химической
- 34 биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук,
- 35 г. Новосибирск, Россия
- 36
- 37 Научный руководитель:

38 Васильева Светлана Викторовна

- 39 Кандидат химических наук, старший научный сотрудник Лаборатории структурной
- 40 биологии ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
- 41 г. Новосибирск.
- 42
- 43

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

45 1.1. Актуальность

1.

46 В настоящее время производные олигонуклеотидов широко используют для 47 фундаментальных исследований. Кроме того, они являются основой для перспективных 48 разработок в области биомедицины [1]. Поскольку сахаро-фосфатный остов является 49 ключевым элементом химической структуры нуклеиновых кислот, его изменение может 50 сильно влиять на химическую стабильность, эффективность взаимодействия с другими 51 биомолекулами, растворимость, проникновение в клетку и, в конечном итоге, биологическую 52 активность нуклеиновых кислот [2-4]. В последние десятилетия особое внимание уделяется 53 введению модификаций по фосфатным группам олигонуклеотидов, поскольку полученные 54 производные отвечают основным требованиям, предъявляемым к терапевтическим 55 нуклеиновым кислотам. Тиофосфатные антисмысловые олигонуклеотиды (PS-ACO) -56 наиболее широко изученный класс терапевтических средств на основе нуклеиновых кислот, Разработанные 57 используемый В клинике. коллегами в ИХБФМ CO PAH, 58 фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО) уже активно исследуют в качестве 59 прототипов АСО. Разработан новый препарат WVE-004, прошедший доклинические 60 испытания для лечения пациентов [5]. Их аналоги - сульфамидные мезильные 61 олигонуклеотиды, исследуют как действующее соединение в противоопухолевой терапии [6]. 62 Модифицированные нуклеиновые кислоты нашли свою нишу и в диагностике. Применение 63 модифицированных аналогов в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции 64 используют для улучшения специфичности, эффективности и чувствительности метода, 65 благодаря дополнительному несоответствию вводимой/вводимых от 66 модификации/модификаций [7-9].

67 Для изучения свойств И дальнейшего применения химический синтез 68 олигонуклеотидов и их производных обычно осущствляют в автоматическом или 69 полуавтоматическом режиме синтеза [10–12]. Возможность введения разнообразных 70 множественных модификаций в любое заданное положение олигонуклеотида в процессе 71 автоматического синтеза ДНК является принципиальным и критическим для их применения.

72 дизайна Используя подходы рационального структуры можно создавать 73 модифицированные олигонуклеотидные последовательности с заданными терапевтическими 74 или диагностическими свойствами в зависимости от необходимости. А сочетание нескольких 75 модификаций в одном олигонуклеотиде раскрывают новый потенциал в применении. Таким 76 образом, разработка методов автоматического синтеза новых производных и аналогов

нуклеиновых кислот, изучение их свойств и перспектив биомедицинского применения
является актуальной задачей.

79

Цели и задачи исследования

40 Целью данной работы является синтез новых фосфат-модифицированных
 81 бензоазольных олигонуклеотидных аналогов, исследование их физико-химических и
 82 молекулярно-биологических свойств. Для достижения цели были поставлены следующие
 83 задачи:

- 84 1) Дизайн новых бензоазольных модификаций, совместимых с условиями их введения в
 85 олигонуклеотид по реакции Штаудингера;
- 86 2) Получение соответствующих модифицирующих азидо-реагентов и изучение их
 87 реакционной способности в отношении трехвалентного фосфора в условиях реакции
 88 Штаудингера;
- 89 3) Синтез новых фосфорамидных азольных олигонуклеотидов, отработка протокола их
 90 автоматического твердофазного синтеза;
- 91
 4) Исследование физико-химических свойств полученных производных

 92
 олигонуклеотидов;

93 5) Оценка потенциала применения фосфорамидных азольных аналогов в качестве
 94 праймеров для выявления однонуклеотидных полиморфизмов с помощью
 95 полимеразной цепной реакции;

96 1.2. Научная новизна практическая значимость работы

97 В данной работе впервые получены новые аналоги олигонуклеотидов, несущие N-98 бензоазольные фосфорамидные группы по межнуклеотидным фосфатам - фосфорамидные 99 азольные олигонуклеотиды (ФАО). Отработан и оптимизирован протокол введения новой 100 межнуклеотидной бензоазольной модификации в процессе автоматического синтеза ДНК. 101 Исследованы физико-химические свойства ФАО и показано, что введение модификаций не 102 структуру как ДНК/ДНК, так и ДНК/РНК оказывает влияния на дуплексов. 103 Продемонстрирована перспективность использования ФАО в качестве праймеров для 104 выявления однонуклеотидных полиморфизмов с помощью полимеразной цепной реакции 105 (АС-ПЦР).

106 1.3. Апробация работы

107 По результатам исследования опубликовано 9 работ, в том числе 1 патент, 2 статьи в

108 рецензируемых изданиях из перечня ВАК и 6 тезисов конференций:

- Патент РФ № 2 823 099. Васильева С.В., Барановская Е.Е., Чубаров А.С., Ломзов А.А.,
 Пышный Д.В. «Фосфорамидные азольные олигонуклеотиды, способ синтеза
 фосфорамидных азольных олигонуклеотидов и способ матричного ферментативного
 синтеза ДНК с их использованием». Заявка № 2023110694. Дата приоритета 26.04.2023.
 https://www.fips.ru/cdfi/fips.dll/ru?ty=29&docid=2823099.
- Vasilyeva, V.; Baranovskaya, E.; Dyudeeva E.; Lomzov, A.; Pyshnyi, D. Synthesis of
 oligonucleotides carrying inter-nucleotide N-(benzoazole)-phosphoramide moieties. ACS
 Omega, Vol. 8., №1, 2023, 1556–1566. DOI: 10.1021/acsomega.2c07083
- Baranovskaya, E.E.; Chubarov, A. S., Oscorbin, I. P., Yushin, I. I., Filipenko, M. L.,
 Pyshnyi, D. V., Vasilyeva, S. V., Lomzov, A. A. Phosphoramidate azole Oligonucleotides for
 single nucleotide polymorphism detection by PCR. Int. J. Mol. Sci. 2024. Vol. 25. N. 1.
 P. 617. DOI: 10.3390/ijms25010617
- 121 4. Барановская Е.Е., Васильева С.В., Пышный Д.В. Разработка эффективных методов 122 получения олигонуклеотидов с гетероциклическими модификациями по 123 межнуклеотидному фосфату. Материалы XXIX Международной научной конференции 124 студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2022", секция "Химия". М.: 125 Издательство «Перо», 2022, 906 с. – 72 МБ. [Электронное издание]. ISBN 978-5-00204-126 190-9.
- 5. Барановская Е.Е., Васильева С.В., Ломзов А.А., Пышный Д.В. Разработка
 эффективных методов получения новых производных олигонуклеотидов с
 гетероциклическими модификациями по межнуклеотидному фосфату. Материалы
 всероссийской конференции "Синтетическая биология и биофармацевтика.",
 Новосибирск. ООО «Офсет-TM». 280 с; ISBN 978-5-85957-199-4; 2022, 154 с.
- 6. Барановская Е.Е., Васильева С.В., Чубаров А.С., Ломзов А.А. Новые перспективные аналоги нуклеиновых кислот для ПЦР диагностики. Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2023", секция "Химия". М.: Издательство «Перо», 2023, 1242 с. 121 МБ. [Электронное издание]. ISBN 978-5-00218-214-5.
- 137 7. Барановская Е.Е., Чубаров А.С., Ломзов А.А., Васильева С.В. Эффективная ПЦР
 138 диагностика с новыми фосфорамидными азольными олигонуклеотидами (ФАО).
 139 ВіоТор-2023: Достижения молодых ученых ИХБФМ Новосибирск, ИХБФМ СО
 140 РАН, 2023. 73 с.

 141 8. Барановская Е.Е., Чубаров А.С., Ломзов А.А., Васильева С.В. Фосфорамидные 142 азольные олигонуклеотиды – новые эффективные инструменты для ПЦР диагностики.
 143 X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, 144 биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов — 2023: Сб. тез. / АНО 145 «Инновационный центр Кольцово». — Новосибирск: ИПЦ НГУ, 2023. — 566 с. ISBN 146 978-5-4437-1526-1

- 147 9. Барановская Е.Е., Ломзов А.А., Васильева С.В. Выявление точечных мутаций в ДНК
 148 методом ПЦР с помощью ФАО. Физико-химическая биология. Материалы V
 149 всероссийской конференции, приуроченной к 40-летию ИХБФМ СО РАН. –
 150 Новосибирск, 9–12 июля 2024 г. Новосибирск. ООО «Офсет-TM». 2024. 112 стр.
- 151 Вклад автора

152 Автором были сконструированы, синтезированы, очищены и проанализированы новые 153 аналоги олигонуклеотидов, а именно фосфорамидные азольные олигонуклеотиды. Для этого 154 были синтезированы и очищены четыре азида, а также оценена их реакционная способность 155 по реакции Штаудингера. Проведен анализ полученных результатов и проведена оптимизация 156 синтетического протокола для получения ФАО. Были исследованы физико-химические 157 свойства синтезированных аналогов (термическая денатурация, гидрофобность, химическая 158 стабильность, электрофоретическая подвижность и т.д). С помощью ПШР анализа автором 159 было изучено влияние модификации на процесс удлинения модифицированного праймера, а 160 также анализ влияния модификации в матрице на процесс удлинения нативного праймера. 161 Масс-спектрометрический анализ был проделан ЦКП ИХБФМ СО РАН. ЯМР спектры были получены в ЦКП НИОХ СО РАН. ПЦР в реальном времени проводили Чубаров А.С., 162 163 Оскорбин И. П., Филипенко М. Л.

- 164
- 165

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

167 2.1. Исходные материалы и приборная база. 168 Реактивы и растворители.

169 В работе использовались следующие реагенты и растворители без очистки, если это не 170 оговорено отдельно: 2-хлоробензимидазол (Sigma Aldrich, США), 2-хлоробензоксазол (Sigma 171 Aldrich, США), 2-хлоробензтиазол (Sigma Aldrich, США), 2-гидроксибензимидазол (Sigma 172 Aldrich, США), азид натрия (Sigma Aldrich, США), диметилформамид (ДМФА) (PANREAC, 173 Россия), хлороформ (ВЕКТОН, Россия), хлорид натрия (Sigma Aldrich, США), гидросульфат 174 натрия и сульфат натрия безводный (Реахим, Россия), гексан (ВЕКТОН, Россия), этилацетат 175 (ВЕКТОН, Россия), толуол (ВЕКТОН, Россия), тетрабутиламмония бромид (ВЕКТОН, 176 Россия), гидроксид калия (Sigma Aldrich, США), йодометан, соляная кислота (BEKTOH, Россия), гидрокарбонат натрия (Реахим, Россия), ацетон (ВЕКТОН, Россия), оксалилхлорид 177 178 (Sigma Aldrich, США), гексафторфосфат калия (Sigma Aldrich, США), ацетонитрил (RCI 179 Labscan Limited, Тайланд), тетрагидрофуран (RCI Labscan Limited, Тайланд), дихлорметан 180 (RCI Labscan Limited, Тайланд), диэтиловый эфир (ВЕКТОН, Россия), 5'-О-диметокситритил-181 3'-[(β-цианоэтил)-(N.N-диизопропил)]-фосфорамидита (Sigma Aldrich, США), 182 дейтерированный ацетонитрил (СОЛВЕКС, Россия), триэтиламин (TEA) (Sigma Aldrich, 183 США), концентрированный раствор аммиака (Реахим, Россия)

184

Для тонкослойной хроматографии (TCX) применяли пластины Alufolien Kieselgel 60 185 F254 («Merck», Германия).

186 Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) регистрировали на спектрометрах 187 Bruker AV-400 или Bruker AV-300 (Bruker Daltonics, Германия). Значения химических сдвигов 188 (б) даны в миллионных долях (м.д.). В качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан и гексафторбензол для спектров ЯМР ¹Н и ¹⁹F соответственно, для спектров 189 ЯМР ³¹Р в качестве внешнего стандарта использовали 85% H₃PO₄ в D₂O. 190

191 Ультрафиолетовые спектры (УФ-спектры) записывали на спектрофотометре 192 Shimadzu 1800 (Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см.

193 Масс-спектры записывали на масс-спектрометре ESI LC/MS/MSD XCT (Agilent 194 Technologies, США) в отрицательной моде.

195 Исследование электрофоретической подвижности модифицированных 196 олигонуклетидов.

197 Гомотимидилатные олигонуклеотиды анализировали с помощью электрофореза в
198 полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях (20 % ПААГ, АА
199 (акриламид):БАА (метилен бис-акриламид 29:1, 8 М мочевина) при рН 8.3.

200 Реакционные смеси протяженных гетеронуклеотидных последовательностей, а также
201 гомогенность выделенных олигонуклеотидов анализировали с помощью электрофореза в
202 ПААГ в денатурирующих условиях (15 % ПААГ, АА:БАА 29:1, 8 М мочевина) при рН 8.3.

203 Электрофоретический анализ при различных pH проводили в денатурирующих
204 условиях в 20% ПААГ (АА:БАА 29:1, 8М мочевина). При pH 4.5 использовали ацетатный
205 буфер, при pH 10 – боратный буфер.

206 2.2. Синтез бензоазольных азидов и исследование их применимости в качестве азидо 207 модификатороф олигонуклеотидов.

208 2.2.1. Общая схема синтеза азидов: 2-азидобензимидазола (1), 2-азидобензоксазола (2) и
209 2-азидобензотиазола (3) (Схема 2).

210 Синтез азидов проводили аналогично ранее предложенным методикам [13-15] с 211 изменениями. Азид натрия (1.4 экв, 10 ммоль, 0.6 гр) добавляли к раствору соответствующего 212 хлорида: 2-хлорбензимидазола, 2-хлорбензотиазола или 2-хлорбензоксазола (1.0 экв., 6 ммоль, 213 1.0 гр) в ДМФА (6 мл), реакционную смесь нагревали на масляной бане (60 °C) при 214 перемешивании в инертной атмосфере аргона 24 часа. Далее реакционную смесь разбавляли 215 хлороформом до 60 мл, промывали насыщенными растворами NaCl (60 мл), затем NaHSO₄ (60 216 мл) и деионизованной водой (60 мл). Органическую фазу сушили над безводным сульфатом 217 натрия, затем растворитель упаривали на ротационном испарителе (15 бар, Rotavapor R-200, 218 Швейцария).

219 <u>2-Азидобензимидазол 1</u>

220TCX (гексан/этилацетат = 7.5:2.5): R_f (Cl) = 0.20, R_f (N₃) = 0.31. Выход 386 мг, 2.42221ммоль (37%). Данные ЯМР, УФ- и ИК-спектроскопии согласуются с литературными данными222[16, 17]. ИК (инфракрасная спектроскопия) (КВг) N₃ v [см⁻¹] 2140. УФ (50% EtOH) $\lambda_{\text{макс}}$: 240,223275, 281, 290 нм. ¹Н ЯМР ((CD₃)₂SO, 600 МГц, δ , м.д.): 8 (s, 1H, NH), 7.45–7.43 (m, 2H, CH-Ar),2247.16–7.15 (m, 2H, CH-Ar). ¹³C ЯМР ((CD₃)₂SO, 150 МГц, δ , m.d.): 147.7, 122.0, 114.2.

225 2-азидобензоксазол 2

226 TCX (гексан/этилацетат = 9.5:0.5): R_f (Cl) = 0.61, R_f (N₃) = 0.45. Выход 631 мг, 3.94 227 ммоль (61%). Данные ЯМР, УФ- и ИК-спектроскопии согласуются с литературным данным 228 [18]. ИК (KBr): $N_3 v$ [см⁻¹] 2150. УФ (50% EtOH) $\lambda_{\text{макс}}$: 255, 282 нм. ¹Н ЯМР (CDCl₃, 600 МГц, 229 δ , м.д.): 7.56 (d, 1H-Ar), 7.40 (d, 1H-Ar), 7.29 (t, 2H-Ar). ¹³С ЯМР (CDCl₃, 150 МГц, δ , м.д.): 230 156.9, 149.7, 141.1, 124.9, 124.1, 118.5, 110.2.

231 2-Азидобензотиазол 3

232 ТСХ (гексан/этилацетат = 8.2:1.8): R_f (Cl) = 0.71, R_f (N₃) = 0.16 и 0.74. Выход 788 мг, 233 4.48 ммоль (76%). Данные ЯМР и ИК-спектроскопии согласуются с литературным данным 234 [18]. УФ (50% EtOH) $\lambda_{\text{макс}}$: 238, 284, 290 нм. ¹Н ЯМР (CDCl₃, 80 МГц, δ , м.д.): 8.20–7.49 (m, 235 4H). ИК (KBr): N₃ нет полосы 2130–2150. В соответствии с литературными данным [19, 20] 236 реакционная смесь содержит продукт в двух таутомерных формах бензо[4,5]тиазоло[3,2-237 d]тетразола и 2-азидобензо[d]тиазола, при этом выделенный продукт находится в основном в 238 виде бензо[4,5]тиазоло[3,2-d]тетразола.

239 2.2.2. Синтез 2-азидобензодиметилимидазол гексафторфосфата (АДМБИ) (4, Схема 3).

240 1,3-диметилбензимидазол (ДМБИ)

241 К раствору 2-гидроксибензимидазола (1.0 экв., 2.5 г, 18 ммоль) в 13 мл толуола 242 добавляли бромид тетрабутиламмония (0.05 экв., 303.8 мг) и водный раствор (40% масс./об.) 243 гидроксида калия (4.0 экв, 4.2 г). Реакционную смесь нагревали на масляной бане до 60 °С и 244 добавляли йодометан (2.3 экв, 6.1 г, 2.67 мл) порциями в течение часа, затем оставляли на 24 245 ч. при 58 °C при перемешивании. Полноту протекания реакции контролировали с помощью 246 TCX (этилацетат/гексан = 1:1). Затем в реакционную смесь добавляли 75 мл 1N HCl. 247 Органическую фазу промывали 75 мл NaHCO₃ и водой, после этого сушили над безводным 248 сульфатом натрия. Затем упаривали растворитель на ротационном испарителе. Продукт 249 перекристаллизовывали из смеси ацетон/гексан = 3:2. Выход составил 1.4 г, 8.9 ммоль (50%).

250 2-хлор-1,3-диметилбензимидазол хлорид

К раствору ДМБИ (1.0 экв., 1.4 г, 8.9 ммоль) в 11 мл толуола добавляли 2.3 мл
оксалилхлорида при 40 °С. Реакционную смесь нагревали до 70 °С и оставляли на 3 суток при
перемешивании; затем добавляли 1.1 мл оксалилхлорида и выдерживали еще 2 дня при 70 °С.
Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, а затем на льду. Осадок
фильтровали на стеклянном пористом фильтре, промывали холодным толуолом и затем
сушили в эксикаторе под вакуумом. Выход составил 0.5 г, 2.2 ммоль (25%).

257 <u>АДМБИ 4</u>

258 Соединение получали в соответствии с процедурой, описанной в [21]. Сначала анион 259 хлора заменяли на анион гексафторфосфата, поскольку эта процедура улучшает 260 растворимость продукта в ацетонитриле и способствует большей стабильности при хранении. 261 Хлорид (1.0 экв., 0.47 г, 2.2 ммоль) и гексафторфосфат калия (1.0 экв., 2.2 ммоль, 409.4 мг) 262 добавляли 10 мл сухого ацетонитрила, реакционную смесь перемешивали при комнатной 263 температуре в инертной атмосфере в течение ночи. Реакционную смесь фильтровали на 264 стеклянном пористом фильтре со слоем силикагеля 0.5 см. Субстрат упаривали на ротационном испарителе (при нагревании не выше 50 °C) и растворяли в ацетонитриле (2 мл), 265 266 затем продукт осаждали диэтиловым эфиром (15 мл × 2). Полученные 584.7 мг осадка 267 растворяли в 5 мл сухого ацетонитрила и добавляли азид натрия (1.5 экв., 2.6 ммоль, 171.0 мг). 268 Реакцию оставляли перемешиваться на ночь при комнатной температуре в инертной 269 атмосфере. По истечении времени реакционную смесь фильтровали на стеклянном фильтре со 270 слоем силикагеля 0.5 см. Субстрат упаривали на ротационном испарителе (при нагреве ниже 271 50 °C) и растворяли в небольшом количестве ацетонитрила (2 мл), продукт осаждали 272 диэтиловым эфиром (15 мл × 2). Выход составил 442.8 мг, 1.3 ммоль (60%). ИК (KBr): N₃ υ 273 [см⁻¹] 2140, УФ (вода/ацетонитрил) λ_{макс}: 200 ÷ 300, 370 ÷ 443 нм. ¹Н ЯМР (CDCl₃, 80 МГц, δ, м.д.): 7.63–7.49 (m, 4H, 4, 5, 6, 7), 2.64 (s, 6H, 2CH₃). ³¹Р ЯМР (CDCl₃, 32 МГц, δ, м.д.): -101.13, 274 -122.92, -144.69, -166.48, -188.26. ¹⁹F ЯМР (CDCl₃, 75 МГц, δ, м.д.): -66.49, -75.86. 275

276 2.2.3. Исследование реакционной способности азидов 1–4 в реакции Штаудингера 277 (Схема 4).

278 Реакционную способность проверяли аналогично методу, описанному в [22]. Реакцию 279 проводили в завинчивающихся пластиковых пробирках объемом 1.5 мл. К раствору 5'-О-280 диметокситритил-3'-[(β-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]-фосфорамидита (0.02 ммоль) в дейтерированном ацетонитриле добавляли 5-этилтио-1*H*-тетразол (ЭТТ, 0.08 ммоль) и 281 282 изопропанол (абс.) (4 ммоль). Реакционную смесь помещали в термостат (30 °C, 10 мин). 283 Большую часть растворителя упаривали в вакуумном концентраторе; остаточный объем 284 составил 90 мкл. Полученный триэфир 5'-О-диметокситритил-3'-[(Вцианоэтил)-285 алкил]фосфита использовали в дальнейшем синтезе без очистки. Последующие реакции с ним 286 проводили в ампулах ЯМР. Механизм превращений представлен на схеме 3.

287 В каждую ампулу добавляли соответствующий ~0.1 М раствор азида 1-4 в
 288 дейтерированном ацетонитриле (0.03 ммоль, 4.9 мг 1 в 220 мкл; 0.03 ммоль, 5.4 мг 2 в 220 мкл;

289 0.02 ммоль, 5.3 мг 3 в 200 мкл и 0.02 ммоль 4 в 153 мкл). После добавления азида все 290 реакционные смеси окрашивались в желтый цвет (что является визуальным признаком 291 прохождения реакции Штаудингера, наиболее насыщенный цвет был в случае азида 3), в 292 процессе реакции наблюдалось выделение газа. По данным спектров ³¹Р ЯМР, реакция 293 Штаудингера протекает за 5 мин для всех азидов. Затем добавляли триэтиламин (ТЕА) (10 294 мкл) для удаления цианэтильной защитной группы и реакционные смеси оставляли на ночь 295 при 30 °C. ³¹Р ЯМР реакционной смеси показал полное превращение трехвалентного фосфора 296 в пятивалентный (хим. сдвиги см. п.3.1.1. в Результаты и обсуждение). Визуальным признаком 297 этого превращения является исчезновение желтой окраски реакционной смеси.

298 2.2.4. Синтез диизопропилбензо[d]тиазола-2-илфосфоримидата 7 (Схема 5); определение 299 вклада модифицирующей группы в коэффициент экстинкции модифицированного 300 олигонуклеотида.

301 Реакцию 2-азидобензотиазола 3 с фосфитилирующим реагентом - 2-цианоэтил-302 N,N,N',N'-тетраизопропилдиамидофосфитом проводили в ЯМР ампуле под контролем ³¹Р 303 ЯМР, аналогично эксперименту, описанному в работе [22]. К раствору 0.5 М ЭТТ (4 экв, 0.11 304 ммоль, 240 мкл) в сухом ацетонитриле добавляли изопропанол (абс.) (100 экв., 2.80 ммоль, 595 305 мкл) и фосфитилирующий реагент (1 экв., 0.03 ммоль, 9 мкл). Образование триэфира 306 происходит мгновенно, что было подтверждено ³¹Р ЯМР. После добавления 2-307 азидобензотиазола 3 (1 экв., 0.03 ммоль, 280 мкл 0.1 М раствора) реакцию проводили в течение 308 часа. Затем добавляли 250 мкл триэтиламина (ТЕА) для снятия цианэтильной защиты. 309 Реакционную смесь разбавляли водой (в ~10 раз). Белый осадок центрифугировали и, после 310 декантации супернатанта, сушили соупариванием с ацетонитрилом. Структура соединения 7 311 подтверждена спектрами ³¹Р и ¹Н ЯМР. УФ-спектры 7 были зарегистрированы при 312 концентрации C = 1.57×10^{-4} M при различных pH: в 30% EtOH-0.1 M HCl, pH 2; 30% EtOH в ацетатном буфере, pH 3.8; 30% EtOH-H2O, pH 6-7; 30% EtOH - 0.1 M NaOH, pH 10 313 314 (Результаты и обсуждение, Рисунок 1). Коэффициент экстинкции группы *N*-бензотиазола 315 определяли по УФ-спектру (C = 80 мкМ, 50% EtOH–H₂O): ε = 7125 (260 нм). Концентрацию 316 рассчитывали по весу образца 7. В аппроксимации аддитивного вклада модификации в 317 экстинкцию олигонуклеотидного производного следует вычислять как сумму экстинкции 318 нативного олигомера и числа модификаций, умноженных на его экстинкцию.

319 2.3. Синтез олигонуклеотидов.

320 Синтез олигонуклеотидов проводили с помощью автоматического ДНК синтезатора 321 ASM-800 или ASM-800E компании «Биоссет» (Новосибирск, Россия) по стандартному 322 амидофосфитному протоколу синтеза. В случае введения модификации по фосфату в 323 синтетическом протоколе стадию окисления заменяли на реакцию Штаудингера с 324 бензоазольным азидом. Синтез олигонуклеотидов проводили в масштабе 0.2 мкМ с 3-325 минутной стадией присоединения стандартных амидофосфитных мономеров (Биолабмикс, 326 Россия, 0.05 М в ацетонитриле) и 5-этилтио-1*H*-тетразола (0.25 М в ацетонитриле) в качестве 327 активирующего агента. В качестве кэпирующих реагентов использовали смесь пропионового 328 ангидрида в тетрагидрофуране ($T\Gamma \Phi$) и *N*-метилимидазола в $T\Gamma \Phi$. В качестве окислителей 329 использовали йод 0.02 М в системе пиридин/вода/ТГФ (1/9/90) или азид бензоазола (0.25 М в 330 ацетонитриле). Трихлоруксусную кислоту (3%) в дихлорметане использовали в качестве 331 реагента для детритилирования. Для синтеза олигонуклеотидов использовали универсальный 332 полимерный носитель с контролируемым размером пор (CPG) с порами 500 Å (Люмипроб, 333 Россия). Для приготовления водных растворов использовали деионизованную воду miliQ с 334 удельным сопротивлением 18 МΩ/см.

335 2.3.1. Общая методика получения олигодезоксирибонуклеотидов с межнуклеотидными 336 модификациями *N*-бензимидазола, *N*-бензокса/тиазола и 1,3-диметил-*N*-бензимидазола 337 (Схема 6).

Олигодезоксирибонуклеотиды синтезировали амидофосфитным методом синтеза с
 использованием автоматического ДНК синтезатора. *N*-(Бензоазол)фосфорамидные группы
 вводили как в полуавтоматическом, так и в автоматическом режиме синтеза.

341 B случае полуавтоматического режима синтеза модифицированных 342 олигонуклеотидов, автоматический синтез прерывали перед стадией окисления, реактор 343 объемом 25 мкл для твердофазного синтеза с полимерной подложкой вынимали из 344 синтезатора. Носитель переносили в пластиковую пробирку объемом 1.5 мл, добавляли азид 345 1-4 ~0,5 М в безводном ацетонитриле (200 мкл). Пробирку помещали на термостатируемый 346 шейкер и перемешивали на 800 об/мин при 45 °C 30 мин, а затем центрифугировали при 347 центробежной силе 13000 g в течение 2 мин. Супернатант декантировали, осадок промывали 348 безводным ацетонитрилом (3 × 200 мкл) и обрабатывали смесью триэтиламина и ацетонитрила 349 (1:1) при перемешивании в течение 10 мин. Затем центрифугировали, удаляли супернатант и 350 промывали безводным ацетонитрилом (3 × 100 мкл). Полимер помещали в новый реактор 351 объемом 25 мкл для завершения синтеза на автоматическом ДНК синтезаторе.

352 Автоматизированный синтез олигонуклеотидов немодифицированной части 353 проводили по стандартному протоколу. При введении межнуклеотидфосфатной модификации 354 использовали синтетический протокол, в котором стадию окисления заменяли на реакцию 355 Штаудингера с азидами 1-4 (0.25 М раствора в ацетонитриле). После завершения синтеза твердофазный полимер переносили в пробирку с завинчивающейся крышкой на 1.5 мл и 356 357 обрабатывали смесью ТЭА и ацетонитрила (1:1) при перемешивании в течение 10 мин. 358 Раствор декантировали, а полимер промывали ацетонитрилом.

359 Синтезированные олигонуклеотиды деблокировали концентрированным аммиаком
360 (~28%) при 55 °C в течение 18 ч. Раствор переносили в отдельную пробирку, полимерное
361 стекло промывали один раз 50% ацетонитрилом (200 мкл) и переносили в ту же пробирку,
362 затем растворитель упаривали на настольном концентраторе (15 бар, Эппендорф, Германия).
363 Олигонуклеотиды растворяли в 100 мкл воды miliQ.

364 2.3.2. Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе Милихром А02 (Эконова, Россия)
365 на колонке 2.0 х 75 мм с носителем Pronto SIL-120-5-C18-AQ DB-2003 5.0 мкм (Bischoff
366 Leonberg, Германия) с УФ детекцией на длине волны 260 нм, с элюцией в линейном градиенте
367 ацетонитрила 0→50 % в 20 мМ водном растворе триэтиламмоний ацетата (TEAAc), pH 7.0 в
368 течение 30 минут при скорости потока 0.15 мл/мин.

369 2.3.3. Очистку олигонуклеотидов проводили методом обращено-фазовой 370 высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) на хроматографе серии Agilent 371 1200 (Agilent, Santa Clara, CША) на колонке (4.6×150 мм), содержащей сорбент Eclipse XDB-372 C18 (5 мкм) (Agilent, Santa Clara, США) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила 373 0→40 % в 20 мМ растворе ТЕААс в течение 40 мин при скорости потока 1.5 мл/мин. Наличие 374 целевой фракции определяли по характерному пику поглощения на длине волны 260 нм. 375 После сбора целевых фракций олигонуклеотидов раствор количественно переносили в 376 круглодонную колбу, упаривали на ротационном испарителе. Основную массу ТЕААс 377 удаляли соупариванием с этанолом. Для удаления защитной диметокситритильной группы 378 очищенные олигонуклеотиды обрабатывали раствором 80 % уксусной кислоты (25 °C, 5 мин). 379 Олигонуклеотиды концентрировали осаждением в десятикратном избытке 2 % LiClO₄ в 380 ацетоне, затем растворяли осадок в 80 мкл 0.1 М раствора Трис-HCl (pH 7.4), переосаждали в 381 десятикратном избытке 2% раствора LiClO₄ в ацетоне, промывали один раз ацетоном (500 мкл), затем сушили на воздухе при 37 °С. Олигонуклеотиды растворяли в 50-100 мкл 382 383 деионизированной воды miliQ и хранили при температуре – 20 °C. Концентрацию водных 384 растворов олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически (Shimadzu 1800, Япония).

385 В таблицах 1-3 представлены последовательности синтезированных олигонуклеотидов.

No	Код	5'-3'олигонуклеотидная	Молекулярная масса ^а			
		ПОСЛАПОРАТАЛІ ПОСТІ	Расчётная	экспериментальная,		
		последовательность	m/z	m/z		
T6	T6	TTTTTT	1762.3	1763.2		
1	T6-1 N	$T^N TTTTTT$	1876.4	1878.4		
2	T6-1 O	T ^O TTTTT	1877.8	1879.2		
3	T6-1 S	$T^{S}TTTTT$	1893.3	1895.4		
4	T6-1 D	$T^{D}TTTTTT$	1905.4	1906.4		
5	T6-1,2 S	T ^S T ^S TTTT	2026.4	2027.4		
6	T6-5 S	TTTTT ^S T	1893.4	1895.4		
7	T6-4,5 S	TTTT ^s T ^s T	2026.4	2027.4		
8	T6-1,5 S	T ^S TTTT ^S T	2026.4	2027.4		
9	T6-5 N	TTTTT ^N T	1877.4	1877.4		
10	T6-5 O	TTTTT ^O T	1878.4	1878.2		
11	DM01-1 S	G ^s CGCCAAACA	3137.6	3136.8		
12	DM01-5 S	GCGCC ^S AAACA	3137.6	3136.4		
13	DM01-9 S	GCGCCAAAC ^s A	3137.6	3136.4		
14	DM01-1,3,5,7,9 S	G ^s CG ^s CC ^s AA ^s AC ^s A	3665.6	3665.4		
15	DM01	GCGCCAAACA	3004.6			
16	DN01	TGTTTGGCGC	3048.5			
17	DN01-2,4,6,8 S	TG ^s TT ^s TG ^s GC ^s GC	3576.6	3577.2		
18	DN01-3 5 7 9 S	TGT ^S TT ^S GG ^S CG ^S C	3576.6	3577.2		

386 Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов и их молекулярные массы.

[18] DN01-3,5,7,9 S] TG1°T1°GG°CG°C] 3576.6] 3577.2] ^{*a*} массы были определены методом ESI LC–MS/MS в режиме отрицательных ионов; ^{*N*} - положение *N*-бензимидазольных, ^{*o*} - *N*-бензоксазольных, ^{*s*} - *N*-бензотиазольных и ^{*D*} - 1,3-диметил-*N*-387 388 389 бензимидазольных групп.

390 Таблица 2. Последовательности праймеров и матричных цепей, для исследования влияния 391 положения и типа модификации на процесс удлинения праймера в ПЦР.

Код	Нуклеотидная последовательность 5' -> 3'
Z 1- X	FAM-GG TGC GCT CCT GGA CGT AG*C
Z 2- X	FAM-GGTGCGCTCCTGGACGTA*GC
Z 3-X	FAM-GGTGCGCTCCTGGACGT*AGC
Z 4- X	FAM-GGTGCGCTCCTGGACG*TAGC
Z 5- <mark>X</mark>	FAM-GGTGCGCTCCTGGAC*GTAGC
Z 6-X	FAM-GGTGCGCTCCTGGA*CGTAGC
Z 7- <mark>X</mark>	FAM-GGTGCGCTCCTGG*ACGTAGC
Z 1,2- <mark>X</mark>	FAM-GGTGCGCTCCTGGACGTA*G*C
Z 1,3- <mark>X</mark>	FAM-GGTGCGCTCCTGGACGT*AG*C
Z 0	FAM-GGTGCGCTCCTGGACGTAGC
Т	CTGTTGTTTAGCTACGTCCAGGAGCGCACC
T-1	CTGTTGTTTAGATACGTCCAGGAGCGCACC
T-2	CTGTTGTTTATCTACGTCCAGGAGCGCACC
T-1,2	CTGTTGTTTATATACGTCCAGGAGCGCACC
Р	Cy-5-GCTACGTC

* означает место введения модификации *N*-бензоазола (* = X: ^{*N*} - положение *N*-бензимидазольной, ^{*O*} - *N*-бензоксазольной, ^{*S*} - *N*-бензотиазольной и ^{*D*} - 1,3-диметил-N-бензимидазольной фосфорамидной 392

393

группы, FAM-флуоресцентная метка, Су-5 – цианиновый краситель). Жирным шрифтом выделены 394

нуклеотиды, показывающие некомплементарные нуклеотиды по отношению к последовательности
 ДНК дикого типа (ДНК WT, олигонуклеотид T).

Мутация	Код	Нуклеотидная последовательность 5' -> 3'
	C*TTC	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*TTC
	CT*TC	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCT*TC
C124	*CT TC	AAACTTGTGGTAGTTGGAG*CTTC
GIZA	CT*GC	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCT*GC
	C*TGC	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*TGC
	*CTGC	AAACTTGTGGTAGTTGGAG*CTGC
	C*TAT	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*TAT
	CT*AT	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCT*AT
CIN	*CTAT	AAACTTGTGGTAGTTGGAG*CTAT
G12 V	CT*GT	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCT*GT
	C*TG T	AAACTTGTGGTAGTTGGAGC*TGT
	*CTGT	AAACTTGTGGTAGTTGGAG*CTGT

397 Таблица 3. Прямые праймеры для ПЦР-анализа в реальном времени.

398 * означает место модификации фосфорила *N*-бензоазола (*: ^N - положение *N*-бензимидазольных, ^O - *N* 399 бензоксазольных, ^S - *N*-бензотиазольных и ^D - 1,3-диметил-*N*-бензимидазольных фосфорамидных
 400 групп). Жирным шрифтом выделены нуклеотиды, показывающие некомплементарные нуклеотиды по
 401 отношению к последовательности ДНК WT.

402 2.3.4. Оптимизация условий автоматического синтеза модифицированных 403 олигонуклеотидов.

404 На примере *N*-бензоксазольной модификации оптимизировали процесс твердофазного 405 автоматического синтеза модифицированных олигонуклеотидов. Для этого был синтезирован 406 набор олиготимидилатов Т6 с модификацией на последнем фосфате с 5'-конца. На стадии 407 окисления по реакции Штаудингера варьировали концентрацию 2-азидобензоксазола: 0.15 М, 408 0.1 M, 0.05 M и 0.01 M; а также время окисления для каждой концентрации азида: от 10 до 40 409 мин с шагом в 10 мин. Для отщепления олигонуклеотида от полимерного носителя и снятия 410 защитных групп, полимер обрабатывали концентрированным аммиаком в течение 18 ч. Затем 411 реакционные смеси упаривали на настольном концентраторе, олигонуклеотиды растворяли в 412 50 мкл воды miliQ. Синтезированные олигонуклеотиды анализировали на хроматографе 413 ВЭЖХ Shimadzu (Shimadzu, Япония) на колонке, содержащей сорбент Zorbax SB-C18 (5 мкм, 414 4.6×150 мм) с линейным градиентом концентрации ацетонитрила $0 \rightarrow 50\%$ в 20 мМ растворе 415 ТЕААс в течение 30 мин при скорости потока 1.5 мл/мин.

416 2.4. Исследование свойств фосфорамидных бензоазольных олигонуклеотидов (ФАО).

417 2.4.1. Исследование термодинамической стабильности олигонуклеотидных дуплексов.

418 Исследования термической денатурации олигонуклеотидных комплексов проводили на
419 спектрофотометре Cary 300-Bio Melt (Varian, Австралия) или Cary 3500 (Agilent, США) в

420 кварцевых кюветах с длиной оптического пути 0.2 см. Кривые плавления регистрировали при 421 скорости нагрева 0.5 °C/мин в диапазоне 5–95 °C в многоволновом режиме на трех длинах 422 волн 260, 270 и 330 нм [23]. Профиль оптической плотности на длине волны 330 нм был 423 использован для коррекции кривых термической денатурации. Термодинамические параметры формирования дуплекса (изменения энтальпии ΔH°, энтропии ΔS° и свободной 424 425 энергии Гиббса при 37 °C: ΔG°_{37}) определяли путем нелинейной подгонки кривых 426 И ренатурации с использованием модели денатурации двух состояний [24]. 427 Термодинамические параметры, определенные на длинах волн 260 и 270 нм в экспериментах 428 с нагреванием и охлаждением, усредняли.

429 Компоненты ДНК/ДНК или ДНК/РНК дуплексов в эквимолярных количествах в расчете
430 на нуклеотид помещали в стандартный буферный раствор (1M NaCl, 10 мМ какодилат натрия
431 (CacNa) pH 7.2) с концентрацией:

- 0.1 мМ/нт, при анализе в случае T6/dA12 и T6/poly(dA)
- 433 20 мкМ (0.2 мМ/нт) при анализе гетеронуклеотидных олигомеров (№ 11-13 Таблица *I*)
 434 в случае ДНК/ДНК дуплексов, в случае ДНК/РНК дуплексов 5 мкМ (0.05 мМ/нт) и при
 435 концентрации 10 мкМ (0.1 мМ/нт) для олигонуклеотида DM01-1,3,5,7,9 S (№ 14
 436 Таблица *I*) с множественной модификацией.

437 При анализе термической стабильности в зависимости от ионной силы раствора на
438 примере олигонуклеотидов (№ 14, 17-18 Таблица 1), модифицированных *N*-бензотиазольной
439 группой, компоненты ДНК/ДНК дуплексов с концентрацией 40 мкМ в расчете на
440 олигонуклеотид помещали в буферные растворы:

- 10 мМ CacNa (pH 7.2);
- 100 мМ NaCl, 10 мМ CacNa (pH 7.2);
- 1M NaCl, 10 мМ CacNa (pH 7.2).

444 Также определяли термодинамические параметры для дуплексов ПЦР-праймеров как с 445 комплементарной матрицей (T), так и с матрицами, содержащими мисматч (T-1, T-2, T-1,2), а 446 также модифицированные олигонуклеотиды с комплементарной цепью Р (Таблица 2) в 447 буфере, имитирующем условия ПЦР. Для проведения исследований в буфере, содержащем 10 448 мМ CacNa (pH 7.2), 75 мМ NaCl и 6 мМ MgCl₂ растворяли эквимолярную смесь 449 олигонуклеотидов в концентрации 5 мкМ.

450 2.4.2. Исследование модельных систем в полимеразной цепной реакции (ПЦР).

451 Для исследования влияния типа и положения *N*-бензоазольной модификации на
452 протекание полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали модельную систему серий:
453 Z/T, Z/T-1, Z/T-2, Z/T1,2 и Z/P (Таблица 2). Реакцию проводили в смеси объемом 20 мкл:

- 454 2.5 ед.акт. *Тад* ДНК-полимераза (SibEnzyme, Россия)
- 455 0.2 мМ dNTP (дезоксирибонуклеотидтрифосфаты) (Биосан, Россия)
- SE-буфер для *Taq* ДНК-полимеразы (без MgCl₂) (SibEnzyme, Россия)1х
- 6 мМ MgCl₂ (SibEnzyme, Россия)
- 458 по 12.5 мкМ матрицы и праймера.

459 Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в пробирках на 500 мкл (Eppendorf 460 Mastercycle Classic, Германия) для систем Z/T, Z/T-1, Z/T-2, Z/T1,2 по следующей программе: 1 цикл: 95 °C 2 мин, 30 °C 1 мин, 60 °C 7 мин (Таблица 2); для системы Z/P по следующей 461 462 программе: 3 цикла: 95 °C 2 мин, 30 °C 1 мин, 37 °C 7 мин (Таблица 2). Реакцию останавливали добавлением десятикратного избытка 2 % LiClO₄ в ацетоне. Электрофоретический анализ 463 464 реакционных смесей проводили в денатурирующем 15 %-ном полиакриламидном геле (АА:БАА 29:1, 8М мочевина) при рН 8.3. Гель сканировали на VersaDoc VH 4000 (Bio-Rad, 465 466 Hercules, США) по каналу FAM или Cy-5, а затем визуализировали путем окрашивания 467 красителем Stains-All.

468 2.4.3. Аллель-специфическая ПЦР в реальном времени.

469 ПЦР в реальном времени проводили в 20 мкл, содержащих 1× ПЦР-буфер (65 мМ Tris-470 HCl (pH 8.9), 24 MM (NH₄)₂SO₄, 0.05% Tween -20, 3 MM MgSO₄), 0.2 MM dNTP, 300 HM 471 праймеры и 100 нМ флуоресцентный зонд, 20 мМ матрицу ДНК и 1 ед.акт. Тад ДНК-472 полимеразы (Биоссан, Россия). В качестве контроля использовали плазмиду в качестве ДНК 473 матрицы в концентрации. Амплификацию проводили в системе детектирования ПЦР в 474 реальном времени CFX96 (Bio-Rad, CША) по следующей программе: 95 °C в течение 3 мин с 475 последующими 45 циклами: 95 °C 10 сек, 60 °C 40 сек с детекцией флуоресцентного сигнала 476 по каналу FAM. Реакции проводили, по крайней мере, в трех повторах и выполняли несколько 477 раз в отдельных случаях. Средние значения порогового цикла Са приведены в Таблица 8.

478 Стандарты плазмид

479 Плазмиды (Shanghai RealGene Biotech, Inc., Китай) содержали фрагмент гена KRAS дикого
480 типа или гена KRAS, с мутациями в кодоне 12 (p.G12A и p.G12V), служившими
481 положительным контролем для оценки чувствительности метода. Для этих мутаций SNP —

482 это G/C и G/T соответственно. Перед использованием все плазмиды очищали, линеаризовали
483 путем расщепления эндонуклеазой рестрикции BamHI и их количествео определяли
484 спектрофотометрически, используя NanoDrop Lite A4 (Thermo Fisher Scientific, CША).

- 485
- 486 ПЦР проводили с использованием обратного праймера
- 487 (k-rev) 5'-CATATTCGTCCACAAAATGATTCTG-3',
- 488 зонда 5'-FAM-CTGTATCGTCAAGGCACTCTTGC-BHQ1-3' и
- 489 серии прямых праймеров 5'-AAACTTGTGGTAGTTGGAGXXXX-3' (Таблица 3), где XXXX 490 — четыре нуклеотида с 3'-конца праймера, которые представлены в тексте как аббревиатура 491 всего праймера. Выделенные жирным шрифтом нуклеотиды представляют собой 492 несовпадающие нуклеотиды по отношению к последовательности ДНК дикого типа. В каждом 493 ПЦР-планшете в качестве эталонного праймера (k-ref) использовали прямой праймер 5'-494 GACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTG-3' для сравнения данных между различными ПЦР-495 экспериментами. Соответствующие значения ΔCq были рассчитаны и использованы для 496 дальнейшего анализа эффективности работы праймера.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

499 В данной работе впервые были получены новые аналоги олигонуклеотидов, несущие 500 *N*-бензоазольные фосфорамидные группы по межнуклеотидным фосфатам - фосфорамидные 501 азольные олигонуклеотиды (ФАО). Эти аналоги олигонуклеотидов были получены в процессе 502 автоматического или полуавтоматического фосфитамидного метода синтеза с заменой стадии 503 окисления йодом на реакцию Штаудингера с азидами бензоазолов. Были изучены физико-504 химические (гидрофобность, термическая стабильность и т.д.) свойства данного нового класса 505 нуклеиновых кислот. ФАО были исследованы на предмет их применения в биомедицинских 506 приложениях. Была показана перспективность использования новых олигонуклеотидов в 507 качестве праймеров для выявления однонуклеотидных полиморфизмов.

508 3.1. Дизайн новых фосфорамидатных модификаций олигонуклеотидов.

509 Ключевым подходом, давшем широкий спектр модифицированных 510 олигонуклеотидных аналогов, является замещение немостикового атома кислорода в 511 фосфатной группе. Этот атом кислорода может быть заменен на серу для получения 512 фосфоротиоатных [25] олигонуклеотидов (1, Схема 1), на борано-группу для получения 513 боранофосфатных олигонуклеотидов (2, Схема 1). Благодаря сохранению отрицательного 514 заряда на каждой межнуклеотидной фосфатной группе, эти производные являются наиболее 515 близкими аналогами природных олигодезоксирибонуклеотидов. Другой важной 516 модификацией является замена кислорода на углерод (3, Схема 1), прежде всего на метильную 517 группу [26]. Олигонуклеотиды, содержащие такие неионные связи, особенно устойчивы к 518 действию нуклеаз. С другой стороны, потеря отрицательного заряда приводит к плохой 519 растворимости и агрегации олигомеров в водных растворах. Кроме того, были синтезированы 520 другие производные, такие как фенилфосфонаты и пиридилфосфонаты (4, Схема 1) [27, 28], а 521 также триазолилфосфонаты (5, Схема 1). Последние получают из алкинилфосфонатов с 522 помощью «клик»-реакции [29]. Присоединение фосфора к ароматической системе делает 523 олигонуклеотиды еще более устойчивыми к действию нуклеаз, вероятно, благодаря большим 524 стерическим препятствиям.



527 Схема 1 Структуры ДНК с немостиковыми кислородными модификациями в фосфатной группе. (R₆
 528 отсутствует или представляет собой - Н или - С₁₋₁₀-алкил; R₇ отсутствует или представляет собой 529 С₁₋₁₀-алкил)

530 Однако фосфорамидаты (6, Схема 1) являются наиболее распространенными 531 модифицированными олигонуклеотидами. Немостиковый атом кислорода в них заменен на 532 азот для получения различных производных, начиная с алкилфосфорамидатов [30], 533 триазинилфосфорамидатов [31] и фосфорамидатов с катионными заместителями [32], в том 534 числе содержащих гуанидиновые группы [33]. Фосфорилгуанидины (7, Схема 1) [34] 535 близки к фосфорамидатам, отмечалась перспективность сочетания структурно 536 фосфорилгуанидиниевых модификаций с фосфоротиоатными для различных терапевтических 537 применений, а в 2021 году в клинические испытания поступили как минимум три 538 стереорегулярных олигонуклеотида со смешанной основой фосфоротиоат-фосфорилгуанидин 539 [35]. практически группа модификаций -Еще одна ценная замещенные 540 сульфонилфосфорамидаты (8, Схема 1), среди которых мезилфосфорамидаты (R = CH₃) 541 оказались перспективными для замены фосфоротиоатных групп в АСО [12]. Такие 542 модифицированные олигонуклеотиды показали значительные преимущества перед обычно 543 используемыми фосфоротиоатами по сродству к РНК, нуклеазной стабильности и 544 специфичности антисмыслового действия [6]. Способ синтеза как фосфорилгуанидинов, так и 545 мезилфосфорамидатов, включает в себя реакцию между динуклеозид-β-цианэтилфосфитом и 546 соответствующим органическим азидом (по реакции Штаудингера) в процессе 547 амидофосфитного олигонуклеотидного синтеза.

548 В данной работе впервые предложены новые аналоги олигонуклеотидов, несущие *N*549 бензоазольные фосфорамидные группы по межнуклеотидным фосфатам - фосфорамидные
550 азольные олигонуклеотиды (ФАО) (9, Схема 1).

551 При разработке модификации мы исходили из следующих принципов:

- Модификация должна удовлетворять условиям реакции Штаудингера в процессе
 твердофазного олигонуклеотидного синтеза. Модифицирующая группа должна быть
 стабильна на всех этапах синтеза и очистки, эффективно встраиваться в структуру
 олигонуклеотида и не влиять на последующие стадии синтеза, в том числе на другие
 модификации олигонуклеотида.
- Введение фосфорамидной бензоазольной группы вместо одного из атомов кислорода
 значительно увеличит объем заместителя при атоме фосфора, что может положительно
 сказаться на нуклеазной устойчивости ФАО.
- Возможно структурное разнообразие за счет изменения заместителей X в бензоазольной группе (9, Схема 1), с контролируемым изменением свойств олигонуклеотида при одинаковых условиях химического синтеза и очистки фосфорамидных азольных олигонуклеотидов. Были выбраны: N-бензимидазольная и N-1,3-диметилбензимидазольная (X=N) модификации, последняя является более объемным и гидрофобным аналогом ФГ-группы; N-бензоксазольная X=O и Nбензотиазольная X=S группы.
- 3амена природных фосфатных групп фосфорамидными бензоазольными группами
 может происходить с сохранением частичного отрицательного заряда (X=O, S), в
 отличие от ΦГО.
- 570 5. Предполагается химическая устойчивость бензоазольных групп в широком диапазоне
 571 pH.
- 572 6. Опционально, возможно улучшение опосредованного рецепторами 573 (эндоцитотического) проникновения модифицированных олигонуклеотидов в клетки 574 счет повышенной гидрофобности ΦΑΟ по сравнению с за нативными 575 олигонуклеотидами и ФГО.
- 576
 7. Опционально, возможно сохранение остатка дезоксирибозы для поддержания
 577 субстратной специфичности, например, РНКазы Н при возможной модификации
 578 участков последовательности путем введения модифицированных бензоазольных
 579 нуклеотидов или других аналогов нуклеотидов.

580 8. Опционально, присоединение фосфора через азот к ароматической системе делает
581 возможным появление флуоресцентных свойств у полученного олигонуклеотида.

582 3.2. Синтез азидов.

583 Для синтеза новых фосфат-модифицированных олигонуклеотидов были получены
584 соответствующие азидо-реагенты: 2-азидобензимидазол - 1, 2-азидобензоксазол - 2 и 2585 азидобензотиазол - 3, 2-азидо-1,3-диметилбензимидазол гексафторфосфат - 4.

586 Азиды 1-3 были синтезированы в одну стадию из соответствующих хлоридов (Схема 2)
587 по методике, предложенной в [15] с незначительными изменениям (см. п. 2.2.1. Материалы и
588 методы).



589

 590 Схема 2. Синтез азидомодификаторов:2-азидобензимидазола 1, 2-азидобензоксазола 2 и 2азидобензотиазола 3.

592 2-Азидо-1,3-диметилбензимидазол гексафторфосфат (АДМБИ) 4 получали в три
593 стадии из 2-гидроксибензимидазола по описанным методам [21, 36] (Схема 3, см. п. 2.2.2.
594 Материалы и методы).



596 Схема 3. Синтез 2-азидо-1,3-диметилбензимидазол гексафторфосфата (АДМБИ) 4.

597 Образование азидов было подтверждено с помощью ИК, УФ и ЯМР-спектроскопии,
598 которые соответствовали ранее опубликованным данным [13–15, 19, 21, 36].

599 **3.2.1.** Исследование реакционной способности азидов с трехвалентным фосфором 600 (реакция Штаудингера) на примере 3'-фосфиттриэфира тимидина.

601 На первом этапе исследования было важно показать возможность окисления 602 трехвалентного фосфора по реакции Штаудингера синтезированными азидами. Реакции азидов 1–4 с триэфиром проводили под контролем ³¹Р ЯМР, как описано ранее [22] (Схема 4). 603 Первоначально фосфорамидит 5'-О-диметокситритил-тимидин-3'-цианэтил был преобразован 604 в триэфир фосфита. На спектре ³¹Р ЯМР химический сдвиг атома фосфора в фосфорамидите 605 близок к 148 м.д., а для триэфира фосфита это значение было близко к 139 м.д. Реакция 606 607 промежуточного фосфитного продукта с азидами 1-4 протекала очень быстро; через 5 мин 608 сигналы от фосфора (III) исчезают во всех случаях, что говорит о полном превращении P(III) в P(V). Визуально это превращение характеризуется появлением желтоватого цвета раствора, 609 610 который исчезает через несколько минут. Для иминофосфорана 5.1–5.3 значение $\delta(^{31}P)$ достигает 4.5–5.6 м.д. и для 5.4–10.9 м.д. Добавление основания (триэтиламна) к реакционной 611 612 смеси, содержащей иминофосфоран 5, превращает его в соответствующее фосфорильное производное 6 по реакции β -элиминирования. Значение $\delta(^{31}P)$ для 6.1–6.3 близок к значению 613 614 от 4.4 до 5.5 м.д.; для 6.4 значение $\delta(^{31}P)$ составляет –3.1. Успешные результаты эксперимента 615 позволили перейти к изучению модификации олигонуклеотидов азидами.



617 *Схема 4. Механизм реакции Штаудингера исследуемых азидов 1–4 с тимидинамидофосфитом^а.*

^a(i) Ацетонитрил, изопропиловый спирт, этилтиотетразол, 30 °C, 10 мин.; (ii) ацетонитрил, азиды 1–4,
комнатная температура, 5 мин; (iii) триэтиламин, комнатная температура, 10 мин. Для соединений,
характеризуемых ЯМР, подписаны характерные химические сдвиги или их диапазоны для ядра ³¹Р.

621 3.2.2. Определение вклада модифицирующей группы в коэффициент экстинкции 622 олигонуклеотида.

Для определения вклада модифицирующей группы в коэффициент экстинкции 623 624 модифицированных олигонуклеотидов был синтезирован бисизопропилбензотиазол-2-ил-625 фосфорамидат 7 (как наиболее близкий по структуре к бензоазольной модификации) (Схема 626 Коэффициент экстинкции *N*-бензотиазол-модифицирующей 5). группы определяли 627 гравиметрически по УФ-спектру 7 (С = 80 мкМ, 50% EtOH-H₂O): є = 7125 (260 нм). Было 628 принято допущение, что вклад в коэффициент экстинкции N-бензотиазола. N-бензоксазола, N-629 бензимидазола и 1,3-диметил-*N*-бензимидазола был примерно одинаковым.



630

Схема 5. Схема синтеза бисизопропилбензотиазола-2-ил-фосфорамидата 7.



635 Рисунок 1). Понижение pH раствора приводит к увеличению интенсивности сигнала от
636 бензотиазольной группы, а также к более выраженным пикам на длине волны 285 и 295 нм.
637 Данный факт можно связать с протонированием модифицирующей группы.



638

639 Рисунок 1. УΦ-спектры бисизопропилбензотиазол-2-ил-фосфорамидата 7 (Схема 5) в растворах с
 640 различными значениями pH (C=1.57x10⁻⁴ M).

641 3.3. Синтез модифицированных олигонуклеотидов.

642 **3.3.1.** Модификация модельного Т6-олигонуклеотида по реакции Штаудингера с 643 использованием бензоазольных азидов.

644 Первоначально модификацию вводили по последнему межнуклеотидному фосфату
645 вблизи 5'-конца олигонуклеотида Т6 (Схема 6) в полуавтоматическом режиме. На последнем
646 этапе автоматического синтеза вместо реакции окисления проводили реакцию Штаудингера
647 (вручную в пробирке, см. п.2.3. в Материалы и методы).





651 концентрированный водный NH₃. B^P – азотистое основание с защитными группами, В — азотистое
 652 основание.

Выход продукта после реакции Штаудингера составил >95% для всех азидов по данным
аналитической ОΦ-ВЭЖХ (Рисунок 2). Как видно из представленных хроматограмм,
модификации носят гидрофобный характер: наименее гидрофобная модификация –
бензимидазольная (время удерживания (τ_R) 9.2 мин), затем бензотиазольная (τ_R 9.5 мин),
бензоксазольная (т_R 10.1 мин), и наиболее гидрофобная – диметилбензимидазольная (т_R 10.4
мин).



659

660 Рисунок 2. Профили элюции ВЭЖХ реакционных смесей для олигонуклеотида (красный) ТТТТТТ без
 661 модификации, (фиолетовый) Т^NТТТТТ – *N*-бензимидазол, (синий) Т^SТТТТТ – *N*-бензотиазол,
 662 (зеленый) Т^OТТТТТ – *N*-бензоксазол и (черный) Т^DТТТТТ – 1,3-диметил-*N*-бензимидазол
 663 фосфорамидные группы.

664 На профилях ВЭЖХ наличие одного хирального центра на атоме фосфора для 665 модифицированных олигонуклеотидов может выглядеть как разделение на два пика 666 диастереомеров: Rp (быстрый продукт) и Sp (медленный продукт), что мы и наблюдаем при 667 введении N-бензотиазольной и 1,3-диметил-N-бензимидазольной модификации. В случае N-668 бензимида/оксазольных модификаций разделения не наблюдается, что подтверждает гипотезу 669 о незначительной разнице между собой гидрофобности диастереомерных олигонуклеотидов. 670 Структуры модифицированных олигонуклеотидов были подтверждены с помощью масс-671 спектров ESI реакционных смесей (№ 1-4 Таблица 1). Масс-спектрометрический 672 реакционных смесей обоих диастереомеров показал наличие только пиков, соответствующих 673 массе одного модифицированного олигонуклеотида (Таблица 1), что подтверждает 674 диастереомерную природу двух пиков на ОФ-ВЭЖХ.

675 **3.3.2.** Автоматический синтез модифицированных олиготимидилатов с 676 использованием азидов 1–4.

677 Исследована возможность синтеза олигомеров с одиночной и множественной 678 модификациями В Синтез немодифицированной автоматическом режиме. части 679 олигонуклеотидов проводили по стандартному твердофазному амидофосфитному протоколу 680 синтеза. Для модифицированных олигонуклеотидов стадию окисления в синтетическом 681 протоколе заменяли реакцией Штаудингера с азидами *N*-бензоазолов. Исследованные *N*-682 бензоазольные фосфорамидные группы были стабильны в условиях синтеза ДНК, включая 683 удаление диметокситритильной защиты под действием трихлоруксусной кислоты и удаление 684 остальных защитных групп, включая отщепление от полимера в течение 18 ч в растворе 685 концентрированного водного аммиака. Масс-спектры реакционных смесей синтезированных 686 Т6-олигонуклеотидных последовательностей с одной и двумя модификациями в различных 687 положениях, подтверждают структуру и хорошую чистоту полученных олигонуклеотидов (№ 688 5-10, **Таблица** *1*).

689 Исследована возможность автоматического синтеза модифицированных 690 гетеронуклеотидных последовательностей с одиночной И множественными N-691 бензотиазольной модификациями. В процессе автоматического синтеза в 10-звенный 692 олигодезоксирибонуклеотид, содержащий нуклеотиды G, C и A, вводили по одной 693 бензотиазольной группе вблизи 5'-, 3'-концов, и в середине, а также пять бензотиазольных 694 групп. Структуры олигонуклеотидов № 11–14 (**Таблица** *I*) были подтверждены с помощью 695 масс-спектрометрического анализа. Выход множественно-модифицированного 696 олигонуклеотида 14 определяли по профилю элюции реакционной смеси методом ОФ-ВЭЖХ, 697 который составил~72% (Рисунок 3).



699 Рисунок 3. Профили элюции ВЭЖХ реакционных смесей для олигонуклеотида № 15 (красный) без
 700 модификации и № 14 (синий) с множественной *N*-бензотиазольной модификацией.

3.3.3. Оптимизация условий автоматического синтеза фосфорамидных азольных 702 олигонуклеотидов (ФАО).

703 Избыточная концентрация азида-модификатора приводит к нерациональному 704 использованию реактива и удорожания синтеза, а длительное время окисления увеличивает 705 время синтеза модифицированных олигонуклеотидов, особенно в случае введения 706 множественных модификаций и синтеза протяженных цепей. Поэтому на примере *N*-707 бензоксазольной модификации была проведена оптимизация методики автоматического 708 синтеза модифицированных олигонуклеотидов. Был синтезирован набор олиготимидилатов 709 Т6 с модификацией фосфата вблизи 5'-конца. Изначально было показано, что использование 710 0.25 М раствор азида для окисления фосфата по реакции Штаудингера в течение 40 мин 711 является достаточным для высокого выхода ФАО. Мы варьировали концентрацию азида: 0.15 712 M, 0.1 M, 0.05 M и 0.01 M; а также время окисления: от 10 до 40 мин с шагом в 10 мин и 713 оценивали полноту модификации олигонуклеотида с помощью ОФ-ВЭЖХ (

714

715

721

722

723 Таблица 4.

⁷¹⁶**Таблица 4, Рисунок 4**). На хроматографических профилях реакционных смесей возникновение пиков со временем
удерживания на колонке (τ_R) 11.7 и 12.1 мин в дополнение к основным пикам с $\tau_R \sim 14.5$ мин при снижении концентрации азида
или времени реакции свидетельствует о неполном прохождении реакции Штаудингера (Рисунок 4). При количественном
анализе хроматограмм рассчитывали выход модифицированного олигонуклеотида, как отношение площади пика с временем
удерживания 14.1 – 15.6 мин к суммарной площади пиков с 11.4 до 15.6 мин. Результаты анализа представлены в



725 Рисунок 4. Профили элюции ВЭЖХ реакционных смесей для 5'-Т^оТТТТТ-3' с различной концентрацией азида и временем окисления. Время стадии окисления соответствует цвету линии: 40 мин - черный, 30 мин - синий, 20 мин - зеленый, 10 мин - красный. Хроматограммы, соответствующие 30, 20 и 10 мин окисления, сдвинуты по оси х на 1, 2 и 3 мин, соответственно, а по оси у - для удобства визуализации.

- 730
- 731
- 732

733 Таблица 4. Процент выхода продукта в зависимости от времени окисления и концентрации азида.

	0.15 M	0.1 M	0.05 M	0.01 M
10 мин	94.10%	86.60%	н/д *	н/д
20 мин	97.90%	97.20%	85.90%	н/д
30 мин	97.20%	98.80%	95.90%	36.00%
40 мин	98.10%	98.70%	97.60%	45.10%

- 134 Цветами в таблице обозначены выход модифицированного олигонуклеотида: выше 95% зеленый, 85 135 95% желтый, ниже 85% красный.
- 736 Исходя из данных, приведенных в
- 737
- 738
- 739 Таблица 4 мы выбрали оптимальное время окисления и концентрацию азида: 0.1 М и 20 мин.
- 740 Таким образом, на примере азида *N*-бензоксазола мы показали, что оптимизация протокола

741 синтеза ФАО позволяет не только снизить расход реагентов в 2.5 раза, но и сократить время
742 на введение каждой модификации на 20 мин.

743 3.4. Исследование физико-химических свойств ФАО.

750

744 3.4.1. Исследование зарядовых состояний ФАО методом задержки в геле.

Электрофоретический анализ реакционных смесей модифицированных
олигонуклеотидов (№ 1-5 *Таблица 1*) проводили в денатурирующем полиакриламидном геле
при различных рН: 4.5, 8.3 и 10 (Рисунок 5 А-В). Визуализацию проводили окрашиванием геля
красителем Stains-All. На Рисунок 5 видно, что в реакционной смеси практически нет
побочных продуктов, и введение модификаций происходило во всех случаях.

				А		.04					4		Б							16		В	1		•		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
-44	-	-	-	-	Ξ	-	Ξ			-	-	_	-	-	_	-	-	-	-	-	-		٠	-	-	-	į
. 7									-	-		-				-		-	-		1			-	1		

751Рисунок 5. Электрофоретический анализ подвижности реакционной смеси модифицированных752олигонуклеотидов в 20% денатурирующем геле: (A) pH 4.5, (Б) pH 8.3, (В) pH 10. (дорожка 1) 5'-753ТТТТТТ-3', (дорожка 2) 5'-T^NTTTT-3', (дорожка 3) 5'-T^OTTTTT-3', (дорожка 4) 5'-T^STTTTT-3',754(дорожка 5) 5'-T^DTTTTT-3', (дорожка 6) 5'-TTTTT^NT-3', (дорожка 7) 5'-TTTTT^OT-3', (дорожка 8) 5'-755ТТТТТ^ST-3' и (дорожка 9) 5'-T^STTTT^ST-3'.

756 Модифицирующая группа диметилбензимидазола (ДМБИ) приводит к получению 757 незаряженного нуклеотида, аналогичного диметилимидазолу [34]. При этом данная группа 758 близка по массе и структуре к *N*-бенз(имида/окса/тиа)зольным группам. Поскольку 759 гомотимидилаты, модифицированные *N*-бензимидазольной группой (дорожка 2 и 6), имеют 760 такую же подвижность во всех исследуемых значениях рН, как гомотимидилат, 761 модифицированный ДМБИ группой (дорожка 5), можно сделать вывод, что бензимидазольная 762 группа также является незаряженной в диапазоне pH 4.5-10. *N*-Бензокса/тиазольные группы 763 также становятся незаряженными при понижении pH до 4.5, о чем свидетельствует одинаковая 764 подвижность всех одиночно модифицированных гексатимидилатов в данном pH. 765 Дополнительно этот факт также подтверждается изменениями спектров поглощения при



(

780

Рисунок 1).

769 Поскольку модифицированные олигонуклеотиды обладают меньшей подвижностью в 770 ПААГ по сравнению с немодифицированным Т6 (*Рисунок 5* Б), и большей подвижностью, чем 771 гомотимидилат, модифицированный ДМБИ группой, можно предположить, что они являются 772 частично протонированными (дорожки 3, 4, 7, 8 и 9, Рисунок 5 Б). При рН 10 N-773 бензокса/тиазольные группы депротонируются и их подвижность становится одинаковой 774 (Рисунок 5 В).

775 Нужно отметить, что подвижность одиночно модифицированных олиготимидилатов 776 зависит не только от структуры модифицирующей группы, но также зависит от ее 777 локализации, например, вблизи 5'- и 3'концов для бензотиазольной группы при рН 8.3 778 (дорожки 4 и 8, Рисунок 5 Б).

779 3.4.2. Исследование химической стабильности ФАО в кислых гидролитических условиях.

Проведена оценка стабильности модифицированных групп олигонуклеотидов № 1-3 781 (Таблица 1) к кислотному гидролизу при рН 1 (1H HCl) при 37 °С в течение 1 ч. Профили 782 элюции ОФ-ВЭЖХ обработанных олигонуклеотидов показали, что они практически не 783 подвержены кислотному гидролизу (Рисунок 6). Таким образом, исследуемые модификации 784 можно вводить в различные положения олигонуклеотида, а также использовать разные 785 условия детритилирования в синтетическом протоколе синтеза. Полученные аналоги также 786 могут быть перспективными для биомедицинских применений.



787

788 Рисунок 6. ВЭЖХ профили элюций до и после обработки модифицированных олигонуклеотидов при
 789 рН 1.

790 3.4.3. УФ поглощение ФАО и флуоресцентные свойства.

Спектры поглощения в УФ-видимом диапазоне модифицированных олигонуклеотидов
№ 1–3, 5–8 (Таблица 1) (С = 10 мкМ) и № 14 (Таблица 1) (С = 4.7 мкМ) были зарегистрированы
в воде (Рисунок 7). Как и ожидалось, спектры модифицированных олигонуклеотидов, по
сравнению с исходными Т6, содержат полосы поглощения соответствующей бензоазольной
гетероциклической системы (здесь для азидов данные не приведены) в виде слабо или хорошо
очерченного плеча (Амакс 283, 294 нм). Увеличение числа модификаций в олигонуклеотидах
(№ 5, 7, 8 и 14, Таблица 1) приводит к более выраженному плечу в спектре.



798

799 Рисунок 7. Спектры поглощения ФАО в УФ-видимом диапазоне.

800 Олиготимидилаты, модифицированные бензотиазолом, способны флуоресцировать, 801 Спектры флуоресценции регистрировали хоть и с низкой эффективностью. для 802 олигонуклеотидов № 3 (и 6 (Таблица *1*) модификацией c одной (





804 Рисунок 8, А) и для олиготимидилатов № 5, 7 и 8 (*Таблица 1*) с двумя модификациями на (





6 **Рисунок 8**, Б).



807

808 **Рисунок 8.** Спектры испускания флуоресценции олигонуклеотидов: (А) с одной модификацией 809 бензотиазола (№ 3 и 6, Таблица 1), $\lambda_{воз6} = 350$ нм; (Б) с двумя модификациями бензотиазола (№ 5, 7 и 810 8, Таблица 1), $\lambda_{воз6} = 315$ нм. Спектры регистрирровали в 50% EtOH (C=0.1 мМ).

811 Выявлены следующие закономерности: 1) интенсивность флуоресценции выше при 812 введении одиночной модификации вблизи 3'-концевого межнуклеотидного фосфата (λ_{B036} = 350 813 нм, λ_{HCII} = 418 нм, а I = 25 отн.ед.), чем вблизи 5'-концевого; 2) введение двух модификаций 814 приводит к увеличению интенсивности флуоресценции, вне зависимости от взаимного 815 расположения обеих модификаций (λ_{B036} = 315 нм, λ_{HCII} = 420 нм, а I = 34 отн.ед.).

816 Исходя из полученных данных, можно предположить, что *N*-бензоазол фосфорамидные
817 фрагменты могут быть дополнительно исследованы и модифицированы с целью улучшения
818 их флуоресцентных свойств.

819 3.4.4. Исследование термической денатурации ФАО.

820 Исследована возможность и эффективность образования комплексов
821 модифицированных олигонуклеотидов с ДНК. Поскольку гексатимидилаты не образуют
822 устойчивых комплексов с комплементарной цепью ДНК, мы решили рассмотреть их

823 тандемные комплексы с dA₁₂ и poly(dA). Наличие кооперативного контакта между 824 дуплексными структурами в месте одноцепочечного разрыва стабилизирует тандемные 825 комплексы [37]. В случае образования комплексов с полимерной цепью должен 826 образовываться более термостабильный комплекс за счет бо́льшего вклада кооперативных 827 взаимодействий.

Эксперименты по исследованию термической стабильности комплексов проводили в стандартных буферных условиях (1M NaCl, 10 мM CacNa, pH 7.2) и эквимолярных количеств нуклеотидов dA и dT, которые должны приводить к преимущественному образованию двухцепочечной ДНК. Кривые термической денатурации во всех случаях имеют один переход и одинаковы на разных длинах волн. Все вышеперечисленные факты свидетельствуют о формировании тандемных комплексов [37]. Температуры плавления (Tnn) комплексов гексамеров, модифицированных вблизи 5'-конца с додекамерной цепью, находятся в диапазоне 9–11 °C. Это немного ниже, чем термостабильность нативной цепи, которая составляет 14 °C, что согласуется с ранее опубликованными данными [37]. При этом точность определяемых значений температур плавления невысока из-за отсутствия низкотемпературной базовой линии. Для более достоверного анализа исследована термостабильность тандемных комплексов гексамеров с полимерной цепью роly(dA). Тенденции термической стабильности нативных и модифицированных комплексов с dA12 и poly(dA) одинаковы (

- 838
- 839
- 840
- 841
- 842
- 843
- -
- 844
- 845
- 846

847

848 Таблица 5). Введение одной модификации *N*-бензотиазола в гексамер вблизи 5'- или 849 3'-конца снижает его термостабильность в таком комплексе с 22 °С (для немодифицированной 850 цепи) до ~17.5 °C. Введение двух *N*-бензотиазольных модификаций в олигонуклеотид 851 приводит к снижению температуры плавления до 13°C, что указывает на почти аддитивный 852 эффект от вводимой модификации. Одна N-бензимидазольная модификация вблизи 5'- или 3'-853 конца значительно снижает стабильность до ~13.5 °C. Модификации *N*-бензоксазола вблизи 5'- или 3'-конца по-разному влияют на термостабильность: в первом случае снижение 854 855 минимально — на 4 °C, а во втором более значимо - на 9 °C. Полученные данные 856 свидетельствуют о том, что введение этих модификаций снижает термостабильность 857 комплементарных комплексов в стандартных условиях, причем величина снижения зависит 858 как от типа модификации, так и от ее положения.

870 Таблица 5. Термодинамическая стабильность комплексов модифицированных и
 871 соответствующих нативных олигонуклеотидов

No	5'-3' олигонуклеотидная		Tпл, °C	ra Ź						
	последовательность	dA ₁₂	Poly	(dA)						
T6	TTTTTT	14.0 ± 1.0)	21.9	± 0.2					
1	T ^N TTTTT	9.0 ± 1.0		13.7	± 1.0					
2	T ^O TTTTT	10.0 ± 1.0)	17.9	± 0.1					
3	T ^S TTTTT	11.0 ± 1.0)	17.3	± 0.4					
4	TTTTT ^S T			17.8	± 0.1					
5	T ^S T ^S TTTT			13.4	± 0.9					
6	TTTT ^S T ^S T			13.0	± 0.8					
7	T ^S TTTT ^S T			13.1	± 0.8					
8	TTTTT ^N T			13.3	± 0.7					
9	TTTTT ^O T			13.0	± 1.5					
	ДНК/ДНК ^б									
		$\Delta \mathrm{H}^{\circ}$, ккал/моль	ΔG°_{37} , k	кал/моль	Tпл, °C					
10	GCGCCAAACA	-77.7 ± 0.9	-12.8	3 ± 0.1	61.5 ± 0.1					
11	G ^S CGCCAAACA	-74.5 ± 0.8	-11.7	7 ± 0.1	57.5 ± 0.1					
12	GCGCC ^S AAACA	-74.8 ± 1.9	-11.4	4 ± 0.1	56.1 ± 0.1					
13	GCGCCAAAC ^S A	-75.8 ± 0.6	-12.0	0 ± 0.0	58.7 ± 0.1					
14	G ^S CG ^S CC ^S AA ^S AC ^S A	-35.9 ± 9.0	-6.3	± 0.1	30.5 ± 0.6					
		ДНК/РНК ^в								
		$\Delta { m H}^{\circ}$, ккал/моль	ΔG°37, 1	ккал/моль	T _{пл} , °C					
15	GCGCCAAACA	-80.4 ± 0.7	-11.5	5 ± 0.1	55.1 ± 0.2					
16	G ^S CGCCAAACA	-74.1 ± 4.8	-10.4	$4\pm\overline{0.2}$	51.7 ± 0.1					
17	GCGCC ^S AAACA	-65.7 ± 0.4	-9.6	± 0.1	49.2 ± 0.1					
18	GCGCCAAAC ^S A	-76.0 ± 3.1	-10.8	3 ± 0.1	52.9 ± 0.1					
19	G ^S CG ^S CC ^S AA ^S AC ^S A	-40.7 ± 0.3	-5.4	± 0.1	24.2 ± 0.2					

872 873	^а Температуры плавления комплексов измеряли в 1M NaCl, 10 мМ CacNa, pH 7.2, при концентрации ЛНК ценей 0.1 мМ/нт
874 875	⁶ Термическая стабильность комплексов с комплементарным олигонуклеотидом 5'-TGTTTGGCGC-3'
875 876	при концентрации 20 мкМ (0.2 мМ/нт). ^в Термостабильность комплексов с комплементарным опигорибонуклеотилом 5'-UGUUUGGCGC-3'
877	при концентрации 5 мкМ (0.05 мМ/нт) и при концентрации 10 мкМ (0.1 мМ/нт) для олигонуклеотида
878	с множественной модификацией.
879	Для определения термодинамических эффектов, связанных с введением модификаций,
880	изучены дуплексы додекамеров гетеронуклеотидного состава. Исследованы дуплексы с одной
881	N-бензотиазольной модификацией в области 5'-, 3'-конца или в центре цепи (
882	
883	
884	
885	
886	
887	
888	
889	
890	
891	
892	Таблица 5, № 11–13) и такой же нативный дуплекс. Снижение термической
893	стабильности дуплекса на 5 °C в случае модификации вблизи 5'-конца, на 5.4 °C в случае
894	срединной модификации и на 2.8 °С в случае 3'-концевой модификации указывает на

3ависимость термодинамического эффекта от нуклеотидного шага, в который введена
модификация. Наблюдались небольшие изменения величин термодинамических параметров.
Изменение свободной энергии Гиббса отличается от нативного дуплекса на 1.1, 1.4 и 0.8
ккал/моль в случае 5'-концевой, средней и 3'-концевой модификаций соответственно. Данные
изменения в энергии Гиббса имеют как энтальпийный, так и энтропийный вклады (

Таблица 5). Для определения термодинамических эффектов, связанных с множественными модификациями олигонуклеотида, исследовали одну цепь, содержащую пять Nбензотиазольных модификаций (№ 14, Таблица 5), и такой же нативный дуплекс (№ 10,

935 Таблица 5). Влияние множественных модификаций, введенных через один фосфат) в
936 10-звенной цепи на стабильность комплекса было значительным. Снижение температуры
937 плавления такого комплекса происходит почти на 30 °C. Термодинамический эффект имеет
938 как энтальпийный, так и энтропийный вклады. Увеличение энтальпии с -77.7 до -35.9
939 ккал/моль и свободной энергии Гиббса на 6.8 ккал/моль для ДНК с множественными
940 модификациями весьма существенно.

941 Аналогичные тенденции наблюдались и для комплексов модифицированных
942 гетеронуклеотидных олигомеров с РНК. Снижение Т_{пл} комплексов с одной модификацией на
943 5'-конце, в середине и на 3'-конце составило 3.5, 6.0 и 2.3 °C соответственно. Пять
944 модификаций снижают термическую стабильность на 30.9 °C. Увеличение энтальпии с -80.7
945 до -40.7 ккал/моль и изменение свободной энергии Гиббса на 6.1 ккал/моль почти такие же,
946 как у дуплексов с ДНК для олигомера с пятью модификациями.

947 3.4.5. Исследование термической денатурации в условиях с различной ионной силой.

На примере *N*-бензотиазольных множественно модифицированных олигонуклеотидов исследовали термическую стабильность дуплексов, содержащих модификации либо в одной, либо в другой цепи в зависимости от ионной силы раствора, количества модификаций и их расположения в цепи ФАО (олигонуклеотиды № 14, 17, 18 Таблица 1). Как известно, снижение ионной силы растворов приводит к снижению температуры плавления дуплексов [38]. Так, мы наблюдаем на гистограмме (Рисунок 9), что для нативного дуплекса происходит снижение температуры плавления с 60.9 °С в 1 М NaCl до 38 °С в 10 мМ СасNa (Величины термодинамических параметров формирования дуплексов, определенные из кривых термической денатурациив рамках приближения модели двух состояний представлены в Ошибка! Неверная ссылка закладки..

972 Таблица 6). Для нативного комплекса наблюдается увеличение термической
973 стабильности при увеличении ионной силы раствора.



975 Рисунок 9. Термическая стабильность ФАО/ДНК и ДНК/ФАО дуплексов в зависимости от буферных
 976 условий. * - положение *N*-бензотиазольной модификации в олигонуклеотидной цепи.

977 Величины термодинамических параметров формирования дуплексов, определенные из
978 кривых термической денатурациив рамках приближения модели двух состояний
979 представлены в Ошибка! Неверная ссылка закладки..

Таблица 6. Термодинамические параметры формирования комплементарных ФАО/ДНК и ДНК/ФАО дуплексов в условиях различной ионной силы раствора. Концентрация дуплексов 40 мкМ.

10 мМ CacNa									
	Δ S° ,	ΔH°,	ΔG°_{37} ,	Т _{пл} , °С					
	кал/(моль*К)	ккал/моль	ккал/моль						
DM01/DN01	-221 ± 10	-76.2 ± 3.3	-7.55 ± 0.07	38.8 ± 0.2					
DM01/DN01-2,4,6,8 S	-162 ± 15	-53.9 ± 4.4	-3.76 ± 0.19	18.9 ± 0.5					
DM01/DN01-3,5,7,9 S	-164 ± 9	-54.2 ± 2.7	-3.53 ± 0.23	17.9 ± 0.3					
DM01-1,3,5,7,9 S/DN01	-162 ± 6	-53.9 ± 1.7	-3.66 ± 0.15	18.4 ± 0.5					
	100 мМ Na	Cl; 10мМ CacNa							
	Δ S° ,	ΔH°,	ΔG° 37,	Т пл, °С					
	кал/(моль*К)	ккал/моль	ккал/моль						
DM01/DN01	-222 ± 1	-80.0 ± 0.4	-11.15 ± 0.06	53.6 ± 0.3					
DM01/DN01-2,4,6,8 S	-170 ± 4	-58.9 ± 1.5	-6.13 ± 0.33	32.0 ± 1.8					
DM01/DN01-3,5,7,9 S	-183 ± 18	-62.4 ± 5.4	-5.85 ± 0.10	30.9 ± 0.1					
DM01-1,3,5,7,9 S/DN01	-135 ± 6	-47.3 ± 2.0	-5.58 ± 0.13	27.3 ± 1.0					
	1 M NaCl	; 10мM CacNa							
	Δ S°,	ΔH°,	ΔG°_{37} ,	Т пл, °С					
	кал/(моль*К)	ккал/моль	ккал/моль						
DM01/DN01	-225 ± 5	-82.8 ± 1.8	-13.03 ± 0.14	60.9 ± 0.1					
DM01/DN01-2,4,6,8 S	-122 ± 5	-44.6 ± 1.4	-6.73 ± 0.06	34.5 ± 0.4					
DM01/DN01-3,5,7,9 S	-114 ± 15	-41.7 ± 4.6	-6.31 ± 0.10	$\overline{31.2\pm0.2}$					
	-80 ± 6	-30.7 ± 1.9	-6.00 ± 0.09	26.3 ± 0.4					

Для модифицированных олигонуклеотидов наблюдается такая же тенденция снижения температуры плавления при понижении ионной силы, однако эффект менее выражен. Так, для дуплексов, содержащих 4 модификации, термическая стабильность снижается на 15.3 °С в случае дуплекса DM01/DN01-2,4,6,8 S и на 13.3 °C для дуплекса DM01/DN01-3,5,7,9 S (Величины термодинамических параметров формирования дуплексов, определенные из кривых термической денатурациив рамках приближения модели двух состояний представлены в Ошибка! Неверная ссылка закладки..

1006	
1007	
1008	
1009	
1010	
1011	
1012	
1013	
1014	
1015	
1016	
1017	
1018 1019 1020 1021	Таблица 6). Введение пяти модификаций при понижении ионной силы T _{пл} снижается всего на 7.9 °C (DM01-1,3,5,7,9 S/DN01, Величины термодинамических параметров формирования дуплексов, определенные из кривых термической денатурациив рамках приближения модели двух состояний представлены в Ошибка! Неверная ссылка закладки.
1022	
1023	
1024	
1025	
1026	
1027	
1028	
1029	
1030	
1031	
1032	
1033	
1034	
1035	

1036 Таблица б). Данный факт может быть обусловлен снижением общего зарядового числа
1037 нуклеотидного дуплекса. Таким образом, термическая стабильность модифицированных
1038 комплексов зависит как от положения модификации в цепи, так и от количества вводимых
1039 модификаций, а эффект от изменения ионной силы раствора на термостабильность ФАО/ДНК
1040 дуплексов снижается при увеличении числа модификаций в цепи ФАО.

1041 3.4. Исследование ФАО в полимеразной цепной реакции (ПЦР).

1042 3.4.1. Исследование влияния типа и положения бензоазольной модификации на ПЦР.

1043 ДНК-зависимые ДНК полимеразы являются ферментами нуклеинового обмена, 1044 которые осуществляют удлинение ДНК праймера по матричной цепи ДНК. ДНК- полимеразы 1045 применяются, например, в ПЦР диагностике или в биотехнологии. Природные 1046 олигонуклеотиды, применяемые в диагностических исследования, обладают низкой 1047 специфичностью и чувствительностью в ПЦР анализе. На примере фосфорилгуанидиновых 1048 олигонуклеотидов (ФГО) было показано, что наличие модификаций увеличивает 1049 специфичность и эффективность диагностики [9, 39]. ФАО могут стать альтернативным 1050 вариантом ФГО с улучшенными свойствами для диагностики различных заболеваний. Таким 1051 образом, необходимо исследовать потенциал нового класса модифицированных 1052 олигонуклеотидов в качестве ПЦР-праймеров.

1053 Чтобы оценить эффект от введения N-бензоазольных модификаций (S - N-1054 бензотиазольной, О - *N*-бензоксазольной, N - *N*-бензимидазольной и D -N-1055 диметилбензимидазольной) с 3'-конца праймера, мы синтезировали серию 20-тизвенных 1056 FAM-меченных олигонуклеотидов с одной модификацией, введенной в фосфатный остаток с 1057 1-го по 7-ой и двумя модификациями в 1-ом, 2-ом и 1-ом, 3-ем фосфатных остатках (серия Z, 1058 Таблица 2). В качестве матриц были синтезированы полностью комплементарная 30-1059 тизвенная цепь и три 30-тизвенные последовательности, содержащие несоответствия 1060 (частично комплементарные) - олигонуклеотиды с мисматчами (серия Т, Т-1, Т-2, Т-1,2, 1061 *Таблица 2*). Система Z/T содержит матрицы с мисматчами из следующих соображений. Метод 1062 аллель-специфической ПЦР (АС-ПЦР) основан на использовании двух различных прямых 1063 праймеров, каждый из которых предназначен для идентификации ДНК дикого типа (ДНК WT) 1064 или мутантной формы. Для обнаружения SNP (однонуклеотидной замены) 3'-конец праймера 1065 полностью комплементарен мутантной ДНК (Z/T) и имеет однонуклеотидное несоответствие 1066 на 3'-конце в дуплексе с ДНК WT (Z/T-1). При наличии мутации удлинение праймера в Z/T 1067 должно протекать гораздо эффективнее, чем удлинение праймера в Z/T-1. Если наличие

1068 модификации блокирует удлинение праймера Z/T-1 и не влияет на Z/T, то использование
 1069 таких модифицированных праймеров даст преимущество в детекции SNP перед нативными
 1070 олигонуклеотидными праймерами.

1071 Поскольку в ПЦР анализе используется два праймера (прямой и обратный), на втором 1072 шаге амплификации удлиненный модифицированный праймер становится уже матрицей для 1073 другого праймера. Новая цепочка ДНК, содержащая химическую модификацию, может 1074 повлиять на дальнейший процесс ПЦР, например, ингибировать его. Таким образом, эффект 1075 химической модификации в матрице может показать молекулярное понимание процесса 1076 удлинения и позволяет изучить его механизм. Поэтому, наряду с Z/T системами, были 1077 исследованы серии комплексов Z/P. В качестве матриц в этой серии использовались 1078 модифицированные 20-ти звенные олигонуклеотиды, которые в серии Z/T выполняли роль 1079 праймеров (серия Z, Таблица 2). Короткий 8-мизвенный Су-5-меченный праймер был 1080 синтезирован, с целью исследования влияния положения и типа N-бензоазольной 1081 модификации в матрице на процесс удлинения нативного праймера.

1082 3.4.1.1. Анализ термической денатурации комплементарных дуплексов праймеров 1083 с матрицами серий Z/T и Z/P.

1084 Оптимизация температурной программы для проведения ПЦР анализа является важной
1085 задачей. Неоптимальный выбор температуры удлинения праймера может привести либо к
1086 плохому связыванию праймеров с матрицей (при завышенной температуре), либо к
1087 связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (при заниженной
1088 температуре). Чаще всего для этапа удлинения праймера выбирается температура на 5-10 °C
1089 ниже, чем температура плавления дуплекса.

Для оптимизации температурной программы ПЦР и оценки термодинамической
 стабильности в буферных условиях, имитирующий буфер ПЦР (75 M NaCl, 10 мМ CacNa, 6
 мМ MgCl₂) был проведен анализ термической денатурации комплементарных дуплексов
 праймеров с матрицами.

1094 Сравнение рассчитанных значений температуры плавления серий Z/T указывает на 1095 незначительные различия в нативных и модифицированных комплексах, как для матрицы 1096 полностью комплементарной, так и для матриц, содержащих несоответствия. Значения T_{nn} 1097 серии Z/T находятся в диапазоне от 72.5 ± 0.3 °C (для Z1,3-O/T1,2) до 77.6 ± 0.8 °C (для Z1-1098 D/T). Однако среднее значение T_{nn} для выборки составило 74.5 °C с диапазоном значений 1.1 1099 °C (Таблица 7). Существенной дестабилизации не наблюдалось даже для дуплексов с двумя 1100 бензоазольными модификациями любого типа и с матрицей с двумя мисматчами (Z1,2-X/T1,2

1101 и Z1,3-X/T1,2). Полученные результаты свидетельствуют о незначительном снижении

1102 устойчивости модифицированных комплексов в сравнении с нативными в условиях,

1103 имитирующих буфер ПЦР.

1104 Таблица 7. Термодинамические параметры комплексов серии Z/T, полученные путем подгонки
 1105 кривых УФ-плавления с использованием модели двух состояний. Условия имитируют буфер ПЦР (6
 1106 мМ MgCl₂, 75 мМ NaCl, 10 мМ CacNa, pH 7.2). Концентрация олигонуклеотидов составляет 2.5 мкМ.

Комплекс	∆Н°, ккал/моль	∆S°, кал/(моль*К)	$\Delta {f G}^{{\sf o}}$ 37, ккал/моль	T _m , ℃
Z0/T	-130 ± 5	-345 ± 15	-22.9 ± 0.6	75.9 ± 0.4
Z0/T1	-126 ± 11	-337 ± 33	-21.8 ± 1	73.9 ± 0.7
Z0/T2	-140 ± 5	-378 ± 15	-22.9 ± 0.5	72.9 ± 0.2
Z0/T1,2	-127 ± 11	-339 ± 32	-22 ± 1.2	74.2 ± 0.1
Z1-S/T	-143 ± 21	-384 ± 60	-24.3 ± 2.1	75.7 ± 0.5
Z5-S/T	-154 ± 22	-416 ± 64	-24.6 ± 2.5	73.6 ± 0.4
Z1,2-S/T	-120 ± 7	-317 ± 20	-21.4 ± 0.7	74.9 ± 0.2
Z1,3-S/T	-115 ± 9	-302 ± 26	-21 ± 0.9	75.3 ± 0.4
Z1,2-S/T-1	-141 ± 18	-379 ± 53	-23.7 ± 1.9	74.7 ± 0.2
Z1,3-S/T-1	-136 ± 11	-366 ± 31	-22.5 ± 1	72.9 ± 0.3
Z1,2-S/T-2	-135 ± 6	-361 ± 19	-22.9 ± 0.6	74.4 ± 0.3
Z1,3-S/T-2	-132 ± 14	-354 ± 41	-22.9 ± 0.9	74.2 ± 0.2
Z1,2-S/T-1,2	-136 ± 11	-362 ± 32	-23.3 ± 1.1	75.4 ± 0.5
Z1,3-S/T-1,2	-142 ± 8	-382 ± 22	-23.4 ± 0.8	73.8 ± 0.2
Z1-N/T	-135 ± 16	-362 ± 46	-23.1 ± 1.7	74.9 ± 0.1
Z5-N/T	-128 ± 5	-343 ± 16	-22 ± 0.3	73.8 ± 0.8
Z1,2-N/T	-124 ± 6	-328 ± 18	-22.1 ± 0.5	75.7 ± 0.6
Z1,3-N/T	-113 ± 3	-297 ± 8	-20.6 ± 0.2	74.7 ± 0.4
Z1,2-N/T-1	-135 ± 5	-359 ± 15	-23.2 ± 0.5	75.4 ± 0.3
Z1,3-N/T-1	-139 ± 10	-373 ± 30	-23.1 ± 0.9	73.7 ± 0.4
Z1,2-N/T-2	-145 ± 13	-390 ± 37	-24 ± 1.4	74.5 ± 0
Z1,3-N/T-2	-140 ± 15	-376 ± 45	-23.4 ± 1.6	74.3 ± 0.3
Z1,2-N/T-1,2	-127 ± 6	-337 ± 16	-22.5 ± 0.6	75.9 ± 0.2
Z1,3-N/T-1,2	-140 ± 19	-376 ± 55	-23.1 ± 1.8	73.6 ± 0.5
Z1-D/T	-125 ± 9	-331 ± 26	-22.9 ± 0.8	77.6 ± 0.8
Z5-D/T	-127 ± 7	-340 ± 21	-21.8 ± 0.6	73.7 ± 0.6
Z1,2-D/T	-112 ± 7	-296 ± 18	-20.6 ± 1	74.7 ± 1
Z1,3-D/T	-105 ± 5	-273 ± 15	-20.3 ± 0.4	76.7 ± 0.7
Z1,2-D/T-1	-131 ± 9	-348 ± 27	-22.5 ± 0.9	74.7 ± 0.4
Z1,3-D/T-1	-132 ± 14	-352 ± 42	-22.4 ± 1.5	73.9 ± 0.2
Z1,2-D/T-2	-132 ± 11	-352 ± 31	-22.5 ± 1	74.2 ± 0.4
Z1,3-D/T-2	-129 ± 13	-343 ± 38	-22.9 ± 1.3	76.3 ± 0.6
Z1,2-D/T-1,2	-129 ± 15	-344 ± 44	-22.2 ± 1.5	74.2 ± 0.5
Z1,3D/T-1,2	-121 ± 7	-323 ± 22	-21.4 ± 0.6	74.1 ± 0.6
Z1-O/T	-135 ± 11	-359 ± 31	-23.5 ± 1	76.1 ± 0.6

Z5-O/T	-130 ± 9	-347 ± 25	-22.3 ± 0.6	74.2 ± 0.9
Z1,2-O/T	-140 ± 0	-376 ± 1	-23.3 ± 0	74.1 ± 0
Z1,3-O/T	-125 ± 2	-334 ± 5	-21.9 ± 0.2	74.4 ± 0
Z1,2-O/T-1	-135 ± 13	-361 ± 38	-22.6 ± 1.3	73.6 ± 0.3
Z1,3-O/T-1	-136 ± 8	-367 ± 22	-22.5 ± 0.7	72.9 ± 0.1
Z1,2-O/T-2	-136 ± 13	-363 ± 38	-23.2 ± 1.4	75 ± 0.2
Z1,3-O/T-2	-132 ± 4	-355 ± 12	-22 ± 0.4	72.6 ± 0.2
Z1,2-O/T-1,2	-135 ± 15	-362 ± 44	-22.4 ± 1.4	73.1 ± 0.4
Z1,3-O/T-1,2	-143 ± 9	-388 ± 27	-23.1 ± 0.9	72.5 ± 0.3

Термостабильность комплексов в серии Z/P демонстрирует различную стабильность для одной или двух модификаций в Z-олигонуклеотидах (данные не приведены). Однако определить термодинамические параметры невозможно из-за плавно возрастающих кривых плавления (данные не приведены). Значения Т_{пл}, определенные как максимум дифференциальной кривой плавления, находились в диапазоне 40-45 °C как для немодифицированной Z0, так и для Z с однократной модификацией, в то время как термическая стабильность дуплексов, Z с двойной модификацией была снижена до 35-40 °C. Это снижение значений T_{nn} согласуется с нашими предыдущими результатами по термической стабильности ΦAO (

- Таблица 5).

3.4.1.2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с модифицированными праймерами (серия Z/T).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и электрофоретический анализ реакционных смесей после ПЦР анализа проводили как описано в Матераилы и методы п.2.4.2. Результаты анализа эффективности удлинения ПЦР-праймеров представлены на Рисунках 10-13. Диаграммы (слева) на *Рисунках 10-13* включают данные для четырех бензоазольных модификаций. Справа на рисунках приведены примеры сканированных изображений гель-электрофореза, окрашенного красителем Stains-All (нижний), и детекции флуоресцентного сигнала (верхний) от продуктов удлинения Тад ДНК-полимеразой FAM-меченных праймеров с *N*-бензотиазольной модификацией (S).



1135 Рисунок 10. Влияние положения *N*-бензоазольной модификации в праймере на эффективность 1136 удлинения. (Слева): Схематическое изображение фрагмента дуплекса Z-X/T, красная звезда – 1137 положение фосфата с *N*-бензоазольной модификацией с 3'-конца. Гистограмма, показывающая долю 1138 полноразмерного продукта (%) удлинения праймера для четырех типов модификаций. В качестве 1139 контроля использовали праймер Z0 (без модификации). (Справа): Анализ продуктов удлинения Таq 1140 ДНК-полимеразой праймеров, содержащих *N*-бензотиазольные модификации. Сканированные 1141 изображения геля в канале FAM (a) и после окрашивания Stains-All (b). Контрольные смеси (без Тад 1142 ДНК-полимеразы) праймер/матрица: дорожка 1 Z0/T, дорожка 3 Z1-S/T и дорожка 13 Z1,2-S/T. 1143 Реакционные смеси после удлинения: дорожка 2 Z0/T, дорожка 4 Z1-S/T, дорожка 5 Z2-S/T, дорожка 6 1144 Z3-S/T, дорожка 7 Z4-S/T, дорожка 8 Z5-S/T, дорожка 9 Z6-S/T, дорожка 10 Z7-S/T, дорожка 11 Z1, 2-1145 S/T и дорожка 12 Z1,3-S/T.

1146 Анализ удлинения праймеров в составе полностью комплементарных комплексов Z/T 1147 показал их эффективное удлинение. Доля полноразмерного продукта в большинстве случаев 1148 близка к 100% для всех бензоазольных модификаций в фосфатах 1-7 в Z-праймере (Рисунок 1149 10). Для праймеров с двумя модификациями, Z1,2 и Z1,3, наблюдалось незначительное 1150 ингибирование для праймеров, содержащих *N*-бензимидазольные *N*-И 1151 диметилбензимидазольные группы. Выход полноразмерного продукта удлинения становится 1152 значительно ниже в системе Z/T-1 с олигонуклеотидным несоответствием на 3'-конце (*Рисунок* 1153 11). Выход полноразмерного продукта для немодифицированного праймера Z0 составляет 1154 ~63%. Для модифицированных праймеров такое же количество продукта было обнаружено только в комплексах с Z7-O, S и N/T-1. Для Z7-D/T-1 выход снижается до 40%. Похоже, что 1155 модификация 7-фосфата оказывает минимальное воздействие. 1156



1158 Рисунок 11. Влияние положения *N*-бензоазольной модификации в праймере на эффективность 1159 удлинения. (Слева): Схематическое изображение фрагмента дуплекса Z-X/T-1, красная звезда -1160 положение фосфата с *N*-бензоазольной модификацией с 3'-конца. Гистограмма, показывающая долю полноразмерного продукта (%) удлинения праймера для четырех типов модификаций. В качестве 1161 1162 контроля использовали праймер Z0 (без модификации). (Справа): Анализ продуктов удлинения Таq 1163 ДНК-полимеразой праймеров, содержащих *N*-бензотиазольные модификации. Сканированные 1164 изображения геля в канале FAM (а) и после окрашивания Stains-All (b). Контрольные смеси (без Тад 1165 ДНК-полимеразы) праймер/матрица: дорожка 1 Z0/T-1, дорожка 3 Z1-S/T-1 и дорожка 13 Z1,2-S/T-1. 1166 Смеси после удлинения: дорожка 2 Z0/T-1, дорожка 4 Z1-S/T-1, дорожка 5 Z2-S/T-1, дорожка 6 Z3-S/T-1167 1, дорожка 7 Z4-S/T-1, дорожка 8 Z5-S/T-1, дорожка 9 Z6-S/T-1, дорожка 10 Z7-S/T-1, дорожка 11 Z1,2-1168 S/T-1 и дорожка 12 Z1,3-S/T-1.

Для комплексов Z/T-1 (Рисунок 11) наиболее эффективное удлинение было показано
для ФАО с *N*-бензотиазольной (S) и *N*-бензоксазольной (O) модификациями. Можно отметить,
что среди фосфатов 1–6 именно третья позиция обеспечивала максимальное количество
полноразмерного продукта удлинения для нескольких видов модификаций. Также можно
отметить, что введение одной *N*-бензоксазольной (O) модификации даже в первое положение
вблизи 3'-конца оказывается с максимальным выходом около 25%.

Для систем Z/T-2 (мисматч во второй паре оснований) и Z/T-1,2 (два несоответствия) в
течение одного цикла реакции наблюдалась низкая эффективность удлинения, менее 5%
(Рисунок 12 и Рисунок 13). Как правило, одного 3'-концевого несоответствия недостаточно для
хорошей дискриминации между WT и мутировавшей ДНК. Результаты, представленные на
Рисунок 12 и Рисунок 13, ясно показывают увеличение специфичности модифицированных
праймеров по отношению к нативному праймеру (контрольный столбец на диаграмме). В
обоих случаях реакция ингибируется для частично комплементарных матриц.



1182

1183 Рисунок 12. Влияние положения *N*-бензоазольной модификации в праймере на эффективность 1184 удлинения. (Слева): Схематическое изображение фрагмента дуплекса Z-X/T-2, красная звезда – 1185 положение фосфата с *N*-бензоазольной модификацией с 3'-конца. Гистограмма, показывающая долю 1186 полноразмерного продукта (%) удлинения праймера для четырех типов модификаций. В качестве 1187 контроля использовали праймер Z0 (без модификации). (Справа): Анализ продуктов удлинения Taq 1188 ДНК-полимеразой праймеров, содержащих *N*-бензотиазольные модификации. Сканированные 1189 изображения геля в канале FAM (а) и после окрашивания Stains-All (b). Контрольные смеси (без Тад ДНК-полимеразы) праймер/матрица: дорожка 1 Z0/T-2, дорожка 3 Z1-S/T-2 и дорожка 13 Z1,2-S/T-2. 1190 1191 Смеси после удлинения: дорожка 2 Z0/T-2, дорожка 4 Z1-S/T-2, дорожка 5 Z2-S/T-2, дорожка 6 Z3-S/T-1192 2. дорожка 7 Z4-S/T-2. дорожка 8 Z5-S/T-2. дорожка 9 Z6-S/T-2. дорожка 10 Z7-S/T-2. дорожка 11 Z1.2-1193 S/T-2 и дорожка 12 Z1,3-S/T-2.

- 1194
- 1195



1197 Рисунок 13. Влияние положения *N*-бензоазольной модификации в праймере на эффективность удлинения. (Слева): Схематическое изображение фрагмента дуплекса Z-X/T-1,2, красная звезда – положение фосфата с *N*-бензоазольной модификацией с 3'-конца. Гистограмма, показывающая долю полноразмерного продукта (%) удлинения праймера для четырех типов модификаций. В качестве контроля использовали праймер Z0 (без модификации). (Справа): Анализ продуктов удлинения *Taq* ДНК-полимеразой праймеров, содержащих *N*-бензотиазольные модификации. Сканированные

изображения геля в канале FAM (а) и после окрашивания Stains-All (b). Контрольные смеси (без Таq
ДНК-полимеразы) праймер/матрица: дорожка 1 Z0/T-1,2, дорожка 3 Z1-S/T-1,2 и дорожка 13 Z1,2-S/T1,2. Смеси после удлинения: дорожка 2 Z0/T-1,2, дорожка 4 Z1-S/T-1,2, дорожка 5 Z2-S/T-1,2, дорожка
6 Z3-S/T-1,2, дорожка 7 Z4-S/T-1,2, дорожка 8 Z5-S/T-1,2, дорожка 9 Z6-S/T-1, 2, дорожка 10 Z7-S/T1,2, дорожка 11 Z1,2-S/T-1,2 и дорожка 12 Z1,3-S/T-1,2.

1208 Таким образом, результаты исследования показывают, что одна бензоазольная 1209 модификация фосфатов 1–7 вблизи З'-конца праймера не влияет на реакцию удлинения для 1210 полностью комплементарного комплекса праймер/матрица (Рисунок 10). Для комплекса с 1211 мисматчем вблизи З'-конца праймера введение бензоазольной модификации в 1-6 фосфат 1212 вблизи З'-конца праймера снижает эффективность удлинения праймера (Рисунок 11, Рисунок 1213 12 и Рисунок 13). Эффективность удлинения праймеров с *N*-бензотиазольной (S) и *N*-1214 бензоксазольной (О) модификациями была значительно выше, чем для *N*-бензимидазольной 1215 (N) и N- диметилбензимидазольной (D) модификаций, которые практически останавливают 1216 ПЦР.

1217 З.4.1.3. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с модифицированными праймерами 1218 (серия Z/P). Влияние положения бензоазольной модификации в матрице на 1219 относительное удлинение нативного праймера.

Исследовано влияние количества бензоазольных групп и их положения в матрице на
модельном комплексе матрица/праймер. Для этих исследований в качестве матрицы
использовали модифицированные 20-тизвенные Z-олигонуклеотиды, а в качестве праймера 8мизвенный P-олигонуклеотид, содержащий флуоресцентную метку Су-5 (Таблица 3).

1224 Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и электрофоретический анализ реакционных
1225 смесей проводили как описано в Материалы и методы п.2.4.2., однако, из-за низкой
1226 эффективности реакции удлинения праймера ПЦР-анализ увеличили до трех циклов.
1227 Результаты анализа реакционных смесей представлены на Рисунок 14. На диаграмме
1228 представлены данные для четырех бензоазольных модификаций.



1230 Рисунок 14. Влияние положения *N*-бензоазольной модификации в праймере на эффективность 1231 уллинения. (Слева): Схематическое изображение фрагмента дуплекса Z-X/P, красная звезда – 1232 положение фосфата с *N*-бензоазольной модификацией с З'-конца. Гистограмма, показывающая долю 1233 полноразмерного продукта (%) удлинения праймера для четырех типов модификаций. В качестве 1234 контроля использовали праймер Z0 (без модификации). (Справа): Анализ продуктов удлинения Таа 1235 ДНК-полимеразой праймеров, содержащих *N*-бензотиазольные модификации. Сканирование геля в 1236 канале Су-5 (a), канале FAM (b) и после окрашивания Stains-All (c). Контрольные смеси 1237 праймер/матрица: дорожка 1 Z0/P, дорожка 3 Z1-S/P2 и дорожка 13 Z1,2-S/P. Смеси после ПЦР: 1238 дорожка 2 Z0/P, дорожка 4 Z1-S/P, дорожка 5 Z2-S/P, дорожка 6 Z3-S/P, дорожка 7 Z4-S/P, дорожка 8 1239 Z5-S/P, дорожка 9 Z6-S/P, дорожка 10 Z7-S/P, дорожка 11 Z1,2-S/P и дорожка 12 Z1,3-S/P.

1240 Наличие бензоазольной модификации в Z-матрице существенно влияет на ПЦР, так как 1241 они находятся в зоне контакта ДНК с *Тад* ДНК-полимеразой [40]. Наиболее толерантными по отношению к полимеразе сайтами модификации были 3 и 7 из-за нахождения модификаций в 1242 1243 полости белка и возможности свободного движения матричной цепи [40]. Напротив, 1244 модификация в позициях 1, 2 и 4 обеспечивала менее 40 % выхода полноразмерного продукта ПЦР. Две любые бензоазольные модификации не приводят к высокому количеству продукта 1245 1246 удлинения из-за возможного снижения термостабильности дуплекса ДНК. Таким образом, 1247 изменения в матрице могут сильно влиять на ПЦР, что может быть полезно для новых 1248 современных подходов к ПЦР.

1249 3.4.2. Применение ΦΑΟ в качестве праймеров в аллель-специфической ПЦР (АС-ПЦР) в 1250 реальном времени.

Для выявления SNP (олигонуклеотидных полиморфизмов) широко используется
аллель-специфическая полимеразная цепная реакция (АС-ПЦР) в реальном времени [39, 41,
42]. Для получения надежной дифференциации между WT (ДНК дикого типа) и мутировавшей
ДНК праймеры обычно имеют 3'-конецевой мисматч (несоответсвие) и одну дополнительную
несовпадающую пару оснований в пределах 2–4-нуклеотидного участка с 3'-конца [43, 44].

1256 Совместно с Чубаровым А.С., Оскорбиным И.П. и Филипенко М.Л. было проведено 1257 исследование влияния положения модифицирующих бензоазольных групп на 3'-конце 1258 праймера для выявления SNP с использованием АС-ПЦР в реальном времени. В качестве 1259 праймеров для АС-ПЦР мы использовали ранее установленные последовательности для 1260 выявления мутаций KRAS [9]. Были использованы праймеры СТGT и СТGC с 3'-концевыми 1261 несоответствиями WT-ДНК и полностью комплементарными с мутировавшей ДНК. Второй 1262 тип праймеров (СТТС и СТАТ) имеет два несоответствия ДНК WT и одно несоответствие с 1263 мутировавшей ДНК. Для выявления мутаций G12A и G12V KRAS был синтезирован набор АС-праймеров с бензоазольными модификациями во 2-4 положениях межнуклеотидных 1264 1265 фосфатов (Таблица 3). Типичные кривые амплификации, полученные методом АС-ПЦР для 1266 немодифицированных и модифицированных праймеров, представлены на Рисунок 15.

1267



Рисунок 15. Типичные кривые амплификации, полученные при анализе АС-ПЦР, для выявления
 мутации гена KRAS G12A с помощью праймеров СТТС и СТ^STC и 2 × 10⁴ копий общей ДНК за
 реакцию на WT и 1% мутантной ДНК на фоне образцов WT ДНК. Здесь * означает модификацию *N* бензотиазольная (S) модификация.

1273 Анализ данных ПЦР приведен в Таблица 8. Чтобы дать представление о возможном 1274 дальнейшем использовании ФАО для анализа АС-ПЦР сравнивались три параметра: 1275 эффективность ПЦР, значения специфичности (ΔCq) и порогового цикла (Cq) для 1276 модифицированного и немодифицированного праймеров. Для наглядности результаты 1277 разделены на категории и помечены как «не подходящие значения» (красный цвет), «средние» 1278 (желтый цвет) и «оптимальные или отличные» (зеленый цвет). Например, пороговое значение 1279 эффективности ПЦР было выбрано ниже 90% (красный), 90-94% (желтый) и выше 95% 1280 (зеленый). Оптимальным результатом было бы, если бы модификация праймера не повышала 1281 значения порогового цикла для 1% мутировавших образцов ДНК, но при этом обеспечивала 1282 бы высокую специфичность. Однако получить отличные результаты по всем параметрам 1283 крайне сложно. Таким образом, баланс между этими параметрами имеет решающее значение

- 1284 для надежного обнаружения мутаций. Возможно, лучше использовать праймер со средней
- 1285 специфичностью и хорошей эффективностью ПЦР вместо высокоспецифичного праймера с
- 1286 низкой скоростью ПЦР.

Mutation/ Primers		1% DNA Cq increase compared to native primer, cycles			PCR efficiency, %		ΔCq = Cqwr-Cq1%			Conclusion of suitability for further AS-PCR studies							
		0	S	Ν	D	0	S	Ν	D	0	S	Ν	D	0	S	Ν	D
	C*TTC	-0.1	0.0	1.1	1.5	99	97	100	90	12.7	12.6	11.5	11.1	++	++	++	+
	*CT TC	1.2	1.4	4.4	5.6	95	96	92	84	11.4	11.2	8.2	7.9	++	++	-	-
Ā	CT*TC	0.0	0.1	5.8	4.7	97	97	75	80	12.6	12.5	6.8	7.1	++	++	-	-
G1	C*TGC	0.8	0.2	0.9	-	97	100	95	-	2.8	2.5	6.0	-	-	-	+	-
-	*CTGC	1.0	0.6	1.2	-	97	96	97	-	4.1	5.1	7.8	-	+	+	+	-
	CT*GC	0.9	0.4	2.4	-	95	100	84	-	4.6	5.4	5.6	-	+	+	-	-
	C*TAT	0.8	0.9	3.1	5.5	92	95	85	81	6.6	5.3	6.6	7.2	+	+	-	-
	*CTAT	-2.9	2.1	4.8	6.5	92	98	89	90	0.4	5.2	4.9	6.2	-	+	-	-
2V	CT*AT	2.1	1.4	4.8	5.3	97	99	92	93	8.0	7.4	7.2	7.4	+	+	-	-
G	C*TGT	-4.4	-4.2	-3.2	-	92	100	98	-	0.3	0.1	0.1	-	-	-	-	-
	*CTGT	-2.8	-2.3	-0.6	-	96	98	98	-	0.3	2.8	1.6	-	-	-	-	-
	CT*GT	1.3	-2.3	-2.2	_	97	95	77	_	2.9	0.3	0.4	-	_	_	_	_

1287 Таблица 8. Результаты анализа АС-ПЦР с использованием четырех типов модификаци ФАО.

1288 Красный, желтый и зеленый цвета означают «не подходящие значения», «средние» и «оптимальные
1289 или отличные» соответственно. Символ "*" указывает на место модификации ФАО. Нуклеотиды,
1290 выделенные жирным шрифтом, представляют собой несовпадающие нуклеотиды относительно
1291 последовательности ДНК WT. ++ отлично, + хорошо, - хуже.

1292 Результаты исследования показали, модифицированные праймеры с ЧТО 1293 бензоксазольной (О) и бензотиазольной (S) модификациями в большинстве случаев имеют 1294 эффективность ПЦР 100%. близкую к Эффективность удлинения праймера, модифицированного бензимидазольной группой (N), относительно бензоксазольных (O) и 1295 1296 бензотиазольных (S) праймеров меньше и сильно зависит от сайта модификации. 1297 Диметилбензимидазольная (D) модификация сильно ингибирует ПЦР. Включение 1298 бензоксазольных (О) и бензотиазольных (S) модификаций в ПЦР-праймеры приводит к 1299 идентификации ДНК с мутациями G12A и G12V с хорошей специфичностью (значение ΔCq, 1300 Таблица 8) без существенного увеличения значений Сq образцов с мутировавшей ДНК 1301 (Таблица 8).

1302 Согласно данным, приведенным в Таблица 8, бензоксазольная (О) и бензотиазольная
1303 (S) модификации оказались наиболее эффективными для дальнейшего применения в АС-ПЦР,
1304 поскольку они практически не увеличивают пороговый цикл относительно нативных
1305 праймеров, а также увеличивают специфичность анализа. ФАО может повышать

1306 специфичность ПЦР без потери чувствительности за счет синергетического эффекта с 1307 дополнительным несоответствием, повышая надежность клинического анализа АС-ПЦР. 1308 Результаты исследования позволяют предположить, что модификации ФАО в некоторых 1309 случаях могут быть использованы только с 3'-концевыми несоответствиями для повышения 1310 специфичности праймера. Основной принцип разработанной методики может быть 1311 использован для повышения специфичности ПЦР независимо от последовательностей АС 1312 праймеров. Таким образом, результаты, полученные на модельной плазмидной системе, 1313 обеспечивают высокий потенциал ФАО для выявления SNP с высокой специфичностью и 1314 селективностью, что в дальнейшем должно быть доказано на клинических образцах. ФАО 1315 могут быть использованы для создания различных диагностических систем ПЦР.

4. ВЫВОДЫ.

- 1317
 1. Осуществлен дизайн новых бензоазольных модификаций олигонуклеотидов,
 1318
 совместимых с условиями реакции Штаудингера.
- 1319
 2. Синтезированы, очищены и охарактеризованы азидо-модификаторы для введения в
 1320 структуру олигонуклеотидов. Показана высокая реакционная способность новых
 1321 азидо-реагентов в отношении трехвалентного фосфора в условиях реакции
 1322 Штаудингера.
- 1323 3. Впервые осуществлены синтез, очистка И характеризация четырех новых 1324 фосфорамидных азольных олигонуклеотидов (ФАО): *N*-бензимидазольные, N-1325 бензоксазольных, **N-бензотиазольныя** *N*-1,3-диметил-бензимидазольных. И 1326 Оптимизирован синтетический протокол введения одиночных и множественных 1327 бензоазольных модификаций в рамках автоматического твердофазного синтеза ДНК.
- 1328 4. Исследованы физико-химические свойства полученных ФАО. Показана химическая 1329 стабильность в условиях синтеза и постсинтетической обработки олигонуклеотидов, а 1330 также В условиях кислотного гидролиза. Продемонстрировано vвеличение 1331 гидрофобности ФАО по сравнению с нативными цепями ДНК. Показана возможность 1332 изменения заряда модифицирующей группы при изменении рН. Установлено, что 1333 введение бензоазольных модификаций приводит к снижению термической 1334 стабильности комплексов модифицированных олигонуклеотидов с ДНК и РНК 1335 относительно нативного дуплекса, при этом степень снижения термостабильности 1336 зависит как от типа вводимой модификации и их количества, так и от положения модификации в олигонуклеотидной цепи. Отмечено, что понижение ионной силы 1337 1338 раствора не приводит к значимому снижению термической стабильности в случае 1339 множественной бензоазольной модификации.
- 1340
 5. Продемонстрирован высокий потенциал применения ФАО в качестве праймеров для
 1341
 выявления однонуклеотидных полиморфизмов в аллель-специфичной полимеразной
 1342
 цепной реакции (АС-ПЦР).
- 1343
- 1344

1345	6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.
1346 1347	1. Collotta, D., Lucarini, L. Editorial: The challenges of drug repurposing in diseases related to chronic inflammation // Front. Pharmacol. – 2023. – Vol. 14.
1348 1349	2. Eckstein, F. Nucleoside Phosphorothioates // J. Am. Chem. Soc. – 1966. – Vol. 88. – N. 18. – P. 4292–4294.
1350 1351 1352 1353	3. Lebedeva, N. A., Anarbaev, R. O., Kupryushkin, M. S., Rechkunova, N. I., Pyshnyi, D. V., Stetsenko, D. A., Lavrik, O. I. Design of a New Fluorescent Oligonucleotide-Based Assay for a Highly Specific Real-Time Detection of Apurinic/Apyrimidinic Site Cleavage by Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1. // Bioconjug. Chem. – 2015. – Vol. 26. – N. 10. – P. 2046–53.
1354 1355 1356 1357	4. Miroshnichenko, S. K., Patutina, O. A., Burakova, E. A., Chelobanov, B. P., Fokina, A. A., Vlassov, V. V., Altman, S., Zenkova, M. A., Stetsenko, D. A. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2019. – Vol. 116. – N. 4. – P. 1229–1234.
1358 1359 1360 1361	5. Liu, Y., Andreucci, A., Iwamoto, N., Yin, Y., Yang, H., Liu, F., Bulychev, A., Hu, X. S., Lin, X., Lamore, S., Patil, S., Mohapatra, S., Purcell-Estabrook, E., Taborn, K., Dale, E., Vargeese, C. Preclinical evaluation of WVE-004, an investigational stereopure oligonucleotide for the treatment of C9orf72-associated ALS or FTD // Mol. Ther Nucleic Acids. – 2022. – Vol. 28. – P. 558–570.
1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368	6. Patutina, O. A., Gaponova, S. K., Sen'kova, A. V., Savin, I. A., Gladkikh, D. V., Burakova, E. A., Fokina, A. A., Maslov, M. A., Shmendel', E. V., Wood, M. J. A. A., Vlassov, V. V., Altman, S., Stetsenko, D. A., Zenkova, M. A., Gaponova (Miroshnichenko), S. K., Sen'kova, A. V., Savin, I. A., Gladkikh, D. V., Burakova, E. A., Fokina, A. A., Maslov, M. A., Shmendel', E. V., Wood, M. J. A. A., Vlassov, V. V., Altman, S., Stetsenko, D. A., Zenkova, M. A. Mesyl phosphoramidate backbone modified antisense oligonucleotides targeting miR-21 with enhanced in vivo therapeutic potency // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2020. – Vol. 117. – N. 51. – P. 32370–32379.
1369 1370 1371	7. Su, N., Wei, K., Zhao, N., Wang, L., Duan, G. J., Ren, X. D., Qu, X. M., Huang, Q. Sensitive and selective detections of codon 12 and 13 KRAS mutations in a single tube using modified wild-type blocker // Clin. Chim. Acta. – 2019. – Vol. 494. – P. 123–131.
1372 1373 1374	8. Zhang, J., Li, K. Single-Base Discrimination Mediated by Proofreading 3' Phosphorothioate- Modified Primers // Appl. Biochem. Biotechnol Part B Mol. Biotechnol 2003 Vol. 25 N. 3. - P. 223-227.
1375 1376 1377	9. Chubarov, A. S., Oscorbin, I. P., Filipenko, M. L., Lomzov, A. A., Pyshnyi, D. V. Allele-Specific PCR for KRAS Mutation Detection Using Phosphoryl Guanidine Modified Primers // Diagnostics. – 2020. – Vol. 10. – N. 11. – P. 872.
1378 1379 1380	10. Zhukov, S. A., Pyshnyi, D. V., Kupryushkin, M. S. Synthesis of Novel Representatives of Phosphoryl Guanidine Oligonucleotides // Russ. J. Bioorganic Chem. – 2021. – Vol. 47. – N. 2. – P. 380–389.
1381 1382 1383	11. Iyer, R. P., Egan, W., Regan, J. B., Beaucage, S. L. 3H-1,2-Benzodithiole-3-one 1,1-Dioxide as an Improved Sulfurizing Reagent in the Solid-Phase Synthesis of Oligodeoxyribonucleoside Phosphorothioates // J. Am. Chem. Soc. – 1990. – Vol. 112. – N. 3. – P. 1253–1254.
1384 1385	12. Прохорова, Д. В., Челобанов, Б. П., Буракова, Е. А., Фокина, А. А., Стеценко, Д. А. Новые произволные одигодезоксирибонуклеотидов, содержащие межнуклеотидную N-

1385производныеолигодезоксирибонуклеотидов,содержащиемежнуклеотиднуюN-1386тозилфосфорамиднуюгруппу:синтезивзаимодействиескомплементарными1387последовательностями ДНК и РНК // Биоорганическая химия. – 2017. – N. 1. – Р. 45–50.

- 13. Reynolds, G. A., VanAllan, J. A. The synthesis of polyazaindenes and related compounds // J.
 Org. Chem. 1959. Vol. 24. N. 10. P. 1478-1486.
- 1390 14. Zornik, D., Meudtner, R. M., El Malah, T., Thiele, C. M., Hecht, S. Designing Structural Motifs
- 1391 for Clickamers: Exploiting the 1,2,3-Triazole Moiety to Generate Conformationally Restricted
- 1392 Molecular Architectures // Chem. A Eur. J. 2011. Vol. 17. N. 5. P. 1473–1484.
- 1393 15. Kitamura, M., Yano, M., Tashiro, N., Miyagawa, S., Sando, M., Okauchi, T. Direct synthesis of
 1394 organic azides from primary amines with 2-azido-1,3-dimethylimidazolinium hexafluorophosphate
 1395 // European J. Org. Chem. 2011. N. 3. P. 458–462.
- 1396 16. Kumar, A., Maurya, R. A., Ahmad, P. Diversity oriented synthesis of benzimidazole and
 1397 benzoxa/(thia)zole libraries through polymer-supported hypervalent iodine reagent. // J. Comb.
 1398 Chem. 2009. Vol. 11. N. 2. P. 198-201.
- 1399 17. Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C.,
 1400 Ferrin, T. E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. // J.
 1401 Comput. Chem. 2004. Vol. 25. N. 13. P. 1605-12.
- 1402 18. Hendrick, C. E., Bitting, K. J., Cho, S., Wang, Q. Site-Selective Copper-Catalyzed Amination
 1403 and Azidation of Arenes and Heteroarenes via Deprotonative Zincation. // J. Am. Chem. Soc. 2017.
 1404 Vol. 139. N. 33. P. 11622–11628.
- 1405 19. Avila, B., Roth, A., Streets, H., Dwyer, D. S., Kurth, M. J. Triazolbenzo[d]thiazoles: Efficient
 1406 synthesis and biological evaluation as neuroprotective agents // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012. 1407 Vol. 22. N. 18. P. 5976-5978.
- 20. Cubero, E., Orozco, M., Luque, F. J. Theoretical study of azido-tetrazole isomerism: Effect of
 solvent and substituents and mechanism of isomerization // J. Am. Chem. Soc. 1998. Vol. 120. N. 19. P. 4723-4731.
- 1411 21. Kitamura, M. Synthesis Of 2-Azido-1,3-dimethylimidazolinium Hexafluorophosphate (ADMP).
 1412 // Org. Synth. 2015. Vol. 92. P. 171-181.
- 1413 22. Bazhenov, M. A., Shernyukov, A. V., Kupryushkin, M. S., Pyshnyi, D. V. Study of the Staudinger
 1414 Reaction and Reveal of Key Factors Affecting the Efficacy of Automatic Synthesis of Phosphoryl
 1415 Guanidinic Oligonucleotide Analogs // Russ. J. Bioorganic Chem. 2019. Vol. 45. N. 6. P.
 1416 699–708.
- 1417 23. Lokhov, S. ., Pyshnyi, D. . Thermodynamic and spectral properties of DNA miniduplexes with
 1418 the terminal G·A mispairs and 3' or 5' dangling bases // FEBS Lett. 1997. Vol. 420. N. 2–3. –
 1419 P. 134–138.
- 1420 24. Lomzov, A. A., Pyshnyi, D. V. Considering the oligonucleotide secondary structures in
 1421 thermodynamic and kinetic analysis of DNA duplex formation // Biophysics (Oxf). 2012. Vol.
 1422 57. N. 1. P. 19–34.
- 1423 25. Jahns, H., Roos, M., Imig, J., Baumann, F., Wang, Y., Gilmour, R., Hall, J. Stereochemical bias
 1424 introduced during RNA synthesis modulates the activity of phosphorothioate siRNAs // Nat.
 1425 Commun. 2015. Vol. 6.
- 1426 26. Xu, D., Rivas-Bascón, N., Padial, N. M., Knouse, K. W., Zheng, B., Vantourout, J. C., Schmidt,
 1427 M. A., Eastgate, M. D., Baran, P. S. Enantiodivergent Formation of C-P Bonds: Synthesis of P-Chiral
 1428 Phosphines and Methylphosphonate Oligonucleotides // J. Am. Chem. Soc. 2020. Vol. 142. N.
 1420 12 P. 5785, 5702

- 1430 27. Mag, M., Muth, J., Jahn, K., Peyman, A., Kretzschmar, G., Engels, J. W., Uhlmann, E. Synthesis
- and binding properties of oligodeoxynucleotides containing phenylphosphon(othio)ate linkages //
 Bioorg, Med. Chem. 1997. Vol. 5. N. 12. P. 2213–2220.
- 1433 28. Zmudzka, K., Johansson, T., Wojcik, M., Janicka, M., Nowak, M., Stawinski, J., Nawrot, B. 1434 Novel DNA analogues with 2-, 3- and 4-pyridylphosphonate internucleotide bonds: synthesis and
- 1435 hybridization properties // New J. Chem. 2003. Vol. 27. N. 12. P. 1698–1705.
- 1436 29. Krishna, H., Caruthers, M. H. Alkynyl phosphonate DNA: A versatile "click" able backbone for
- 1437 DNA-based biological applications // J. Am. Chem. Soc. 2012. Vol. 134. N. 28. P. 11618–
 1438 11631.
- 30. Jäger, A., Levy, M. J., Hecht, S. M. Oligonucleotide N-Alkylphosphoramidates: Synthesis and
 Binding to Polynucleotides // Biochemistry. 1988. Vol. 27. N. 19. P. 7237–7246.
- 1441 31. Kupryushkin, M. S., Zharkov, T. D., Ilina, E. S., Markov, O. V., Kochetkova, A. S., Akhmetova,
- 1442 M. M., Lomzov, A. A., Pyshnyi, D. V., Lavrik, O. I., Khodyreva, S. N. Triazinylamidophosphate
- 1443 Oligonucleotides: Synthesis and Study of Their Interaction with Cells and DNA-Binding Proteins //
- 1444 Russ. J. Bioorganic Chem. 2021. Vol. 47. N. 3. P. 719–733.
- 32. Michel, T., Martinand-Mari, C., Debart, F., Lebleu, B., Robbins, I., Vasseur, J. J. Cationic
 phosphoramidate α-oligonucleotides efficiently target single-stranded DNA and RNA and inhibit
 hepatitis C virus IRES-mediated translation // Nucleic Acids Res. 2003. Vol. 31. N. 18. P.
 5282–5290.
- 1449 33. Deglane, G., Abes, S., Michel, T., Prévot, P., Vives, E., Debart, F., Barvik, I., Lebleu, B., Vasseur,
- J. J. Impact of the Guanidinium Group on Hybridization and Cellular Uptake of Cationic
 Oligonucleotides // ChemBioChem. 2006. Vol. 7. N. 4. P. 684–692.
- 34. Kupryushkin, M. S., Pyshnyi, D. V., Stetsenko, D. A., C., K. M., Pyshnyi, D. V., B., П. Д.,
 Stetsenko, D. A., A., C. Д. Phosphoryl guanidines: a new type of nucleic Acid analogues. // Acta
 Naturae. 2014. Vol. 6. N. 4. P. 116-8.
- 35. Monian, P., Shivalila, C., Lu, G., Shimizu, M., Boulay, D., Bussow, K., Byrne, M., Bezigian, A.,
 Chatterjee, A., Chew, D., Desai, J., Favaloro, F., Godfrey, J., Hoss, A., Iwamoto, N., Kawamoto, T.,
 Kumarasamy, J., Lamattina, A., Lindsey, A., Liu, F., Looby, R., Marappan, S., Metterville, J.,
 Murphy, R., Rossi, J., Pu, T., Bhattarai, B., Standley, S., Tripathi, S., Yang, H., Yin, Y., Yu, H., Zhou,
 C., Apponi, L. H., Kandasamy, P., Vargeese, C. Endogenous ADAR-mediated RNA editing in nonhuman primates using stereopure chemically modified oligonucleotides // Nat. Biotechnol. 2022 407.
- 1461 2022. Vol. 40. N. 7. P. 1093–1102.
- 36. Schmölzer, K., Weingarten, M., Baldenius, K., Nidetzky, B. Glycosynthase Principle
 Transformed into Biocatalytic Process Technology: Lacto- N-triose II Production with Engineered
 exo-Hexosaminidase // ACS Catal. 2019. Vol. 9. N. 6. P. 5503–5514.
- 37. Golyshev, V. M., Abramova, T. V., Pyshnyi, D. V., Lomzov, A. A. A new approach to precise
 thermodynamic characterization of hybridization properties of modified oligonucleotides:
 Comparative studies of deoxyribo- and glycine morpholine pentaadenines // Biophys. Chem. 2018.
 Vol. 234. P. 24–33.
- 1469 38. SantaLucia, J., Hicks, D. The thermodynamics of DNA structural motifs // Annu. Rev. Biophys.
 1470 Biomol. Struct. 2004. Vol. 33. P. 415-440.
- 1471 39. Chubarov, A. S., Oscorbin, I. P., Novikova, L. M., Filipenko, M. L., Lomzov, A. A., Pyshnyi, D.
- 1472 V. Allele-Specific PCR for PIK3CA Mutation Detection Using Phosphoryl Guanidine Modified

- 1473 Primers // Diagnostics. 2023. Vol. 13. N. 2. P. 250.
- 40. Srivastava, P., Prasad, D. Isothermal nucleic acid amplification and its uses in modern diagnostic
 technologies // 3 Biotech 2023 136. 2023. Vol. 13. N. 6. P. 1-23.
- 1476 41. Tinjauan, S., Snp, P., Menggunakan, M., Khusus-Alel, P., Forensik, P., Shalini Parthipan,),
- Sandrasagran, M., Seri, &, Ishar, M. A Review of Mitochondrial SNP Determination using AlleleSpecific PCR in Forensic Identification // Sains Malaysiana. 2022. Vol. 51. N. 12. P. 4019–
 4030.
- 42. Alvarez-Garcia, V., Bartos, C., Keraite, I., Trivedi, U., Brennan, P. M., Kersaudy-Kerhoas, M.,
 Gharbi, K., Oikonomidou, O., Leslie, N. R. A simple and robust real-time qPCR method for the
 detection of PIK3CA mutations // Sci. Rep. 2018. Vol. 8. N. 1.
- 43. Rejali, N. A., Moric, E., Wittwer, C. T. The Effect of Single Mismatches on Primer Extension //
 Clin. Chem. 2018. Vol. 64. N. 5. P. 801–809.
- 1485 44. Liu, J., Huang, S., Sun, M., Liu, S., Liu, Y., Wang, W., Zhang, X., Wang, H., Hua, W. An
- improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application //
 Plant Methods. 2012. Vol. 8. N. 1. P. 1–9.



Проверяющий: Мирошниченко Светлана Константиновна



Отчет о проверке

Автор: Барановская Елизавета Евгеньевна

Название документа: Научный доклад Барановской E.E._wr



- Совпадения фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» – это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.
- Самоцитирования фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.
- Цитирования фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнеста к кормсти проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнеста к кормстию оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.
- Текстовое пересечение фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
- Источник документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
- Оригинальный текст фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

Номер документа: 21	Количество страниц: 49
Тип документа: Не указано	Символов в тексте: 100327
Дата проверки: 10.09.2024 09:06:05	Слов в тексте: 14139
Дата корректировки: 10.09.2024 09:39:09	Число предложений: 1647

Комментарий: не указано

ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да

Выполнено распознавание текста (OCR): Да

Выполнена проверка с учетом структуры: Нет

Модули поиска: ИПС Адилет, Сводная коллекция ЭБС, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Переводные заимствования*, Переводные заимствования (KyEn), IEEE, Переводные заимствования по Интернету (KkRu), Публикации eLIBRARY, Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Публикации РГБ, Диссертации НББ, Медицина, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Библиография, СМИ России и СНГ, Переводные заимствования (KkEn), Перефразирования по коллекции IEEE, Переводные заимствования по Интернету (KyRu), Патенты СССР, РФ, СНГ, Коллекция НБУ, Цитирование, Шаблонные фразы, Перефразирования по Интернету (EN), СПС ГАРАНТ: аналитика, Переводные заимствования (RuEn), Кольцо вузов, Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Перефразирования по Интернету, Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Переводные заимствования (RuEn), Кольцо вузов, Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования по коллекции Интернет в заимствования по коллекции Интернету, Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Переводные заимствования по коллекции Интернету, Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Интернет Плюс*, Кольцо вузов (переводы и перефразирования), Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, Переводные заимствования IEEE, Публикации РГБ (переводы и перефразирования)

ОМОДУЛИ, НЕДОСТУПНЫЕ В РАМКАХ ТАРИФА: Интернет Free

источники

N₂	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	8,31%	0%	ДИПЛОМ Морозов С.В. ФЕН	06 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[02]	4,66%	0%	ИГ КарНЦ РАН. Проекты Институ http://ig.krc.karelia.ru	14 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[03]	4,6%	0%	Сёмочкин, Евгений Вячеславови http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2013	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[04]	4,6%	0%	search https://journals.rudn.ru	17 Авг 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[05]	4,6%	0%	ГДЗ по физике 7 8 9 класс Лукаш https://pomogalka.me	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[06]	4,6%	0%	search https://journals.rudn.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[07]	4,6%	0%	search https://journals.rudn.ru	23 Авг 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[08]	4,6%	0%	Зерновая биржа Казахстан, бир http://cornkz.com	30 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[09]	4,6%	0%	На Двенадцатом съезде. Глава 1 https://sv-scena.ru	14 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[10]	4,58%	0%	Кондрашова, Валентина Алексан http://dlib.rsl.ru	15 Мая 2014	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[11]	4,56%	0%	Распоряжение Правительства Р http://ivo.garant.ru	14 Фев 2022	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[12]	4,56%	0%	Распоряжение Правительства Р http://ivo.garant.ru	14 Фев 2022	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[13]	4,56%	0%	Glucagon Analogs Exhibiting GIP R http://freepatentsonline.com	09 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[14]	4,56%	0%	Cna-B DOMAIN ANTIGENS IN VAC http://freepatentsonline.com	09 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[15]	4,56%	0%	Cna-B DOMAIN ANTIGENS IN VAC http://freepatentsonline.com	09 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[16]	4,56%	0%	Novel organic electroluminescent http://freepatentsonline.com	08 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	
[17]	4,56%	0%	ВКР Гатауллин С.А. вариант 2	08 Фев 2022	Кольцо вузов	
[18]	4,56%	0%	ВКР Плешаков Е.Г. 6413	27 Мая 2020	Кольцо вузов	
[19]	4,55%	0%	rsl01008695199.txt http://dlib.rsl.ru	15 Дек 2017	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[20]	4,54%	0%	Постановление Правительства Н http://ivo.garant.ru	16 Дек 2017	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[21]	4,54%	0%	Анатомия человека в тестовых з http://studentlibrary.ru	26 Янв 2018	Медицина	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.

[22]	4,53%	0%	Comparative Study Based on Fam https://ieeexplore.ieee.org	23 Ноя 2017	IEEE	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[23]	4,5%	0%	Шабалина, Анастасия Вадимовн http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[24]	4,49%	0%	ВКР Гатауллин С.А. вариант 6	22 Июн 2017	Кольцо вузов	
[25]	4,48%	0%	Biplots in offline multiobjective re https://ieeexplore.ieee.org	27 Сен 2010	IEEE	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[26]	4,48%	0%	Стаматина, Ольга Ринатовна Пог http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2004	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[27]	4,45%	0%	Аспекты распределений матриц https://elibrary.ru	20 Дек 2022	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[28]	4,44%	0%	Аспекты распределений матриц https://elibrary.ru	31 Дек 2021	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[29]	4,44%	2,82%	Аспекты распределений матриц http://elibrary.ru	20 Авг 2020	Публикации eLIBRARY	
[30]	4,4%	0%	ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛИМАТИЧЕС http://elibrary.ru	11 Мая 2018	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[31]	4,35%	0%	Forecast UPC-level FMCG demand, https://ieeexplore.ieee.org	28 Дек 2015	IEEE	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[32]	4,28%	0%	Exploring Graph-Based Network T https://ieeexplore.ieee.org	12 Июн 2009	IEEE	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[33]	4,11%	0%	Representing the Topology of Co https://ieeexplore.ieee.org	30 Дек 2022	IEEE	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[34]	4,11%	0%	Representing the Topology of Co https://ieeexplore.ieee.org	30 Дек 2022	IEEE	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[35]	4,01%	0%	Современные технологии произ	14 Янв 2024	Кольцо вузов	
[36]	3,95%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachme https://mdpi-res.com	07 Янв 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[37]	3,85%	0%	Компендиум по общей социолог http://ibooks.ru	09 Дек 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[38]	3,76%	0%	Техническое регулирование в ав http://ibooks.ru	09 Дек 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
			-		-	
[39]	3,76%	0%	техническое регулирование в ав https://e.lanbook.com	22 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[39] [40]	3,76% 3,76%	0% 1,38%	Texническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com	22 Янв 2020 09 Мар 2016	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[39] [40] [41]	3,76% 3,76% 3,6%	0% 1,38% 0%	Техническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com Электротехнические измерения https://book.ru	22 Янв 2020 09 Мар 2016 01 Янв 2021	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[39] [40] [41] [42]	3,76% 3,76% 3,6% 3,29%	0% 1,38% 0% 0%	техническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com Электротехнические измерения https://book.ru Анатомия человека http://studentlibrary.ru	22 Янв 2020 09 Мар 2016 01 Янв 2021 20 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Медицина	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[39] [40] [41] [42] [43]	3,76% 3,76% 3,6% 3,29% 3,24%	0% 1,38% 0% 0% 0%	Texническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com Электротехнические измерения https://book.ru Анатомия человека http://studentlibrary.ru Диплом на антиплагиант	22 Янв 2020 09 Мар 2016 01 Янв 2021 20 Янв 2020 12 Июн 2023	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Медицина Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
(39) (40) (41) (42) (43) (44)	3,76% 3,76% 3,6% 3,29% 3,24% 3,09%	0% 1,38% 0% 0% 0%	Техническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com Электротехнические измерения https://book.ru Анатомия человека http://studentlibrary.ru Диплом на антиплагиант ДИПЛОМ Морозов С.В. ФЕН	22 Янв 2020 09 Мар 2016 01 Янв 2021 20 Янв 2020 12 Июн 2023 06 Июн 2024	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Медицина Кольцо вузов (переводы и перефразирования) Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
(39) (40) (41) (42) (43) (44) (45)	3,76% 3,76% 3,6% 3,29% 3,24% 3,09% 2,84%	0% 1,38% 0% 0% 0% 0%	 Техническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com Электротехнические измерения https://book.ru Анатомия человека http://studentlibrary.ru Диплом на антиплагиант ДИПЛОМ Морозов С.В. ФЕН Серийные убийства: библиограф https://book.ru 	22 Янв 2020 09 Мар 2016 01 Янв 2021 20 Янв 2020 12 Июн 2023 06 Июн 2024 01 Янв 2017	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Медицина Кольцо вузов (переводы и перефразирования) Кольцо вузов Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
(39) (40) (41) (42) (43) (44) (45) (46)	3,76% 3,76% 3,6% 3,29% 3,24% 3,09% 2,84% 2,65%	0% 1,38% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0%	 Техническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com Электротехнические измерения https://book.ru Анатомия человека http://studentlibrary.ru Диплом на антиплагиант ДИПЛОМ Морозов С.В. ФЕН Серийные убийства: библиограф https://book.ru T. 2 http://emll.ru 	22 Янв 2020 09 Мар 2016 01 Янв 2021 20 Янв 2020 12 Июн 2023 06 Июн 2024 01 Янв 2017 21 Дек 2016	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Медицина Кольцо вузов (переводы и перефразирования) Кольцо вузов Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
 [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] 	3,76% 3,76% 3,6% 3,29% 3,24% 3,09% 2,84% 2,65% 2,64%	0% 1,38% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0%	 Техническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com Электротехнические измерения https://book.ru Анатомия человека http://studentlibrary.ru Диплом на антиплагиант ДИПЛОМ Морозов С.В. ФЕН Серийные убийства: библиограф https://book.ru Т. 2 http://emll.ru Библиография научных работ со http://emll.ru 	22 Янв 2020 09 Мар 2016 01 Янв 2021 20 Янв 2020 12 Июн 2023 06 Июн 2024 01 Янв 2017 21 Дек 2016	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Медицина Кольцо вузов (переводы и перефразирования) Кольцо вузов Сводная коллекция ЭБС Медицина Медицина	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
 [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] 	3,76% 3,76% 3,6% 3,29% 3,24% 3,09% 2,84% 2,65% 2,64% 2,52%	0% 1,38% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0%	 Техническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com Электротехнические измерения https://book.ru Анатомия человека http://studentlibrary.ru Диплом на антиплагиант ДИПЛОМ Морозов С.В. ФЕН Серийные убийства: библиограф https://book.ru Т. 2 http://emll.ru Библиография научных работ со http://emll.ru Дюдеева, Евгения Сергеевна Ис http://dlib.rsl.ru 	22 Янв 2020 09 Мар 2016 01 Янв 2021 20 Янв 2020 12 Июн 2023 06 Июн 2024 01 Янв 2017 21 Дек 2016 21 Дек 2016	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Медицина Кольцо вузов (переводы и перефразирования) Кольцо вузов Сводная коллекция ЭБС Медицина Медицина Медицина Публикации РГБ (переводы и переводы и	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
 [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] 	3,76% 3,76% 3,6% 3,29% 3,24% 3,09% 2,84% 2,65% 2,65% 2,52% 2,52%	0% 1,38% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0%	 Техническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com Электротехнические измерения https://book.ru Анатомия человека http://studentlibrary.ru Диплом на антиплагиант ДИПЛОМ Морозов С.В. ФЕН Серийные убийства: библиограф https://book.ru Т. 2 http://emll.ru Библиография научных работ со http://emll.ru Дюдеева, Евгения Сергеевна Ис http://dlib.rsl.ru Постановление Руководителя Ис http://ivo.garant.ru 	22 Янв 2020 09 Мар 2016 01 Янв 2021 20 Янв 2020 12 Июн 2023 06 Июн 2024 01 Янв 2017 21 Дек 2016 21 Дек 2016 01 Янв 2022	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Медицина Кольцо вузов (переводы и перефразирования) Кольцо вузов Сводная коллекция ЭБС Медицина Медицина Публикации РГБ (переводы и перефразирования) СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
 [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] 	3,76% 3,76% 3,6% 3,29% 3,24% 3,09% 2,84% 2,65% 2,65% 2,52% 2,31% 2,21%	0% 1,38% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0%	 Техническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com Электротехнические измерения https://book.ru Анатомия человека http://studentlibrary.ru Диплом на антиплагиант ДИПЛОМ Морозов С.В. ФЕН Серийные убийства: библиограф https://book.ru Т. 2 http://emll.ru Библиография научных работ со http://emll.ru Дюдеева, Евгения Сергеевна Ис http://dlib.rsl.ru Постановление Руководителя Ис http://ivo.garant.ru Проблемы поиска физически кр http://diss.natlib.uz 	22 Янв 2020 09 Мар 2016 01 Янв 2021 20 Янв 2020 12 Июн 2023 06 Июн 2024 01 Янв 2017 21 Дек 2016 21 Дек 2016 01 Янв 2022 15 Июл 2008 29 Авг 2014	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Медицина Кольцо вузов (переводы и перефразирования) Кольцо вузов Сводная коллекция ЭБС Медицина Медицина Медицина Публикации РГБ (переводы и перефразирования) СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
 [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] 	3,76% 3,76% 3,6% 3,29% 3,24% 3,09% 2,84% 2,65% 2,65% 2,64% 2,52% 2,31% 2,21% 2,15%	0% 1,38% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0%	 Техническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com Электротехнические измерения https://book.ru Анатомия человека http://studentlibrary.ru Диплом на антиплагиант ДИПЛОМ Морозов С.В. ФЕН Серийные убийства: библиограф https://book.ru Т. 2 http://emll.ru Библиография научных работ со http://emll.ru Дюдеева, Евгения Сергеевна Ис http://dlib.rsl.ru Постановление Руководителя Ис http://ivo.garant.ru Проблемы поиска физически кр http://diss.natlib.uz Ақтөбе қаласы әкімінің 2014 жыл http://adilet.zan.kz 	22 Янв 2020 09 Мар 2016 01 Янв 2021 20 Янв 2020 12 Июн 2023 06 Июн 2024 01 Янв 2017 21 Дек 2016 21 Дек 2016 01 Янв 2022 15 Июл 2008 29 Авг 2014 21 Янв 2016	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Медицина Кольцо вузов Сводная коллекция Сводная коллекция Сводна Сводна	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
 [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] 	3,76% 3,76% 3,6% 3,29% 3,24% 3,09% 2,84% 2,65% 2,65% 2,64% 2,52% 2,31% 2,21% 2,15%	0% 1,38% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0%	 Техническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com Электротехнические измерения https://book.ru Анатомия человека http://studentlibrary.ru Диплом на антиплагиант ДИПЛОМ Морозов С.В. ФЕН Серийные убийства: библиограф https://book.ru Т. 2 http://emll.ru Библиография научных работ со http://emll.ru Дюдеева, Евгения Сергеевна Ис http://dlib.rsl.ru Постановление Руководителя Ис http://ivo.garant.ru Проблемы поиска физически кр http://dib.rsl.nu Ақтөбе қаласы әкімінің 2014 жыл http://adilet.zan.kz Ақтөбе қаласының аумағында са http://adilet.zan.kz 	22 Янв 2020 09 Мар 2016 01 Янв 2021 20 Янв 2020 12 Июн 2023 06 Июн 2024 01 Янв 2017 21 Дек 2016 21 Дек 2016 01 Янв 2022 15 Июл 2008 29 Авг 2014 21 Янв 2016	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Медицина Кольцо вузов Сводная коллекция Сводная коллекция ЭБС Медицина Медицина Медицина Публикации РГБ (переводы и перефразирования) СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация Коллекция НБУ ИПС Адилет	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
 [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] 	3,76% 3,76% 3,6% 3,29% 3,24% 3,09% 2,84% 2,65% 2,65% 2,65% 2,64% 2,52% 2,31% 2,21% 2,15% 2,15%	0% 1,38% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0%	 Техническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com Электротехнические измерения https://book.ru Анатомия человека http://studentlibrary.ru Диплом на антиплагиант ДИПЛОМ Морозов С.В. ФЕН Серийные убийства: библиограф https://book.ru Т. 2 http://emll.ru Библиография научных работ со http://emll.ru Библиография научных работ со http://emll.ru Постановление Руководителя Ис http://ivo.garant.ru Проблемы поиска физически кр http://dib.rsl.ru Проблемы поиска физически кр http://diss.natlib.uz Ақтөбе қаласы әкімінің 2014 жыл http://adilet.zan.kz Ақтөбе қаласының аумағында са http://adilet.zan.kz 	22 Янв 2020 09 Мар 2016 11 Янв 2021 20 Янв 2020 12 Июн 2023 12 Июн 2023 13 Июн 2024 14 Акт 2016 15 Июл 2008 29 Авг 2014 21 Янв 2016 14 Янв 2016 15 Янв 2016 15 Янв 2016 15 Янв 2016	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Медицина Кольцо вузов (переводы и перефразирования) Кольцо вузов Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Медицина Медицина Медицина Медицина Коллекция ИБУ Коллекция НБУ ИПС Адилет	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
 [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] 	3,76% 3,76% 3,6% 3,29% 3,24% 3,09% 2,84% 2,65% 2,65% 2,64% 2,52% 2,31% 2,21% 2,15% 2,15% 2,15% 2,15% 2,12%	0% 1,38% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0%	Техническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com Электротехнические измерения https://book.ru Анатомия человека http://studentlibrary.ru Диплом на антиплагиант ДИПЛОМ Морозов С.В. ФЕН Серийные убийства: библиограф http://emll.ru Библиография научных работ со http://emll.ru Дюдеева, Евгения Сергеевна Ис http://dib.rsl.ru Постановление Руководителя Ис http://dib.rsl.ru Проблемы поиска физически кр http://diet.zan.kz Ақтөбе қаласы әкімінің 2014 жыл http://adilet.zan.kz Ақтөбе қаласы әкімінің аумағында са http://adilet.zan.kz Научные работы сотрудников Го http://emll.ru	22 Янв 2020 09 Мар 2016 11 Янв 2021 20 Янв 2020 12 Июн 2023 12 Июн 2023 13 Июн 2024 14 Дек 2016 15 Июл 2008 21 Янв 2022 21 Янв 2016 15 Янв 2016 21 Янв 2016 21 Янв 2016 21 Янв 2016 21 Янв 2016	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Медицина Кольцо вузов (переводы и перефразирования) Кольцо вузов Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция Сводная коллекция Сводна Сводная коллекция	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
 [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] 	3,76% 3,76% 3,6% 3,29% 3,24% 3,09% 2,84% 2,65% 2,65% 2,64% 2,52% 2,31% 2,21% 2,15% 2,15% 2,15% 2,15% 2,12%	0% 1,38% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0%	 Техническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com Электротехнические измерения https://book.ru Анатомия человека http://studentlibrary.ru Диплом на антиплагиант ДИПЛОМ Морозов С.В. ФЕН Серийные убийства: библиограф https://book.ru Т. 2 http://emll.ru Библиография научных работ со http://emll.ru Библиография научных работ со http://emll.ru Постановление Руководителя Ис http://ivo.garant.ru Проблемы поиска физически кр http://dib.rsl.ru Проблемы поиска физически кр http://dilet.zan.kz Ақтөбе қаласы әкімінің 2014 жыл http://adilet.zan.kz Ақтөбе қаласының аумағында са http://adilet.zan.kz Научные работы сотрудников Го http://emll.ru 2003 жылға арналған республик 	22 Янв 2020 09 Мар 2016 11 Янв 2021 20 Янв 2020 12 Июн 2023 06 Июн 2024 13 Дек 2016 14 Дек 2016 15 Июл 2008 29 Авг 2014 21 Янв 2016 14 Янв 2016 15 Янв 2016 15 Янв 2016 15 Дек 2016	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Медицина Кольцо вузов Сводная коллекция Сводная коллекция Сводная коллекция ЭБС Медицина Медицина Медицина Публикации РГБ переводы и перефразирования СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая сколлекция НБУ ИПС Адилет ИПС Адилет Медицина	 Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
 [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [56] 	3,76% 3,76% 3,6% 3,29% 3,24% 3,09% 2,84% 2,65% 2,65% 2,64% 2,52% 2,31% 2,15% 2,15% 2,15% 2,15% 2,12% 2,12%	0% 1,38% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0% 0%	 Техническое регулирование в ав https://e.lanbook.com 732 http://e.lanbook.com Электротехнические измерения https://book.ru Анатомия человека http://studentlibrary.ru Диплом на антиплагиант ДИПЛОМ Морозов С.В. ФЕН Серийные убийства: библиограф https://book.ru Т. 2 http://emll.ru Библиография научных работ со http://emll.ru Библиография научных работ со http://dib.rsl.ru Постановление Руководителя Ис http://dib.rsl.ru Постановление Руководителя Ис http://diss.natlib.uz Ақтөбе қаласы әкімінің 2014 жыл http://adilet.zan.kz Ақтөбе қаласы әкімінің 2014 жыл http://adilet.zan.kz Ақтөбе қаласының аумағында са http://adilet.zan.kz Научные работы сотрудников Го http://adilet.zan.kz Задачи по элементарной матема 	22 Янв 2020 09 Мар 2016 11 Янв 2021 20 Янв 2020 12 Июн 2023 12 Июн 2023 06 Июн 2024 13 Янв 2017 21 Дек 2016 15 Июл 2008 21 Янв 2022 21 Янв 2016 04 Окт 2017 21 Янв 2016 19 Дек 2016 21 Янв 2016 19 Дек 2016	Сводная коллекция ЭБС Сводная коллекция ЭБС Медицина Кольцо вузов (переводы и перефразирования) Кольцо вузов Сводная коллекция Сводная	 Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.

[57]	2,03%	0%	НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОЛИГОД	01 Авг 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[58]	2,02%	0%	Ургут тумани микротопонимлар http://diss.natlib.uz	24 Окт 2019	Коллекция НБУ	
[59]	1,86%	0%	Новые производные олигодезок http://elibrary.ru	01 Фев 2017	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[60]	1,83%	0%	Новые цвиттер-ионные олигону	18 Апр 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[61]	1,76%	0%	Тимофеев, Эдуард Николаевич д http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[62]	1,74%	0%	XX аср бошида Туркистонда мил http://diss.natlib.uz	02 Сен 2014	Коллекция НБУ	
[63]	1,74%	0%	XX аср бошида Туркистонда мил http://diss.natlib.uz	02 Сен 2014	Коллекция НБУ	
[64]	1,72%	0%	Бородулиха ауданы бойынша са http://adilet.zan.kz	21 Янв 2016	ИПС Адилет	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[65]	1,68%	0%	krasheninina_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	26 Мая 2021	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ з не является парафразом источника.
[66]	1,62%	0%	Диплом_Малова_EA	19 Мая 2022	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[67]	1,52%	0%	исследование свойств частично http://niboch.nsc.ru	03 Ноя 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ з не является парафразом источника.
[68]	1,51%	0%	Диссертация (7/10) http://niboch.nsc.ru	01 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	оИсточник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[69]	1,44%	0,13%	О ВНЕСЕНИИ ИЗМЕНЕНИЙ В ПО http://vestnik.mos.ru	30 Дек 2015	СМИ России и СНГ	
[70]	1,38%	0%	Разработка эффективных методо	20 Дек 2022	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[71]	1,36%	0%	Сравнительный анализ ГОСТ 23 http://ivo.garant.ru	22 Янв 2022	Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика	ОИсточник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[72]	1,35%	0%	openbio_tezis_2023.pdf https://openbio.ru	09 Авг 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[73]	1,35%	0%	Дилом_10_06_2	10 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[74]	1,3%	0%	Объявлен новый аукцион на пр https://minpriroda.sakha.gov.ru	29 Окт 2020	СМИ России и СНГ	
[75]	1,28%	0%	Фроловская городская Дума горо http://frolovoadmin.ru	04 Июн 2014	СМИ России и СНГ	
[76]	1,28%	0%	Древняя культура южного Согда http://diss.natlib.uz	29 Авг 2014	Коллекция НБУ	
[77]	1,24%	0%	Специальная часть http://emll.ru	20 Дек 2016	Медицина	
[78]	1,21%	0%	Сборник статей к 20-летию ин-т http://emll.ru	20 Дек 2016	Медицина	
[79]	1,21%	0%	SBB_2022.pdf https://pure.nsu.ru	03 Ноя 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[80]	1,2%	0%	Абрамова, Татьяна Вениаминов http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2012	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[81]	1,17%	0%	исследование свойств частично http://niboch.nsc.ru	03 Ноя 2023	заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ зне является парафразом источника.
[82]	1,16%	0,1%	Пункция задней цистерны мозга http://emll.ru	20 Дек 2016	Медицина	
[83]	1,15%	0,13%	Формирование и обработка сигн http://dep.nlb.by	20 Дек 2016	Диссертации НББ	
[84]	1,14%	0%	Диплом_Яковлева_final	26 Мая 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[85]	1,13%	0%	Информация о местах проведен http://novosibirsknovosti.ru	25 Янв 2011	СМИ России и СНГ	
[86]	1,12%	0%	Теоретические основы и практи http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	

[87]	1,08%	0%	Diplom_Faina_Morozova	31 Мая 2024	кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[88]	1,07%	0%	Триазиниламидофосфатные оли https://elibrary.ru	31 Дек 2021	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[89]	1,01%	0%	Репкова, Марина Николаевна Си http://dlib.rsl.ru	26 Дек 2011	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[90]	1%	0%	Диплом-Ляпин_Павел	06 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[91]	1%	0%	Помыли машины в бикини (ФОТ http://novokuzneck.bezformata.ru	15 Июл 2013	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[92]	0,87%	0%	Ертіс ауданыны? сайлау учаскел http://ertis.pavlodar.gov.kz	04 Map 2015	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[93]	0,8%	0%	Культура восточных районов Ю http://diss.natlib.uz	29 Авг 2014	Коллекция НБУ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[94]	0,74%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachme https://mdpi-res.com	07 Янв 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[95]	0,74%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/ http://niboch.nsc.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[96]	0,74%	0%	Обновление Энциклопедии суде http://ivo.garant.ru	20 Фев 2016	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[97]	0,72%	0%	Агульнасць і арэальная дыферэн	04 Июл 2017	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[98]	0,72%	0%	Постановление Правительства Р http://nomad.su	25 Дек 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[99]	0,72%	0%	Уголовная ответственность юри http://ivo.garant.ru	20 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[100]	0,71%	0%	развитие физико - химических п http://kinetics.nsc.ru	03 Ноя 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[101]	0,7%	0%	http://www.kinetics.nsc.ru/images http://kinetics.nsc.ru	29 Янв 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет е русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[102]	0,62%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/ http://niboch.nsc.ru	06 Июн 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[103]	0,62%	0%	Постановление Правительства Р http://nomad.su	08 Янв 2019	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[104]	0,61%	0%	О некоторых вопросах министер http://adilet.zan.kz	04 Окт 2017	ИПС Адилет	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[105]	0,61%	0%	Постановление Правительства Р https://i-news.kz	03 Янв 2019	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[106]	0,58%	0,58%	SBB_2022.pdf https://pure.nsu.ru	03 Ноя 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	1
[107]	0,57%	0%	Флуоресцентное мечение олиго	04 Мая 2017	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[108]	0,55%	0%	Диплом_Малова_ЕА	19 Мая 2022	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[109]	0,54%	0%	не указано http://nsu.ru	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[110]	0,52%	0%	Синтез и свойства модифициров http://elibrary.ru	05 Сен 2011	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[111]	0,5%	0%	Ўзбекистон республикаси қишло http://diss.natlib.uz	02 Map 2017	Коллекция НБУ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[112]	0,49%	0%	Астахова, Ирина Владимировна http://dlib.rsl.ru	20 Янв 2010	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[113]	0,47%	0%	Флуоресцентное мечение олиго	04 Мая 2017	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[114]	0,47%	0%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[115]	0,45%	0%	Diplom_Faina_Morozova	31 Мая 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[116]	0,42%	0%	https://irkinstchem.ru/docs/bajkal https://irkinstchem.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[117]	0,41%	0%	Просмотреть файл http://vak.ed.gov.ru	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	ОСточник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[118]	0,38%	0%	Развитие и функционирование с http://dep.nlb.by	11 Ноя 2016	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[119]	0,37%	0%	Состояние, устойчивость и прог http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[120]	0,37%	0,37%	Голышев, Виктор Михайлович Ра http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2021	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	
[121]	0,35%	0%	Метелев А.В., Образцов В.А., Поз http://ivo.garant.ru	13 Окт 2018	Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[122]	0,33%	0%	https://www.ronc.ru/upload/ibloc https://ronc.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[123]	0,33%	0%	Реализация смешанного механи http://sciact.catalysis.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[124]	0,31%	0%	https://earchive.tpu.ru/bitstream/ https://earchive.tpu.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[125]	0,31%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	03 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[126]	0,3%	0,3%	https://lomonosov2022.chem.msu https://lomonosov2022.chem.msu.r u	20 Авг 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[127]	0,29%	0,29%	МИКРОЧИПОВЫЕ УСТРОЙСТВА http://elibrary.ru	30 Авг 2014	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[128]	0,29%	0%	АТИПИЧНЫЕ СРЕДСТВА ВЗРЫВА http://elibrary.ru	01 Янв 2014	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[129]	0,28%	0%	Әкімдіктің 2009 жылғы 16 қаңтар http://adilet.zan.kz	21 Янв 2016	ИПС Адилет	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[130]	0,28%	0%	https://mdpi-res.com/d_attachme https://mdpi-res.com	16 Янв 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[131]	0,28%	0%	Модифицированные олигонукле https://findpatent.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[132]	0,28%	0%	Диплом_антиплагиат	04 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[133]	0,27%	0%	Терехов, Станислав Сергеевич У http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2016	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[134]	0,27%	0%	Приоритеты в области биомеди http://ivo.garant.ru	21 Мая 2016	Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[135]	0,26%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/ http://niboch.nsc.ru	07 Янв 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[136]	0,26%	0%	http://www.kinetics.nsc.ru/images http://kinetics.nsc.ru	02 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[137]	0,26%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/ http://niboch.nsc.ru	01 Июн 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[138]	0,25%	0%	О внесении изменений и допол http://adilet.zan.kz	04 Окт 2017	ИПС Адилет	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[139]	0,24%	0%	ADENOVIRAL VECTOR-BASED MAL http://freepatentsonline.com	09 Ноя 2016	Патенты СССР, РФ, СНГ	.Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[140]	0,24%	0%	Информационное сообщение http://salavat.bezformata.ru	17 Мая 2018	СМИ России и СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[141]	0,23%	0,06%	Микрофлюидные системы для х https://e.lanbook.com	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	
[142]	0,23%	0%	ISBN9785922113151.txt	26 Окт 2017	Кольцо вузов	
[143]	0,23%	0,23%	http://repository.pdmu.edu.ua/bit http://repository.pdmu.edu.ua	12 Фев 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	
[144]	0,22%	0%	Бизина, Екатерина Вячеславовн http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2023	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[145]	0,22%	0%	http://www.science.vsu.ru/dissert http://science.vsu.ru	19 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[146]	0,21%	0%	Автореферат http://ibmc.msk.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[147]	0,2%	0%	Ломзов, Александр Анатольевич http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2008	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[148]	0,2%	0%	Литвинова Дипломная работа	26 Мая 2022	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[149]	0,19%	0%	Перечень недвижимого имущес http://ivo.garant.ru	04 Сен 2010	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[150]	0,19%	0%	Методические указания по опре http://ivo.garant.ru	08 Фев 2016	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[151]	0,18%	0%	https://www.openbio.ru/openbio https://openbio.ru	30 Дек 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[152]	0,18%	0%	openbio_tezis_2023.pdf https://openbio.ru	09 Авг 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[153]	0,18%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	04 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[154]	0,18%	0%	Модифицированные производн http://netess.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[155]	0,18%	0%	Оптимизация условий постанов https://articlekz.com	29 Июл 2021	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[156]	0,18%	0%	https://publishing.intelgr.com/arc https://publishing.intelgr.com	28 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[157]	0,18%	0%	https://new-disser.ru/_avtoreferat https://new-disser.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[158]	0,17%	0%	Пышный, Дмитрий Владимиров http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2011	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[159]	0,16%	0%	Указание Банка России N 2926-У http://ivo.garant.ru	30 Map 2013	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[160]	0,16%	0%	Новый простой и удобный метод http://elibrary.ru	16 Янв 2015	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[161]	0,16%	0%	ТЕХНОЛОГИИ РАСПРЕДЕЛЕННОГ http://elibrary.ru	01 Янв 2012	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[162]	0,16%	0%	Государственная фармакопея Ро http://ivo.garant.ru	21 Апр 2020	СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[163]	0,16%	0%	Способ получения наноразмерн http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	.Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[164]	0,15%	0%	https://congress-infection.ru/_pict https://congress-infection.ru	30 Мая 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[165]	0,15%	0%	Коршун, Владимир Аркадьевич д http://dlib.rsl.ru	25 Дек 2015	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[166]	0,14%	0%	https://mipt.ru/upload/medialibra https://mipt.ru	16 Июл 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[167]	0,14%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	03 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[168]	0,14%	0%	Никулин, Михаил Владимирович http://dlib.rsl.ru	раньше 2011	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[169]	0,14%	0%	Стеклянные украшения X–XIV вв http://dep.nlb.by	06 Дек 2018	Диссертации НББ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[170]	0,13%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/ http://niboch.nsc.ru	27 Дек 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[171]	0,13%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/ http://niboch.nsc.ru	21 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[172]	0,13%	0%	не указано http://ivo.garant.ru	03 Авг 2022	СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[173]	0,13%	0%	Использование пенообразующи https://tekhnosfera.com	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[174]	0,12%	0%	Вестник гематологии. Том IX. № http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[175]	0,08%	0%	Биоорганическая химия. Т. 47, Н https://sciencejournals.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[176]	0,07%	0%	https://new.ras.ru/upload/iblock/5 https://new.ras.ru	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[177]	0,07%	0%	https://pure.spbu.ru/ws/portalfile https://pure.spbu.ru	18 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[178]	0,05%	0%	https://s3.dtln.ru/unti-prod-peopl https://s3.dtln.ru	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчёт о проверке текста научно-квалификационной работы на объём заимствования

Барановская Елизавета Евгеньевна

«Фосфорамидные азольные олигонуклеотиды: синтез, свойства и применение»

Оригинальность работы составляет 93.62%, что соответствует требованиям порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на заседании Итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь АК – к.б.н. С.К. Мирошниченко