

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

На правах рукописи

Жарков Тимофей Дмитриевич

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Получение и свойства новых модифицированных олигонуклеотидов, содержащих
триазиновую группу

Направление подготовки	1.4. Химические науки
Специальность	1.4.9 – Биоорганическая химия

Аспирант	Жарков Тимофей Дмитриевич
Научный руководитель	к.х.н. Купрюшкин Максим Сергеевич
Рецензент	к.х.н. Мещанинова Мария Ивановна

Новосибирск – 2025

Оглавление

Список сокращений.....	5
1. ВВЕДЕНИЕ	8
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
2.1. Типы модифицированных олигонуклеотидов и подходы к их получению – вводимые ограничения.....	13
2.2. Подходы к введению модификаций в азотистые основания в составе нуклеозида	17
<i>2.2.1. Функционализация азотистых оснований с использованием различных реакций циклоприсоединения</i>	<i>18</i>
<i>2.2.2. Функционализация азотистых оснований с использованием различных реакций конденсации</i>	<i>24</i>
2.3. Подходы к введению модификаций в (дезокс)рибозный цикл в составе нуклеозида	29
<i>2.3.1. Аналоги нуклеозидов, содержащие химические модификации в 2'-положении рибозного цикла</i>	<i>29</i>
<i>2.3.2. Аналоги нуклеозидов, содержащие замкнутый или разомкнутый рибозный цикл</i>	<i>31</i>
<i>2.3.3. Аналоги нуклеозидов на основе альтернативных циклических структур</i>	<i>34</i>
2.4. Методы получения фосфат-модифицированных олигонуклеотидов.....	39
2.4.1. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-S	40
2.4.1.1. Получение тиофосфатов.....	40
2.4.1.2. Получение дитиофосфатов.....	43
2.4.1.3. Получение тиолофосфатов	45
2.4.2. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-B.....	47
2.4.3. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-C.....	49
2.4.3.1. Получение метилфосфонатов.....	49
2.4.3.2. Получение этинилфосфонатов	51
2.4.3.3. Получение отрицательно заряженных C-фосфонатов	52
2.4.4. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-O-R..	57
2.4.5. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-N.....	58
2.4.5.1. Получение N-алкиламидофосфатов.....	60
2.4.5.2. Получение сульфониламидофосфатов	61
2.4.5.3. Получение фосфорилгуанидинов	62
2.4.5.4. Получение N3'-P5' амидофосфатов.....	64
2.5. Заключение	66
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	69
3.1. Химические реагенты	69

3.2. Азидо-триазины	69
<i>3.2.1. Методы характеристики и очистки азидо-триазинов</i>	<i>69</i>
<i>3.2.2. Органический синтез азидо-триазинов.....</i>	<i>70</i>
3.3. Синтез олигонуклеотидов	75
3.4. Характеризация и очистка олигонуклеотидов	83
3.5. Методы исследования олигонуклеотидов.....	84
<i>3.5.1. Формирование ДНК-дуплексов и определение температур их плавления.....</i>	<i>84</i>
<i>3.5.2. Исследование олигонуклеотидов методом динамического светорассеяния</i>	<i>84</i>
<i>3.5.3. Исследование химической устойчивости олигонуклеотидов</i>	<i>84</i>
<i>3.5.4. Исследование устойчивости олигонуклеотидов к нуклеазам цельноклеточных экстрактов</i>	<i>85</i>
<i>3.5.5. Исследование цитотоксичности олигонуклеотидов</i>	<i>85</i>
<i>3.5.6. Исследование эффективности внутриклеточного проникновения олигонуклеотидов методом проточной цитофлуорометрии</i>	<i>85</i>
<i>3.5.7. Исследование внутриклеточной локализации олигонуклеотидов методом конфокальной микроскопии.....</i>	<i>86</i>
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	88
4.1. Выбор подхода к модификации олигонуклеотидов и общей структуры реагентов-модификаторов	88
4.2. Пути получения азидо-триазинов и триазиниламидофосфатных групп.....	90
<i>4.2.1 Структура и способы получения различных 2-азидо-1,3,5-триазинов в качестве реагентов-модификаторов</i>	<i>90</i>
<i>4.2.2 Общие структуры триазиниламидофосфатных групп, полученных с применением различных 2-азидо-1,3,5-триазинов.....</i>	<i>94</i>
4.3. Оценка эффективности получения модельных триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов с применением различных 2-азидо-1,3,5-триазинов	95
<i>4.3.1 Реакционная способность 2-азидо-1,3,5-триазинов.....</i>	<i>96</i>
<i>4.3.2. Стабильность модифицированного звена олигонуклеотида</i>	<i>103</i>
<i>4.3.2.1. Влияние этапа β-элиминирования на эффективность получения триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов.....</i>	<i>103</i>
<i>4.3.2.2. Варианты деградации триазирилфосфазеновой группы и заместителей в ее составе.....</i>	<i>105</i>
4.4. Разнообразие функциональных групп в составе триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов	108
<i>4.4.1. Получение функционализированных олигонуклеотидов с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина</i>	<i>108</i>
<i>4.4.1.1. Одностадийное введение заместителей в триазиновый остов.....</i>	<i>109</i>
<i>4.4.1.2. Поэтапная сборка заместителей в триазиновом остове</i>	<i>111</i>

4.4.2. Получение функционализированных олигонуклеотидов с применением других 2-азидо-1,3,5-триазинов.....	113
4.5. Возможности и ограничения различных подходов к получению триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов	117
4.5.1. Получение гетероолигонуклеотидов с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина	117
4.5.2. Получение триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов в автоматическом режиме	119
4.6. Свойства некоторых представителей класса триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов	122
4.6.1. Физико-химические свойства олигонуклеотидов.....	122
4.6.1.1. Химическая устойчивость триазиниламидофосфатной модификации	122
4.6.1.2. Гибридизационные свойства триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов.....	123
4.6.2. Ферментативная устойчивость и цитотоксичность олигонуклеотидов.....	126
4.6.3. Проникновение триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов в клетки	130
4.6.3.1. Сравнение эффективности проникновения с другими додецил-содержащими производными	132
4.6.3.2. Зависимость эффективности проникновения от параметров олигонуклеотидной системы.....	136
4.7. Заключение	145
5. ВЫВОДЫ	149
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	150

Список сокращений

ANA (arabinonucleic acid) – арабинонуклеиновая кислота;

BNA (bridged nucleic acid) – «мостиковая» нуклеиновая кислота;

BSA – (N,O-бистриметилсилил)ацетамид;

CPG (controlled pore glass) – стекло с контролируемым размером пор;

CRISPR/Cas9 (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/Cas9) – система редактирования генома;

CuAAC (Cu azide alkyne cycloaddition) – медь-катализируемое азид-алкиновое циклоприсоединение;

DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол, краситель для ядер клеток;

DBU – 1,8-дiazобикарбодиимид;

DDTT – N,N-диметил-N'-(3-тиооксо-3H-1,2,4-дитиазол-5-ил)метанимидаид, сульфидирующий реагент для олигонуклеотидов;

DIPEA – (N,N-диизопропил)этиламин;

DMAPE – (N,N-диметиламино)пропиламин;

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) – модифицированная среда по методу Dulbecco;

DMF – диметилформамид;

DMI – диметилимидазолидин фосфорилгуанидиновая группа;

DMP – периодинан Десса-Мартина;

DMTr – 4,4'-диметокситритильная группа;

ESI-MS (electrospray ionization mass-spectrometry) – масс-спектрометрия с ионизацией распылением в электрическом поле;

EtOAc – этилацетат;

FAM – 6-карбоксифлуоресцеиновая группа;

FANA (fluoroarabinonucleic acid) – фтороарабинонуклеиновая кислота;

FBS (fetal bovine serum) – зародышевая бычья сыворотка;

HEK293T (human embryonic kidney) – immortalized линия клеток почек эмбриона человека;

IC₅₀, IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования;

iEDDA (inverse electron demanding Diels-Alder reaction) – инвертированная реакция Дильса-Альдера;

IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) – среда Dulbecco модифицированная по Iscove;

LF – доставщик нуклеиновых кислот Lipofectamine2000;
 LNA (locked nucleic acid) – «замкнутая» нуклеиновая кислота;
 MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight) – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией;
 mCPBA – мета-хлорнадбензойная кислота;
 MOE – метоксиэтильная группа;
 PADS – фенилацетилдисульфид;
 PBS (phosphate buffered saline) – фосфатно-солевой буфер;
 PLE (porcine liver esterase) – эстераза из печени свиньи;
 PMO (phosphorodiamidate morpholino oligomer) – морфолиновые олигонуклеотиды;
 PNA (peptide nucleic acid) – пептидная нуклеиновая кислота;
 Py – пиридин;
 Rf (retraction factor) – коэффициент удерживания в ТСХ;
 RFU (relative fluorescence unit) – относительные единицы флуоресценции;
 RISC (RNA-induced silencing complex) – РНК-индуцированный комплекс выключения гена;
 SATE – S-ацил-2-тиоэтильная группа;
 sgPHK (single guide PHK) – направляющая РНК в системе CRISPR/Cas9;
 siPHK (small interfering PHK) – малая интерферирующая РНК;
 SPAAC (strain-promoted azidealkyne cycloaddition) – реакция циклоприсоединения, протекающая за счет искажения орбиталей;
 SVPDE (snake venom phosphodiesterase) – фосфодиэстераза змеиного яда;
 T98G – иммортализованная линия клеток глиобластомы человека;
 TBE (tris/borate/EDTA) – трис-боратный буфер;
 THF – тетрагидрофуран;
 UNA (unlocked nucleic acid) – «разомкнутые» нуклеиновые кислоты
 μ – электрофоретическая подвижность;
 ВИЧ – вирус иммунодефицита человека;
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
 ДСР – динамическое светорассеяние;
 ЖМКО – жесткость-мягкость кислот и оснований;
 ИК – инфракрасный;
 НК – нуклеиновая кислота;
 ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;
 ПААГ – полиакриламидный гель;

ПЦР – полимеразно-цепная реакция;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

РНКаза Н – рибонуклеаза Н;

ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин;

Тпл, Tm – температура плавления дуплексов олигонуклеотидов;

ТСХ – тонкослойная хроматография;

ФГ – фосфорилгуанидин;

ФГО – фосфорилгуанидиновый олигонуклеотид;

ЭДТА – этилендиамин тетраацетат;

ЯМР – ядерный магнитный резонанс.

1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время применение синтетических олигонуклеотидов в качестве различных молекулярно-биологических инструментов активно развивается. Наиболее перспективной областью применения олигонуклеотидов можно назвать терапию заболеваний, обусловленных нарушением различных процессов при реализации генетической информации. Так, по состоянию на 2025 год одобрено уже более 20 препаратов на основе олигонуклеотидов для лечения подобных заболеваний, и их число продолжает кратно увеличиваться [1–6]. Все НК-препараты представляют собой олигонуклеотиды, содержащие в своем составе различные химические модификации, которые наделяют олигонуклеотид свойствами, важными в контексте терапевтического применения, тем самым повышая его терапевтический потенциал. С помощью введения модификаций возможно повысить эффективность проникновения олигонуклеотидов через клеточную мембрану, и, как следствие, эффективность доставки препаратов, увеличить устойчивость к ферментативному и химическому расщеплению, понизить цитотоксичность, скорректировать биораспределение и избирательность связывания с комплементарной мишенью, и т.п. [1, 7–9]. Несмотря на то, что целый ряд модификаций уже рутинно применяется при создании НК-препаратов (например, тиофосфатные, 2'-F и 2'-МОЕ модификации), научное сообщество продолжает предлагать новые типы модификаций для более тонкой регуляции свойств терапевтических олигонуклеотидов с целью максимизации их эффективности.

Ключевым фактором при создании новых типов НК-модификаций, определяющим эффективность их дальнейшего изучения, является возможность их введения в состав олигонуклеотида в рамках автоматического твердофазного амидофосфитного синтеза – стандартного метода получения олигонуклеотидов. Для этого во многих случаях используют строительные блоки синтеза в виде структурно измененных амидофосфитных мономеров, а также стратегии, основанные на незначительном изменении протоколов синтеза. С применением данных методов было получено подавляющее большинство из известных модификаций нуклеиновых кислот.

Каждый тип химической модификации наделяет олигонуклеотид уникальным набором свойств. При этом эффекты от одних модификаций проявляются лишь при их множественном введении в олигонуклеотид, а от других – при встраивании в единичном варианте. При создании НК-препаратов нового поколения исследователи прибегают к использованию все более сложных комбинаций модификаций [10, 11], что позволяет получать олигонуклеотиды с очень четко заданными свойствами. Несмотря на возможность быстрого и автоматизированного синтеза модифицированных НК, получение подобных

олигонуклеотидов достаточно ресурсозатратно. Кроме того, даже для незначительного изменения совокупности свойств олигонуклеотида, зачастую необходимо значительно изменять соотношение и состав модификаций. Для более тонкого настраивания свойств олигонуклеотидов возможно использование универсальных подходов, позволяющих варьирование функциональных групп, обуславливающих различные свойства, в рамках однотипных модификаций. В настоящее время, однако, подобных подходов практически не существует.

Таким образом, разработка новых типов химических модификаций нуклеиновых кислот является актуальной задачей, в частности в области терапевтических олигонуклеотидов. При этом использование гибкого подхода для введения новых модификаций в состав олигонуклеотидов, совместимого с твердофазным амидофосфитным синтезом с возможностью варьирования функциональных групп модификаций для тонкого настраивания свойств олигонуклеотидов, позволило бы в значительной мере повысить эффективность создания и исследования НК с потенциалом терапевтического применения.

Целью данной работы является разработка подхода к получению нового типа модифицированных олигонуклеотидов в виде триазиниламидофосфатных производных, а также изучение некоторых их свойств, важных в контексте терапевтического применения.

Задачи, которые необходимо решить для достижения поставленной цели:

1. Разработать и оптимизировать ряд способов получения триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов в рамках основного подхода, основанного на реакции Штаудингера с применением различных реагентов-модификаторов в виде азидо-триазинов.
2. Получить библиотеку триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов, несущих различные заместители, и определить границы применимости разработанных способов с точки зрения функционализации олигонуклеотидов.
3. Изучить ряд физико-химических свойств триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов, а именно химическую устойчивость, образование комплементарных комплексов и способность к образованию супрамолекулярных комплексов.
4. Исследовать биологические свойства триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов, в том числе ферментативную устойчивость, цитотоксичность, способность к внутриклеточному проникновению и характер внутриклеточного распределения.

Научная новизна представляемой работы заключается в разработке подхода к получению нового типа модифицированных олигонуклеотидов, а именно триазиниламидофосфатных производных, с применением реакции Штаудингера. Реагенты-

модификаторы на основе различных 2-азидо-1,3,5-триазинов позволяют получать триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды с эффективностью вплоть до 95%. Один из способов получения триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов, основанный на применении 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, позволяет эффективно варьировать заместители в составе триазинового остова модификации. В исследовании были впервые синтезированы триазиниламидофосфатные НК-производные, несущие гидрофобные и катионные функциональные группы, заместители с остатками аминов и спиртов, а также заместители сложной структуры, полученные путем поэтапной сборки на твердофазном носителе. Показано, что разработанные триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды стабильны в широком диапазоне pH и не подвержены нуклеазному расщеплению при обработке цельноклеточными экстрактами. Для додецил-содержащих триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов продемонстрирована способность к образованию мицеллоподобных структур, а также высокая эффективность клеточного проникновения, превышающая таковую для других гидрофобных олигонуклеотидов. Установлен ряд корреляций между составом фосфатных модификаций в структуре додецил-содержащих триазиниламидофосфатных производных и степенью их внутриклеточного накопления.

Практическая значимость проведенного исследования заключается в разработке нового класса модифицированных нуклеиновых кислот с возможностью гибкого варьирования функциональных групп. В работе получен широкий набор олигонуклеотидов, несущих различные гидрофобные и катионные группы, а также заместители уникальной структуры, что позволяет рассматривать разработанный подход в качестве универсального инструмента для наделения нуклеиновых кислот заданными свойствами. Додецил-содержащие триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды, обладающие высокой степенью внутриклеточного накопления, могут быть использованы в качестве эффективных доставщиков НК в клетки.

Методология и методы исследования

Основные результаты работы получены с применением методов ИК-спектроскопии, ЯМР-спектроскопии на ядрах ^1H и ^{13}C , обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, ионно-обменной хроматографии, электрофореза в полиакриламидном геле, масс-спектрометрии MALDI-TOF и ESI-MS, динамического светорассеяния, цитофлуорометрии, конфокальной микроскопии, термической денатурации с оптической регистрацией сигнала.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан подход к получению нового класса модифицированных олигонуклеотидов, несущих триазиниламидофосфатную группу, основанный на реакции Штаудингера с применением азидо-триазинов.
2. Реагенты-модификаторы в виде 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина и различных 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов позволяют получать триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды с возможностью широкой вариации функциональных групп с эффективностью вплоть до 95%.
3. Триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды стабильны в кислых и щелочных водных растворах, минимально дестабилизируют комплементарный комплекс, незначительно деградируют при взаимодействии с нуклеазами цельноклеточных экстрактов, а также не обладают выраженной цитотоксичностью.
4. Додecil-содержащие триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды накапливаются в клетках с высокой эффективностью, сопоставимой с доставкой нуклеиновых кислот коммерческим реагентом Lipofectamine2000.
5. Эффективность проникновения додecil-содержащих триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов выше, чем для других гидрофобных производных нуклеиновых кислот, и зависит от ряда параметров олигонуклеотидной системы, в том числе от состава модификаций в структуре олигонуклеотида.

Апробация и публикация результатов

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, а также получен патент на изобретение в РФ. Результаты, представленные в работе, апробированы на 7 конференциях всероссийского и международного уровней в форме устных и стендовых докладов: Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» (2022, г. Томск), Всероссийская конференция «Синтетическая биология и биофармацевтика» (2022, г. Новосибирск), Молодежная научная школа-конференция «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты» (2023, г. Казань), Молодежная школа-конференция «BioTop-2023. Достижения молодых ученых ИХБФМ СО РАН» (2023, г. Новосибирск), Молодежная школа-конференция «Современные вызовы структурной и синтетической биологии» (2024, п. Шерегеш), V Всероссийская конференция «Физико-химическая биология» (2024, г. Новосибирск), II школа молодых ученых «Современные вызовы молекулярной биологии» (2025, п. Шерегеш).

Личный вклад автора

Автором работы синтезированы все азиды-модификаторы и триазиниламидофосфатные олигонуклеотидные производные, проведены электрофоретический и хроматографический анализы олигонуклеотидов, исследование и характеристика додецил-содержащих триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов методом динамического светорассеяния. Также автором принято непосредственное участие в интерпретации результатов работы, полученных другими методами. Спектры ИК, ^1H ЯМР и ^{13}C ЯМР азидов-модификаторов зарегистрированы в ЦКП при НИОХ СО РАН. Масс-спектры MALDI-TOF и ESI-MS олигонуклеотидов зарегистрированы сотрудником ОЦКП ЦМСА ИХБФМ СО РАН Олейник Г.А. (зав. – д.х.н., Чернонос А.А.). Термическая денатурация с оптической регистрацией сигнала дуплексов олигонуклеотидов проведена сотрудником ЛСТБ ИХБФМ СО РАН, к.ф.-м.н. Голышевым В.М. (зав. лаб. – к.ф.-м.н. Ломзов А.А.). Результаты цитофлуорометрии и конфокальной микроскопии для додецил-содержащих олигонуклеотидов получены сотрудником ЛБНК ИХБФМ СО РАН, к.б.н. Марковым О.В. (зав. лаб. – чл.-корр. РАН, д.б.н. Зенкова М.А.). Эксперименты по определению цитотоксичности олигонуклеотидов и их устойчивости к действию нуклеаз цельноклеточных экстрактов проведены сотрудником ЛБХФ ИХБФМ СО РАН, к.х.н. Ильиной Е.С. (зав. лаб. – академик РАН, д.х.н. Лаврик О.И.).

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждений, выводов, списка литературы. Работа изложена на 169 страницах, содержит 75 рисунков и 6 таблиц. Библиография включает 218 литературных источников.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Типы модифицированных олигонуклеотидов и подходы к их получению – вводимые ограничения

В настоящее время научным сообществом предложено значительное количество вариантов химических модификаций олигонуклеотидов. С точки зрения строения нуклеотидного звена – мономерной единицы олигонуклеотида – существует три различных структурных элемента, в которых может присутствовать химическая модификация, а именно азотистое основание, остаток (дезокси)рибозы, и фосфатная группа. В настоящем обзоре будут рассмотрены все три типа структурных элементов и различные варианты структур их модификаций, однако их разнообразие будет ограничено для возможности корректной систематизации. В рамках установленного ограничения будут рассмотрены только такие модификации, которые могут быть введены в состав олигонуклеотида в рамках какого-либо структурного элемента нуклеотидного звена непосредственно в процессе стандартного твердофазного амидофосфитного синтеза без возможных постсинтетических обработок полученной последовательности. Кроме того, структуры рассматриваемых модификаций должны быть устойчивы на протяжении всего олигонуклеотидного синтеза. Для определения конкретных типов соединений и реакций, позволяющих вводить модификации, следует отдельно рассмотреть цикл амидофосфитного синтеза (Рис. 1).

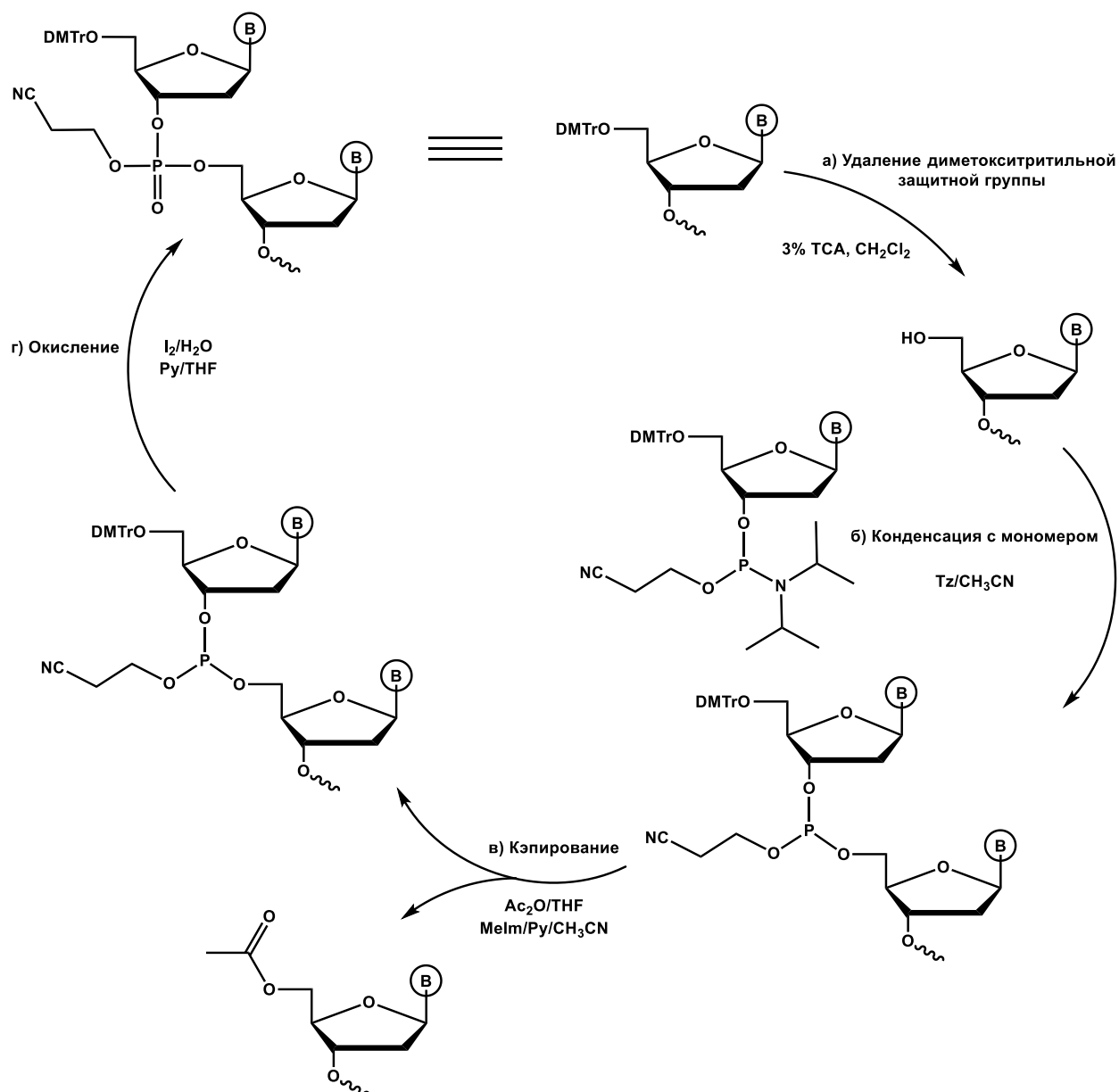


Рис. 1. Общая схема цикла твердофазного амидофосфитного синтеза, состоящего из стадий деблокирования (а), введения мономера (б), «кэпирования» (в) и окисления (г); В – азотистое основание, DMTr – диметокситригильная группа.

Цикл твердофазного амидофосфитного синтеза состоит из четырех этапов. На первом этапе с предыдущего нуклеотидного звена деблокируется защитная 4,4'-диметокситригильная (DMTr-) группа с формированием свободной 5'-ОН группы (Рис. 1, а). На следующем этапе происходит присоединение амидофосфитного мономера следующего нуклеотидного звена к 5'-ОН группе растущей цепи с образованием интермедиата, содержащего фосфит-триэфирную группу (Рис. 1, б). После этапа конденсации происходит так называемая стадия «кэпирования» – ацилирование 5'-ОН групп, непрореагировавших с амидофосфитным мономером (Рис. 1, в). Наконец на последнем этапе цикла фосфит-триэфирная группа окисляется до фосфатной путем

обработки олигонуклеотида раствором состава $I_2/Py/H_2O$ (Рис. 1, г). В результате указанных последовательных реакций, растущая олигонуклеотидная цепь удлиняется на один нуклеотид, и далее цикл синтеза повторяется до получения полноразмерной последовательности.

Для введения модификаций в олигонуклеотид в рамках каждого из трех различных структурных элементов нуклеотидного звена применяются определенные подходы. Так, для получения олигонуклеотида с модифицированными азотистыми основаниями или (дезокс)рибозным циклом используют соответствующие амидофосфитные мономеры (примеры мономеров приведены на Рис. 2, а, Рис. 2, б). В свою очередь для введения модификаций в состав фосфатных групп олигонуклеотида чаще всего используют метод альтернативного окисления. Для этого на этапе превращения фосфит-триэфирной группы в фосфатную, стандартную смесь $I_2/Py/H_2O$ заменяют на альтернативные окисляющие реагенты с получением различных структур (пример реакции альтернативного окисления приведен на Рис. 2, в). Для получения ряда фосфат-модифицированных олигонуклеотидов также могут быть использованы мономеры с альтернативной фосфитной компонентой, которые при встраивании в растущую олигонуклеотидную цепь окисляют по стандартным протоколам (Рис. 2, г).

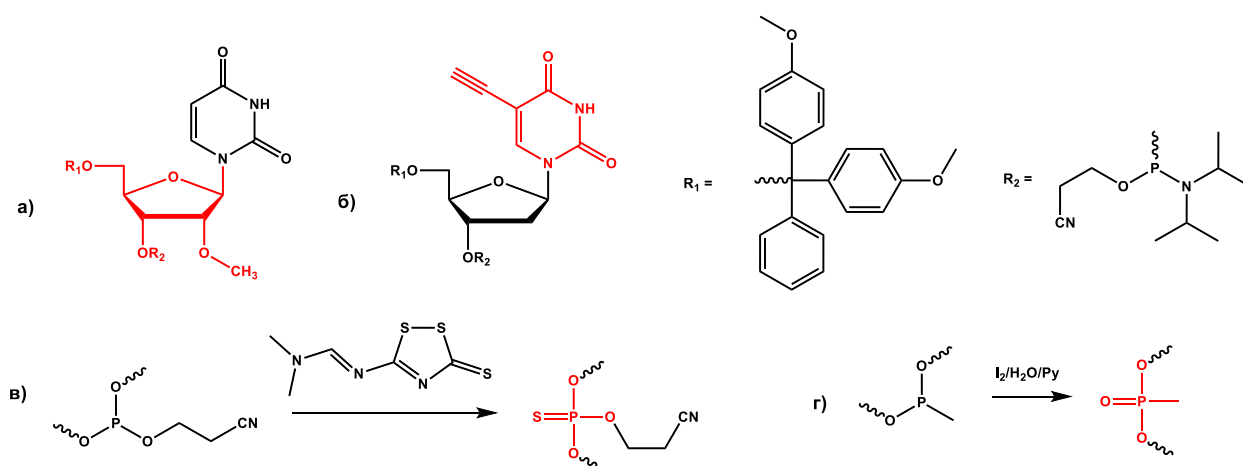


Рис. 2. Структура модифицированных амидофосфитных мономеров для введения модификаций по (дезокс)рибозному остатку и азотистому основанию на примере 2'-О-метил-уридинового мономера (а) и 5-этилтил-дезоксиридинового мономера (б); альтернативное окисление фосфит-триэфирной группы (в) и использование альтернативных мономеров со стандартным окислением (г) для получения фосфат-модифицированных олигонуклеотидов на примере получения тиофосфатной и метилфосфонатной модификации.

Для получения любого варианта амидофосфитного мономера, содержащего модификацию в составе углеводной части или азотистого основания, необходим соответствующий нуклеозид, к свободным 3'- и 5'-ОН группам которого по стандартным

протоколам присоединяются активная амидофосфитная и защитная DMTg-группы соответственно. Для дополнительного упрощения классификации возможных модификаций указанных структурных элементов нуклеотидного звена, в обзоре будут рассмотрены структуры и схемы получения только модифицированных нуклеозидов. В качестве дополнительного вводимого ограничения к рассматриваемым модифицированным структурам будут относиться только такие нуклеозиды, которые могут быть получены из природных аналогов, а именно (дезокси)рибозного цикла и четырех основных азотистых оснований (тимин, гуанин, аденин, цитозин).

Для синтеза фосфат-модифицированных олигонуклеотидов с применением метода альтернативного окисления в большинстве случаев используют стандартные амидофосфитные мономеры. При рассмотрении таких производных будут приведены их структуры и механизмы получения при окислении фосфит-триэфирных групп. В то же время, для получения некоторых производных в рамках альтернативного окисления могут быть использованы нестандартные мономеры с другими защитными и активными группами. В том случае, если используемые схемы синтеза и соединения могут быть адаптированы под стандартные протоколы амидофосфитного синтеза, а также структура олигонуклеотида по окончании синтеза содержит только модифицированные фосфатные группы, такие производные и методы их получения также будут рассмотрены в обзоре.

При получении некоторых модифицированных фосфатных групп проводят стандартное окисление альтернативного фосфитного звена. Для таких производных будут рассмотрены методики получения фосфитной компоненты мономера для олигонуклеотидного синтеза. По аналогии с производными, получаемыми по методу альтернативного окисления, фосфатные модификации, введенные с использованием нестандартных мономеров, будут рассмотрены только в случае возможности адаптации схемы их получения к стандартным протоколам амидофосфитного синтеза.

Таким образом, в настоящем обзоре литературы будут приведены различные схемы получения модифицированных азотистых оснований, (дезокси)рибозного остатка и фосфатных групп олигонуклеотида в рамках установленных ограничений и классификаций. Вдобавок, для каждой приведенной структуры модификаций будут кратко перечислены полезные свойства, проявляемые олигонуклеотидом, содержащим данную модификацию, а также области их применения.

2.2. Подходы к введению модификаций в азотистые основания в составе нуклеозида

Одним из популярных мест введения различных модификаций в состав олигонуклеотида являются азотистые основания. Азотистые основания представляют собой гетероциклические структуры, соединенные с углеводным остатком нуклеотида посредством N-гликозидной связи и подразделяются на бициклические пурины и моноциклические пиримидины. Наиболее предпочтительными и распространенными положениями для введения модификации в структуре азотистых оснований можно назвать 2-ое и 8-ое положение в составе пуринов и 5-ое и 6-ое положение в составе пиримидинов (Рис. 3). Стоит отметить, что помимо модифицированных структур природных азотистых оснований, существует также и множество вариантов гетероциклов для введения в состав олигонуклеотида в качестве альтернативных азотистых оснований. В связи с огромным количеством подобных гетероциклов и невозможностью полного структурирования всех вариантов альтернативных азотистых оснований, в данном обзоре будут рассмотрены лишь варианты модифицированных азотистых оснований, полученных из природных гетероциклов. Кроме того, все рассматриваемые гетероциклы по умолчанию входят в состав соответствующих амидофосфитных мономеров для возможности их введения в структуру олигонуклеотида с применением стандартных протоколов синтеза.

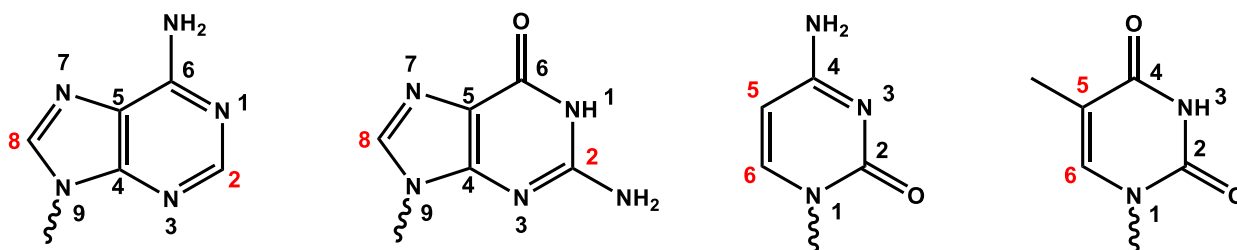


Рис. 3. Структуры природных пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований. Положения, чаще всего подвергающиеся модификации, обозначены красным.

Существует несколько способов введения модификаций по указанным положениям азотистых оснований, в основе которых лежит активация С-Н связи в составе гетероцикла. Самый распространенный способ заключается в предварительном галогенировании пуринов и пиримидинов путем электрофильного замещения атома водорода с введением атомов иода или брома с применением различных галогенирующих агентов [12, 13]. Впоследствии атомы галогена селективно замещают на алкенильные, алкинильные или арильные группы с использованием различных катализаторов на основе палладия или цезия. Другие способы основаны на непосредственной активации С-Н связи азотистых

оснований катализаторами и их взаимодействии с алкенами, алкинами или ароматическими соединениями или их галогенированными производными (Рис. 4) [14].

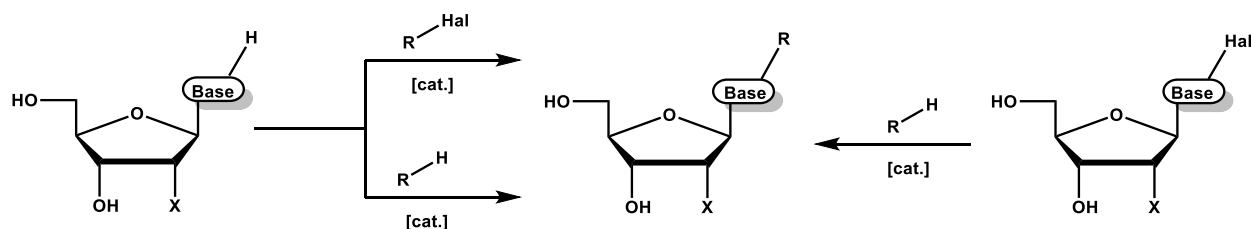


Рис. 4. Варианты модификации азотистых оснований через активацию C-H связи; Base – азотистое основание; X = H, OH; Hal = Br, I; R = алкенил, алкинил, арил.

2.2.1. Функционализация азотистых оснований с использованием различных реакций циклоприсоединения

Зачастую вводимые в состав азотистых оснований остатки содержат дополнительные группы для дальнейшей функционализации, например, для проведения реакций медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения (CuAAC, одна из «клик»-реакций). Реакция основана на взаимодействии азидо-группы и терминального остатка алкина с образованием триазольных циклов через ряд медь-содержащих интермедиатов. Соответственно, для проведения «клик»-реакции в структуре азотистого основания должны присутствовать одна из двух указанных функциональных групп.

Вариант с использованием азид-содержащих азотистых оснований менее популярен, что связано с проблематичностью введения таких структур в состав олигонуклеотида в ходе твердофазного амидофосфитного синтеза в силу деградации азидо-группы [15]. В связи с этим олигонуклеотиды, содержащие азидо-группу в составе азотистых оснований, получают путем либо предварительного синтеза модифицированного нуклеозид-трифосфата и его последующего ферментативного включения в состав ДНК, либо при помощи постсинтетической модификации, например, с конверсией аминогруппы [16]. При этом метод ферментативного синтеза находит более широкое применение в связи с его высокой эффективностью и избирательностью.

Введение азидо-групп в структуру азотистых оснований может осуществляться как напрямую путем замещения атомов галогена, так и по другим реакциям с использованием реагентов, в которых реакционноспособная группа соединена с азидогруппой различными линкерами. Так, например, в работе [17] *para*-азидофенильная группа была введена в состав иодированных цитозина и аналога аденозина по реакции Сузуки-Мияуры с применением 4-азидофенилтрифторбората калия (Рис. 5а). После дальнейшего избирательного циклоприсоединения ароматических алкинов, соответствующие нуклеозиды далее были

конвертированы в трифосфаты и введены в состав олигонуклеотида ферментативным способом. Подобные системы с комбинациями модифицированных азотистых оснований использовались для электрохимической детекции взаимодействия ДНК с белками. В качестве примеров структур, в которых азидо-группа соединена с гетероциклом азотистого основания напрямую, можно назвать 5-азидо-2'-дезоксидеоксиуридин и 5-(азидометил)-2'-дезоксидеоксиуридин. Получение азидометильного производного основано на простом нуклеофильном замещении атома брома в составе 5-(бромметил)-2'-дезоксидеоксиуридина с использованием азидата натрия [18] (Рис. 5б), в то время как для синтеза 5-азидо-2'-дезоксидеоксиуридина используется более сложная последовательность реакций бензиламинирования/восстановления [19] (Рис. 5в). В работе [18] указанные структуры были использованы в качестве субстратов для дальнейшего встраивания в структуру клеточной ДНК и метаболитического флуоресцентного мечения алкин-содержащими красителями.

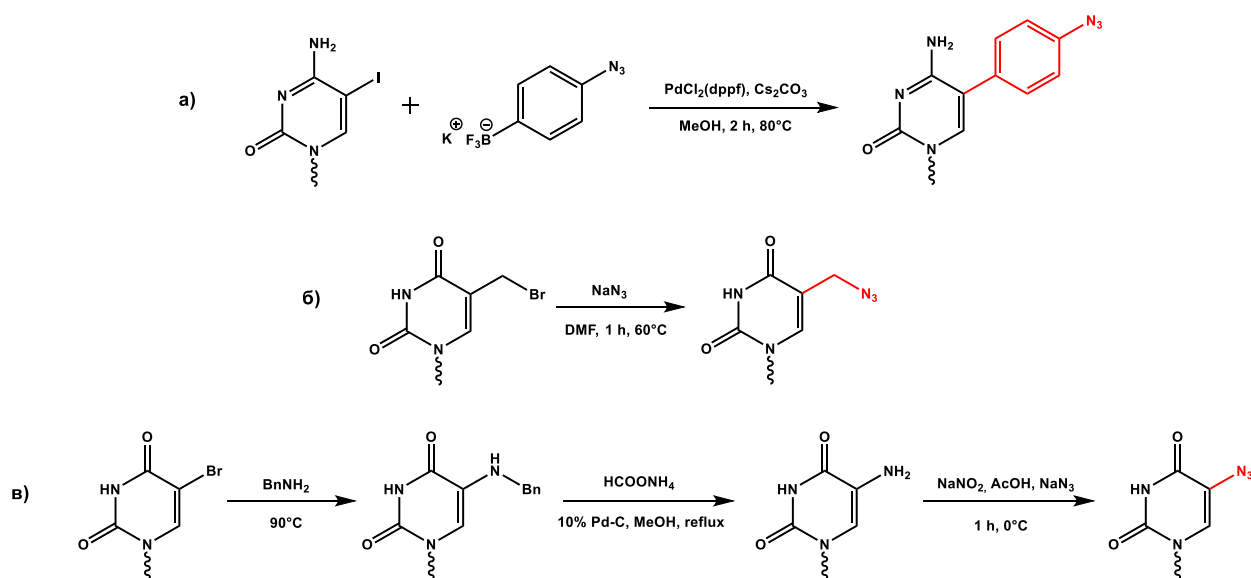


Рис. 5. Схемы получения различных азид-содержащих азотистых оснований – 5-(пара-азидофенил)-цитидина (а), 5-(азидометил)-урацила (б) и 5-азидо-урацила (в).

Структуры, содержащие алкин-модифицированные азотистые основания, являются более распространенными для проведения «клик»-реакций. Алкиновые группы стабильны в ходе твердофазного синтеза олигонуклеотидов, в связи с чем, помимо модифицированных нуклеозид-трифосфатов для ферментативного встраивания, существует ряд соответствующих коммерчески доступных амидофосфитных мономеров для химического синтеза (см, например, каталог производителя GlenResearch, www.glenresearch.com). К самым популярным алкин-содержащим структурам можно отнести 5-этинил-2'-

дезоксинуклеозиды и 5-(1,7-октадинирил)-2'-дезоксинуклеозиды. Такие структуры могут быть получены по реакции Соногаширы с применением соответствующих иод производных нуклеозидов и терминальных алкинов [20, 21] (Рис. 6).

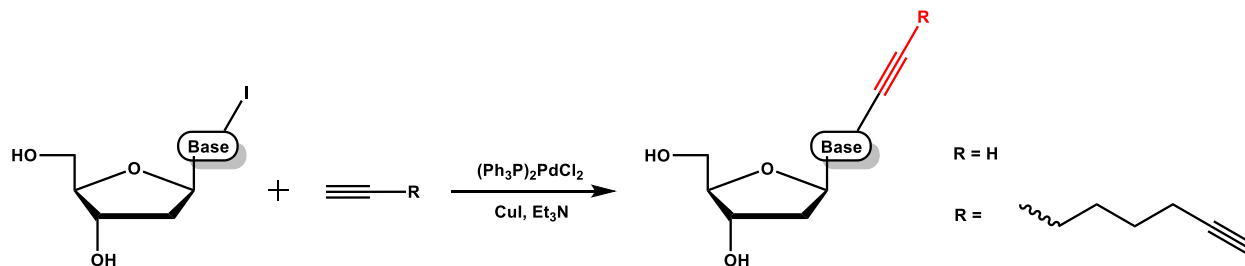


Рис. 6. Схема получения 5-этинил- и 5-(1,7-октадинирил)-2'-дезоксинуклеозидов по реакции Соногаширы; Base – азотистое основание.

Этинильные группы в составе олигонуклеотидов используются в основном для точечной модификации различными азидами, например, для метаболического флуоресцентного [22] или спинового [23] мечения. Множественные модификации этинильной группы затруднительны, поскольку общая эффективность «клик»-реакции в данном случае снижена в связи со стерическими эффектами [24]. Октадинильные группы содержат более гибкий линкер, что обеспечивает возможность проведения глубокой модификации олигонуклеотидов, содержащих большое количество таких групп [25]. Тем не менее, повышенная гидрофобность октадинильного остатка препятствует получению полностью модифицированных НК в связи с их агрегацией в водном растворе, и, кроме того, снижает эффективность ферментативного встраивания соответствующего трифосфата. Другим общим недостатком данных модификаций является дороговизна иод-содержащего прекурсора для их синтеза.

Помимо этинил- и октадинирил-содержащих азотистых оснований, известен ряд других подобных модификаций. Например, в работе [26] в качестве альтернативных структур были предложены производные 5-гидроксиметил-2'-дезоксинуридина с остатками пропаргил-диэтилен гликоля и ундецина. Способ получения таких структур основан на радикальном бромировании тимидина с последующим нуклеофильным замещением атома брома на алкин-содержащие спирты *in situ* (Рис. 7). Гибкость линкера, соединяющего гетероцикл азотистого основания и алкиновую группу, обеспечивает повышенную эффективность «клик»-реакции по сравнению с этинильным и октадинильным производными. Трифосфаты соответствующих нуклеозидов также были применены в ПЦР, где была показана высокая эффективность их встраивания в растущую цепь.

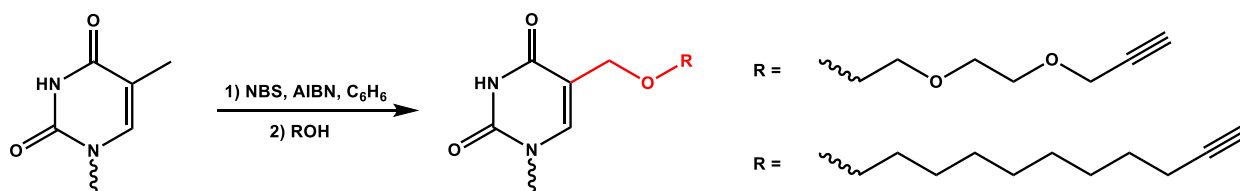


Рис. 7. Схема получения алкин-содержащих производных 5-гидроксиметил-2'-дезоксиридина; NBS – N-бромсукцинимид; AIBN – азобисизобутиронитрил.

Несмотря на большую распространенность медь-катализируемой «клик»-реакции, ее применение как стратегии биоконъюгирования не лишено недостатков. Основным из них можно назвать высокую цитотоксичность комплексов одновалентной меди, связанную с образованием реакционноспособных остатков кислорода (reactive oxygen species, ROS), а также хелатированием аминокислотных остатков [27]. Альтернативой CuAAC-реакции зачастую выступает так называемая SPAAC-реакция (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition), протекающая без использования катализаторов за счет искажения sp-орбиталей используемого алкина, обычно производного циклооктина (Рис. 8а) [28]. Известны примеры структур как азид-модифицированных азотистых оснований с производными циклооктина, так и циклооктин-содержащих азотистых оснований с различными азидами для взаимодействия по SPAAC [28–32]; примеры типичных структурных блоков приведены на Рис. 8б. Модифицированные азотистые основания для проведения SPAAC получают по уже описанным выше методам или их комбинациям. В силу отсутствия токсичности используемых компонентов, SPAAC-подход обычно используют для метаболического внутриклеточного флуоресцентного мечения [28–30]; также известны применения подхода для введения пептидных остатков [31], меток, испускающих в инфракрасном диапазоне [32], и т.д.

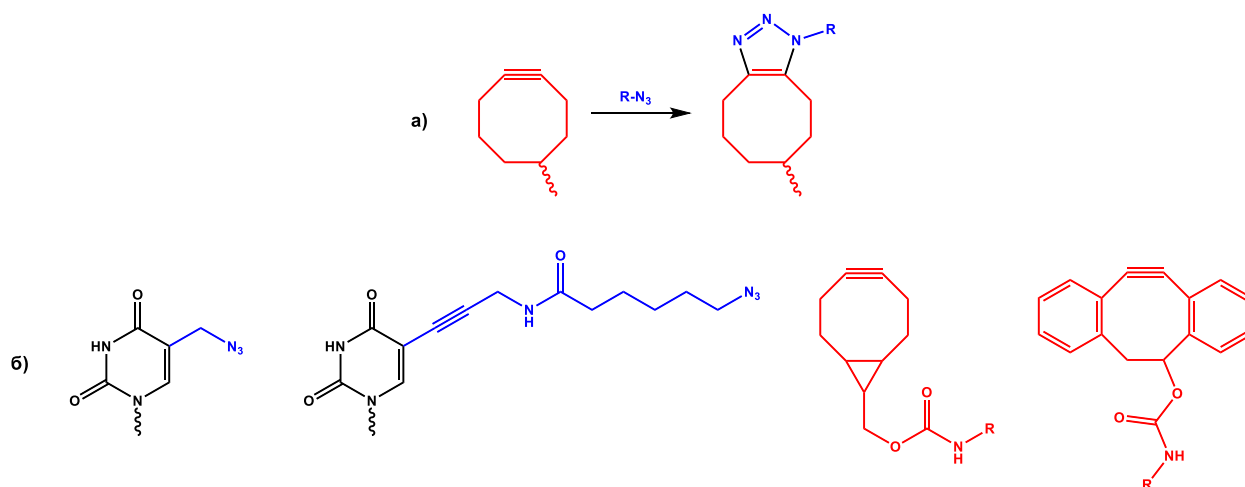


Рис. 8. Общая схема SPAAC-реакции (а) и примеры типичных структурных блоков для проведения SPAAC-реакции (б).

Помимо азид-алкинового циклоприсоединения, существует ряд других «клик»-реакций, также применяемых для модификации азотистых оснований. К ним можно отнести, например, 1,3-диполярное циклоприсоединение нитрилоксидов, заключающееся во взаимодействии алкеновой группы модифицированного азотистого основания и полярного нитрилоксида с получением изоксазолинов (Рис. 9а). В работе [33] остаток алкена был введен в состав азотистого основания путем последовательного проведения реакций Соногаширы с присоединением остатка пропаргилового спирта и введения производного стирола (Рис. 9б). Трифосфаты соответствующих нуклеозидов были эффективно применены в ПЦР, после чего была проведена постсинтетическая модификация различными нитрилоксид-производными ароматических соединений и флуорофоров без участия катализаторов.

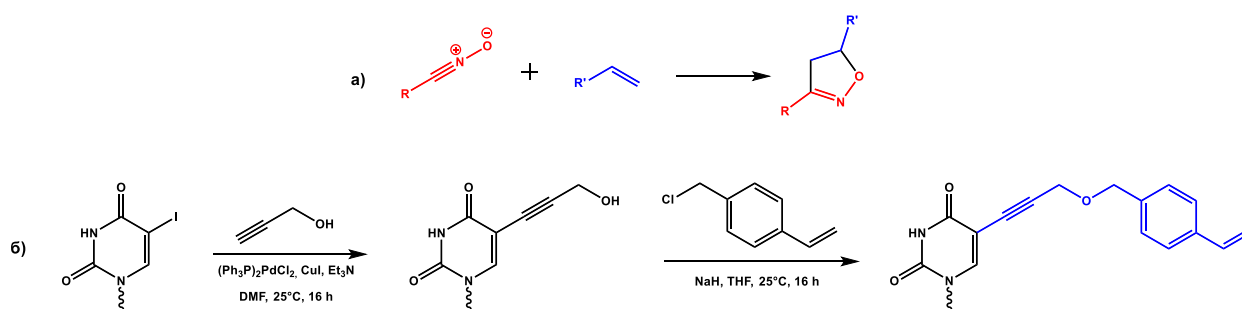


Рис. 9. Общая схема 1,3-диполярного циклоприсоединения нитрилоксидов (а) и схема получения модифицированного азотистого основания, содержащего стирольный остаток (б).

Другим популярным методом введения функциональных групп в состав азотистых оснований в рамках стратегии циклоприсоединения является реакция Дильса-Альдера – взаимодействие донорного диена и акцепторного диенофила, обычно алкена или алкина, с образованием соответствующего шестичленного цикла (Рис. 10а). Известен и так называемый инвертированный вариант реакции Дильса-Альдера (inverse-electron-demand Diels-Alder reaction, iEDDA), в котором диен выступает в качестве акцептора, а диенофил в качестве донора. При модификации азотистых оснований по iEDDA-реакции зачастую используют симметричные тетразины в качестве диеновой компоненты – после протекания реакции образуется бициклический интермедиат, который быстро выбрасывает молекулу азота с образованием финального продукта (Рис. 10б). Примеры структурных блоков, используемых в реакциях Дильса-Альдера и iEDDA для модификации нуклеиновых кислот приведены на Рис. 10в. Данный тип циклоприсоединения, как и азид-алкиновое используют

в основном для метаболического флуоресцентного мечения [34, 35], а также для присоединения пептидных остатков [36].

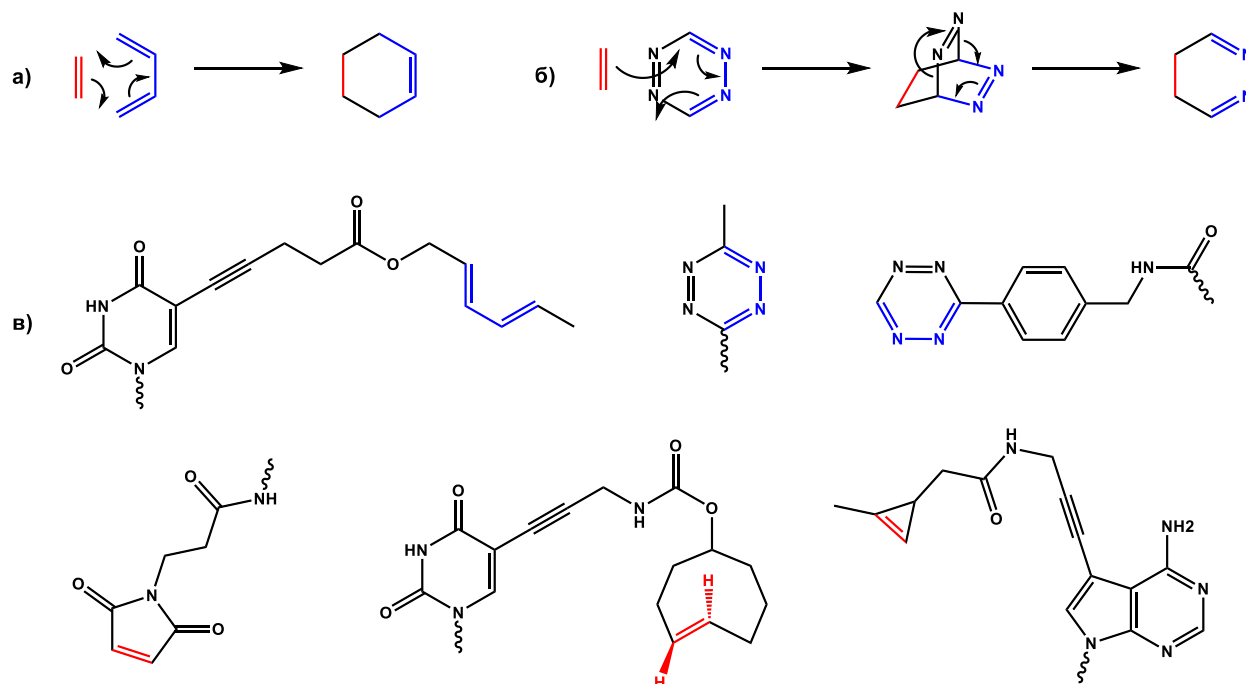


Рис. 10. Механизмы прямой (а) и инвертированной (б) реакции Дильса-Альдера и примеры структур диенов и диенофилов для модификации азотистых оснований (в).

Еще одним подходом к получению циклических структур в составе азотистых оснований можно назвать фотоактивируемое циклоприсоединение. В отличие от других вариантов циклоприсоединения, в которых процесс протекает в присутствии катализаторов или без них за счет выделяющейся энергии при перераспределении связей, для проведения «фотоклик»-реакции необходимо активировать один из компонентов светом ультрафиолетового диапазона. Один из вариантов «фотоклик»-реакции для модификации азотистых оснований включает взаимодействие реакционноспособных нитрилиминов, образующихся при УФ-облучении диарилтетразолов с выделением молекулярного азота, и алкенов с образованием замещенных дигидропиразолов (Рис. 11а) [37]. Известны примеры фототактивируемой модификации как алкен-содержащих азотистых оснований тетразолами, так и тетразольных производных азотистых оснований различными алкенами; примеры азотистых оснований, модифицированных с применением «фотоклик»-реакции приведены на Рис. 11б. Фотоактивируемое циклоприсоединение является строго контролируемым в пространстве и по времени, а также протекает достаточно быстро, в связи с чем используется для метаболического флуоресцентного мечения, в том числе живых организмов [38, 39].

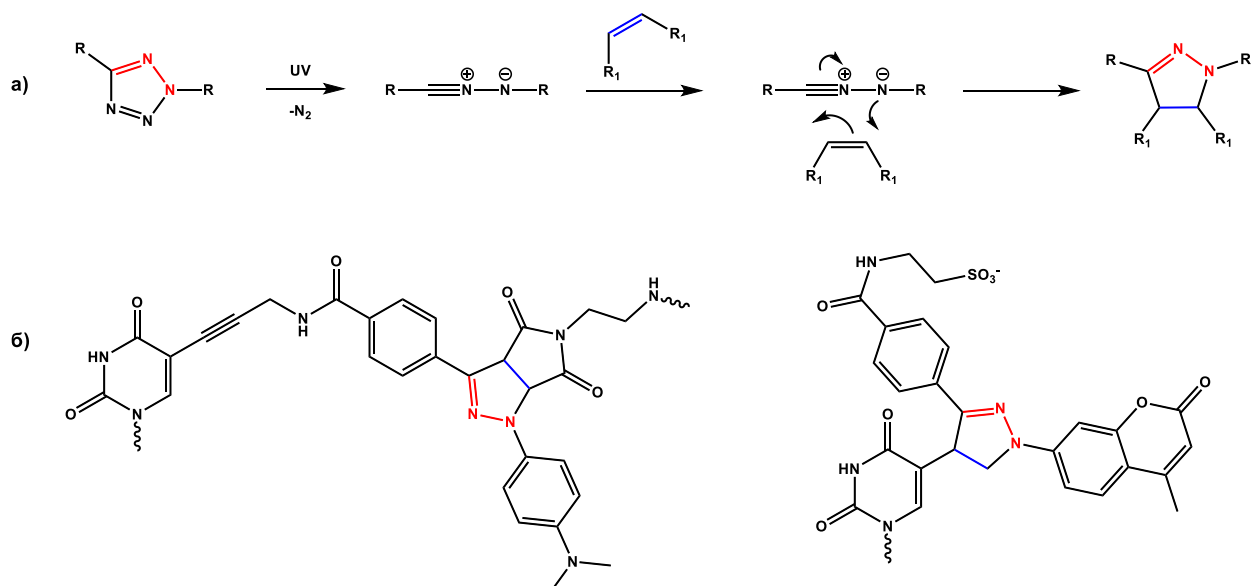


Рис. 11. Механизм фотоактивируемой реакции циклоприсоединения с использованием тетразолов и алкенов (а) и примеры структур модифицированных азотистых оснований, полученных по реакции фотоактивируемого циклоприсоединения (б); R – арил, R₁ – алкил, арил.

2.2.2. Функционализация азотистых оснований с использованием различных реакций конденсации

Помимо многочисленных вариантов реакций циклоприсоединения, существуют и другие подходы для введения модификаций в состав азотистых оснований, основанные как правило на взаимодействии различных реакционноспособных групп. Одной из таких групп является альдегидный остаток в составе 5-формилцитозина и 5-формилурацила – редких природных азотистых оснований, играющих роль эпигенетических меток [40]. Для потенциального детектирования таких меток в геноме были разработаны методы синтеза искусственных формильных производных и варианты их модификации.

Один из популярных и самых ранних способов получения формильных групп представляет собой периодатное окисление 1,2-дигидроксиэтильной группы, которая в свою очередь может быть введена в состав азотистого основания путем винилирования 5-иодпроизводного с использованием соответствующего станната на палладиевом катализаторе (реакция Стилла) и последующего окисления алкенового фрагмента оксидом осмия (Рис. 12а) [41]. Данный метод достаточно эффективен с точки зрения выходов реакций, а также может быть использован при создании соответствующих амидофосфитов для твердофазного синтеза. Более современный метод основан на карбонилировании соответствующих иод-производных угарным газом в присутствии органических станнатов и трифенилфосфина на палладиевом катализаторе (Рис. 12б) [42]. По сравнению с

подходом, основанном на периодатном окислении, карбонилирование протекает с большей эффективностью и в одну стадию, а также совместимо с синтезом РНК.

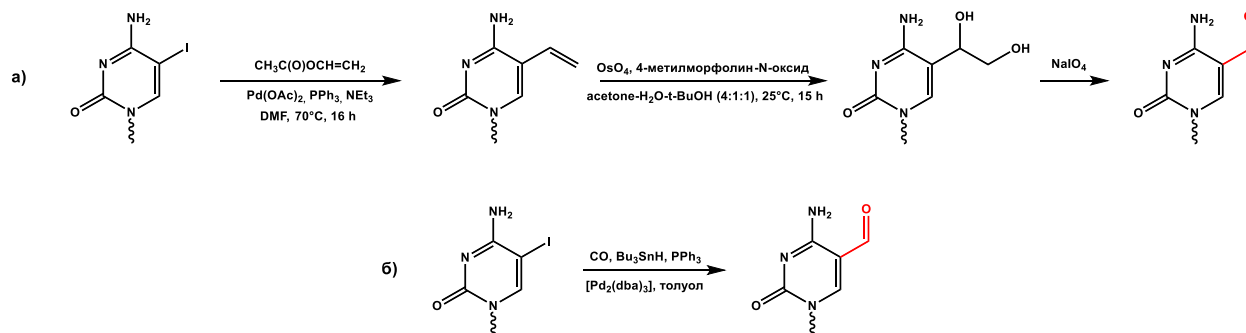


Рис. 12. Схемы получения 5-формилцитозина с применением периодатного окисления (а) и карбонилирования (б).

На данный момент известно множество вариантов модификации формильной группы в составе азотистых оснований различными агентами. Одной из распространенных стратегий является взаимодействие альдегида с гидросиламинами и гидразинами с образованием оксимов и гидразонов соответственно (Рис. 13, путь 1, путь 2). С использованием данных реакций были получены конъюгаты, содержащие остатки флуоресцентных красителей [43, 44], а также биотина [45], адамантана [46], нитробензофуразана [47], и производных нафталимидов [48] для селективного детектирования 5-формилцитозина и 5-формилурацила. Для модификации формильных азотистых оснований используют также восстановительное аминирование – взаимодействие альдегидной группы с аминами с образованием т.н. основания Шиффа (иминогруппы) в присутствии цианборгидрида натрия (Рис. 13, путь 3). Последний добавляют в систему для восстановления основания Шиффа до вторичной аминогруппы с целью стабилизации и предотвращения гидролиза. Восстановительное аминирование обычно применяется при изучении взаимодействий ДНК с белками и пептидами [49, 50]. Формильные группы способны образовывать гетероциклы – известны примеры формирования бензимидазольных и бензотиазольных производных при взаимодействии 5-формилурацила с 1,2-диаминобензолами и 1-тиол-2-аминобензолами (Рис. 13, путь 4). Подобные реакции используют для быстрого и селективного флуоресцентного детектирования окислительных повреждений в ДНК [51, 52]. Некоторые классические реакции органической химии также используют для модификации формильной группы. Так, например, с помощью реакций Виттига (Рис. 13, путь 5) и Кнёвенагеля (Рис. 13, путь 6) в состав азотистых оснований были введены различные флуорофоры [53, 54].

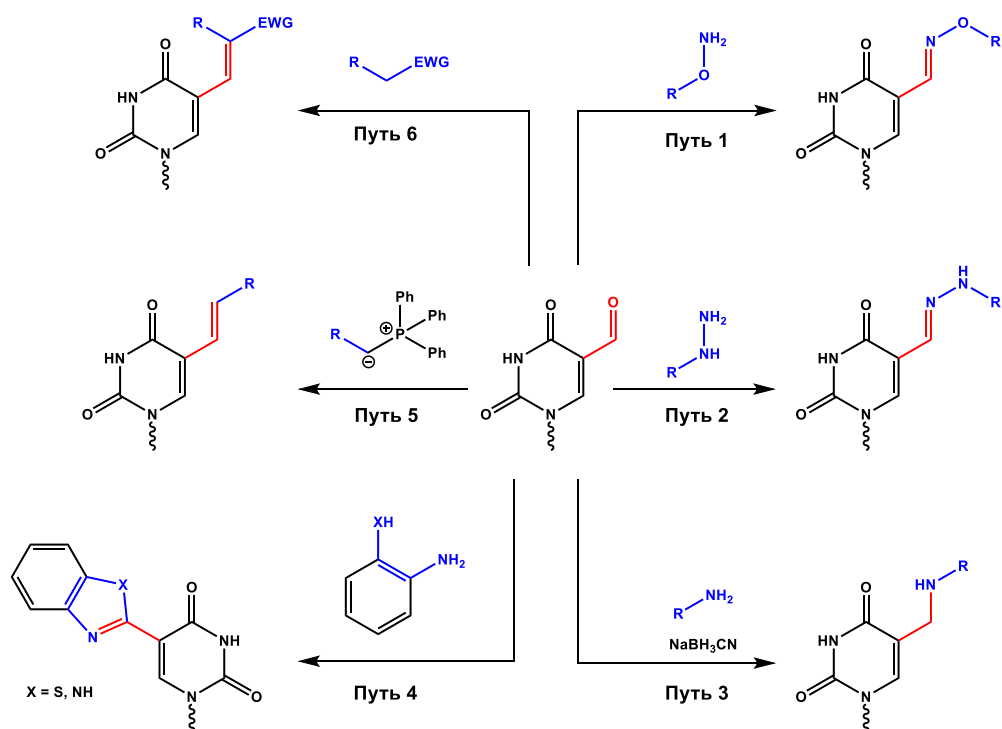


Рис. 13. Пути модификации формильной группы азотистых оснований основанные на реакции с гидросиламинами (путь 1), гидразинами (путь 2), восстановительном аминировании (путь 3), формировании гетероциклов бензимидазола и бензотиазола (путь 4), реакции Виттига (путь 5), реакции Кнёвенагеля (путь 6); EWG – electron withdrawing group, акцепторный заместитель.

Среди других реакций, использующихся для введения модификаций в состав азотистых оснований, можно выделить взаимодействие алкенов с тиолами (Рис. 14а). Зачастую такую реакцию используют для конъюгирования ДНК с белками и пептидами через тиольную группу остатков цистеина. Так, например, в работе [55] для детектирования белка р53 была использована ДНК, содержащая винил-сульфонамидную модификацию (Рис. 14б). Альтернативный способ конъюгирования основан на взаимодействии тиол-модифицированного азотистого основания и малеимидной группы в составе пептида (Рис. 14в). Такой способ был использован, например, для получения ДНК-пептидных конъюгатов с целью изучения структурных особенностей взаимодействия ДНК с киназами [56]. Помимо создания ДНК-белковых конъюгатов, алкен-тиоловая конденсация используется также для введения различных флуорофорных групп в состав олигонуклеотидов (Рис. 14г), например, для подтверждения встраивания трифосфата, содержащего модифицированное азотистое основание, в растущую цепь ДНК в условиях ферментативного синтеза [57].

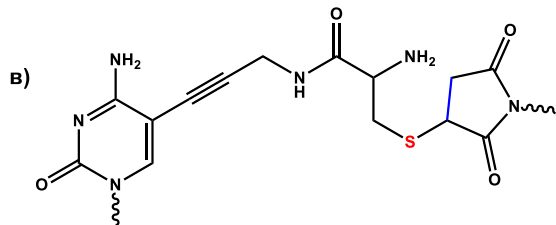


Рис. 14. Общий вид реакции алкен-тиоловой конденсации (а) и различные примеры структур, полученных по данной реакции (б, в, г); R, R₁ – функциональные заместители.

Модификации могут быть введены в состав азотистого основания с применением т.н. лигирования по Штаудингеру – популярной стратегии биоконъюгации, основанной обычно на взаимодействии азид-модифицированного биополимера и органических фосфинов определенной структуры [58]. В ходе лигирования, отрицательно заряженный атом азота в составе промежуточно образующейся аза-илидной группы атакует пространственно сближенную сложноэфирную группу с формированием прочной амидной связи (Рис. 15а). Лигирование по Штаудингеру используют для введения в состав азотистых оснований различных биологически активных остатков, например, биотина (Рис. 15б) [59]. Несмотря на высокую селективность и биоортогональность, данную стратегию сравнительно редко используют для модификации ДНК в связи со сложностью синтеза необходимых азидных и фосфиновых составляющих реакции.

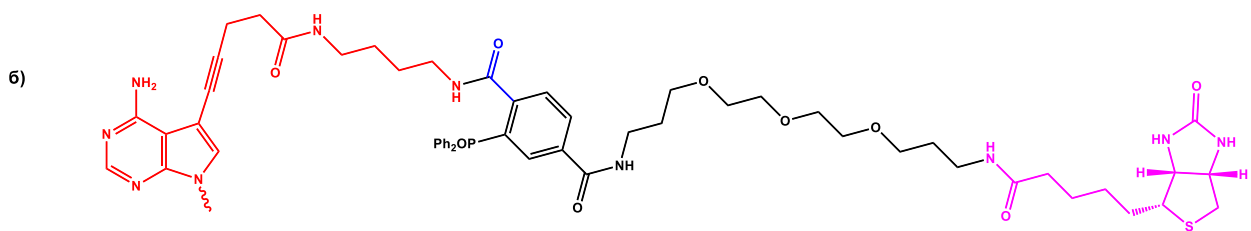


Рис. 15. Механизм лигирования по Штаудингеру (а) и пример полученного по данной реакции конъюгата с остатком биотина (б).

Существует также ряд менее распространенных стратегий для введения модификаций в состав азотистых оснований. К ним можно отнести, например, алкилирование пептидов по остаткам цистеина или гистидина алкилхлоридом в составе азотистого основания (Рис. 16а). Подход показал эффективность при проведении конъюгации ДНК с различными белками, например, транскрипционным фактором р53, в достаточно мягких условиях [60]. Селективный и эффективный метод введения остатков сахаров по азотистым основаниям с целью изучения внутримолекулярных взаимодействий в ДНК, основанный на реакции 1'-тиосахаров и 5-иод-2'-дезоксинуридина (Buchwald-Hartwig-Migita cross-coupling, Рис. 16б), был также успешно реализован [61]. Введение цистеинового остатка в состав азотистого основания и его взаимодействие с тиоэфирными производными пептидов приводит к образованию амидных ДНК-пептидных конъюгатов (Рис. 16в). Подобная стратегия может быть использована для введения пептидной цепи в любое положение олигонуклеотида; при этом линкер, соединяющий ДНК с пептидом, не влияет на гибридизационные свойства конъюгата [62]. Для селективного определения 5-гидроксиметилцитидиновых остатков в составе НК было разработано сульфатное мечение (Рис. 16г). Путем последовательного образования сульфатного конъюгата с остатком биотина, взаимодействия конъюгата со стрептавидином и расщепления сульфатной связи метиламином, возможно количественное определение НК, содержащих 5-гидроксиметилцитидин [63].

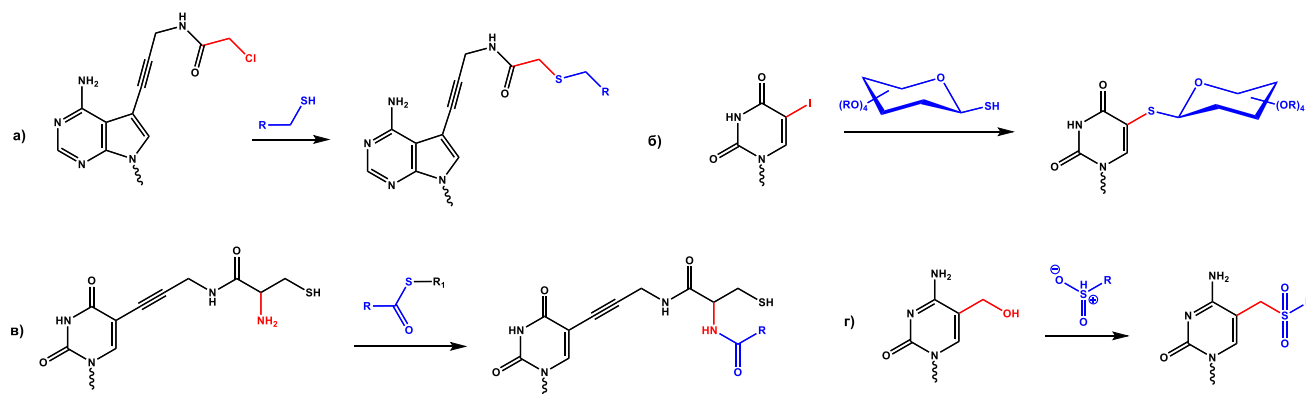


Рис. 16. Стратегии модификации азотистых оснований, основанные на алкилировании тиольных групп (а; R – пептид, белок), введении тиосахаров (Buchwald-Hartwig-Migita cross-coupling, б; R – защитные группы), образовании амидов из тиоэфиров (в; R – пептид, R₁ – алкил), и сульфатном мечении (г; R – заместитель с остатком биотина).

Разнообразие используемых органических реакций, их селективность и возможность последовательной сборки сложных заместителей позволили разработать большое количество уникальных модификаций азотистых оснований олигонуклеотидов.

Модифицированные азотистые основания в составе олигонуклеотидов позволяют проводить широкий спектр исследований – от изменения гибридизационных свойств и функционализации олигонуклеотидов до обнаружения эпигенетических меток в геноме. Ряд амидофосфитных мономеров с модифицированными азотистыми основаниями коммерчески доступен (см, например, каталог производителя GlenResearch, www.glenresearch.com) и используется для получения олигонуклеотидов для различных молекулярно-биологических исследований. Все вышеперечисленные факторы обуславливают достаточную популярность тематики модификаций азотистых оснований и позволяют выделить гетероциклы азотистых оснований в полноценную группу структур для введения модификаций в состав олигонуклеотидов.

2.3. Подходы к введению модификаций в (дезокс)рибозный цикл в составе нуклеозида

Второй группой структур, используемых для введения модификаций в состав олигонуклеотида, являются остатки рибозы/дезоксирибозы. Путем проведения последовательности специфических реакций, в состав углеводного цикла могут быть введены различные функциональные группы. По аналогии с ограничениями множества структур модифицированных азотистых оснований, в данном разделе будут рассмотрены только такие варианты измененных углеводных циклов, которые могут быть получены из природных рибозы/дезоксирибозы, и введены в состав олигонуклеотида методом твердофазного амидофосфитного синтеза с использованием соответствующих мономеров.

2.3.1. Аналоги нуклеозидов, содержащие химические модификации в 2'-положении рибозного цикла

Остаток рибозы в составе нуклеотидного звена также является популярным положением для введения химических модификаций в состав олигонуклеотида. Самой распространенной позицией для введения модификаций в рамках рибозного остова можно назвать 2'-положение – так, например, большинство из одобренных препаратов на основе олигонуклеотидов, содержат некоторые модификации в 2'-положении, например, 2'-фторные и 2'-О-метильные модификации (рис. 17а) [3]. Существует два принципиально отличающихся подхода для введения 2'-модификаций. Первый из них основан на нуклеофильном замещении 2'-гидроксильной группы с ее предварительной активацией (рис. 17б). Таким способом, например, получают 2'-галогенированные производные, в том числе и широко используемую 2'-фторную модификацию [64]. Вторым подходом является в электрофильном замещении атома водорода при 2'-гидроксильной группе на различные

углеводородные заместители с использованием соответствующих галогеналканов (рис. 17в). С применением указанной схемы могут быть получены, например, 2'-О-метильные [65], 2'-О-(2-метокси)этильные [66] и другие модификации. В случае получения 2'-модифицированных аналогов тимидина/уридина возможна и альтернативная синтетическая схема, которая заключается в образовании циклического 2,2'-О-интермедиата с его последующим раскрытием в присутствии нуклеофилов (рис. 17г). Например, 2'-О-(2-метокси)этильная группа может быть введена в состав тимидинового производного подобным способом с использованием соответствующего спирта, при этом конфигурация 2'-гидроксильной группы меняется на противоположную [67]. Стоит отметить, что при получении различных 2'-модифицированных производных, по остальным гидроксильным группам в составе нуклеозида, а также по аминогруппам азотистых оснований, предварительно вводятся ортогональные защитные группы во избежание протекания побочных реакций.

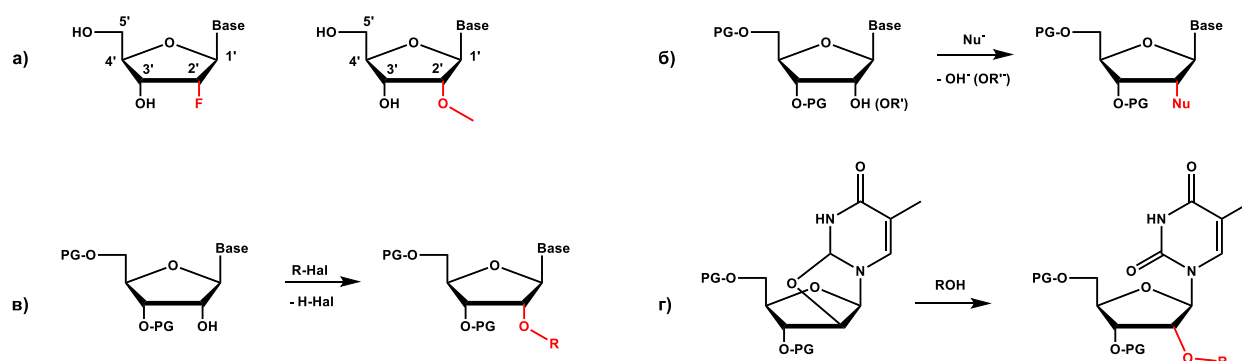


Рис. 17. Структуры нуклеозидов, содержащих фторные и О-метильные модификации по 2'-положению рибозного цикла (а); основные способы введения модификаций по 2'-положению рибозного цикла, основанные на реакции нуклеофильного замещения (б), электрофильного замещения (в), а также на раскрытии цикла тимидинового производного (г). PG – защитная группа, Base – азотистое основание, Nu – нуклеофил, R – функциональный заместитель, OR' – активированная гидроксильная группа, Hal – галоген.

Вследствие специфических биофизических свойств и особенностей строения, 2'-модификации в составе олигонуклеотидов могут улучшать некоторые их свойства, например, эффективность связывания с комплементарной РНК-мишенью, а также ферментативную устойчивость [68]. В частности, повышенное сродство олигонуклеотидов, содержащих 2'-модификации, к РНК-мишеням обусловлено переходом углеводного остова из C_{2'}-эндо в C_{3'}-эндо конформацию, способствующую образованию РНК/РНК дуплексов (рис. 18а). В то же время, возможность некоторых 2'-модификаций, например, аналогов 2'-О-(2-метокси)этильных групп, приобретать положительный заряд и координировать воду обуславливает нуклеазную устойчивость соответствующих модифицированных

олигонуклеотидов [68]. В связи с совокупностью вышеуказанных полезных свойств, научным сообществом было предложено множество вариантов структур 2'-модификаций олигонуклеотидов, такие как 2'-галогены [69], 2'-алкоксиалкилы и их аналоги [68, 70, 71] и др. Некоторые примеры структур нуклеозидов, содержащих 2'-модификации, приведены на рис. 18б.

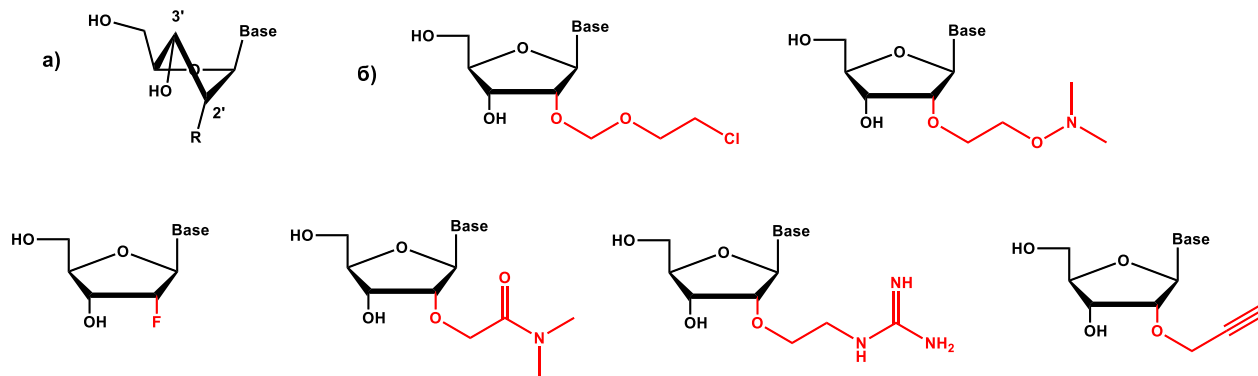


Рис. 18. Изображение C3'-эндо конформации нуклеозида, содержащего 2'-модификацию (а), и некоторые примеры структур 2'-модифицированных нуклеозидов; Base – азотистое основание.

Среди всех модификаций рибозного остова олигонуклеотидов, 2'-модификации являются самыми распространенными, и уже традиционно применяются при создании терапевтических НК препаратов [3]. Это связано как с простотой получения 2'-модифицированных нуклеозидов и соответствующих мономеров для амидофосфитного синтеза, так и с проявляемыми свойствами НК-конструкций, содержащих 2'-модификации, в том числе прочностью связывания с мишенью и ферментативной устойчивостью.

2.3.2. Аналоги нуклеозидов, содержащие замкнутый или разомкнутый рибозный цикл

Другим подходом к модификации углеводного остова в составе нуклеозида является изменение самой структуры рибозного цикла. В частности, ряд методов для подобного изменения структуры основан на раскрытии рибозного цикла, или на образовании дополнительных связей внутри цикла. Одним из самых распространенных вариантов структуры с разомкнутым рибозным остовом являются так называемые «разомкнутые нуклеиновые кислоты» (unlocked nucleic acid, UNA), в которых отсутствует связь между C2' и C3' атомами. Такие структуры получают путем обработки нуклеозида периодатом натрия с последующим восстановлением альдегидных групп до спиртовых в присутствии боргидрида натрия (рис. 19а) [72]. Свободную 2'-гидроксильную группу в составе UNA-звена возможно дополнительно модифицировать по такому же подходу, как и в случае

a) 

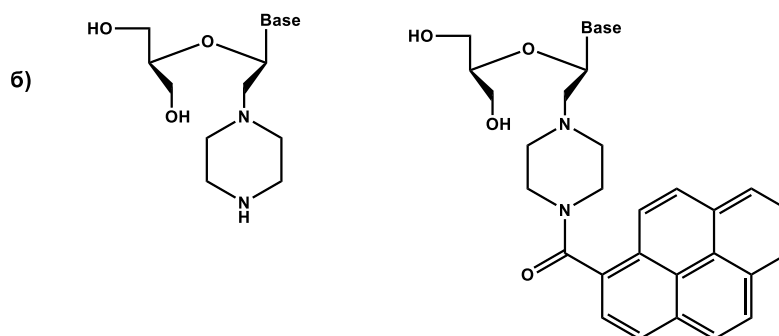


Рис. 19. Схема синтеза нуклеозида «разомкнутых нуклеиновых кислот» (UNA-нуклеозида) (а) и примеры пиперазин-модифицированных UNA-аналогов (б); Base – азотистое основание.

В связи с отсутствием связи в рибозном цикле, UNA обладают гораздо большей конформационной подвижностью по сравнению с немодифицированными аналогами, а также проявляют значительный дестабилизирующий эффект в процессе дуплексообразования. В связи с данным свойством, UNA-звенья в основном вводят в состав олигонуклеотидов, способных образовывать сложные самоорганизованные структуры типа i-мотивов или G-квадруплексов с высокой температурой плавления для тонкой регуляции их термодинамических свойств [72]. Данное обстоятельство позволяет использовать UNA-модифицированные олигонуклеотиды в качестве аптамеров со сложной вторичной структурой [73]. Также было продемонстрировано, что олигонуклеотиды, содержащие UNA-звенья, могут быть использованы как в качестве классических антисмысловых олигонуклеотидов, рекрутирующих РНКазу H, так и в качестве siРНК [72].

Классическим примером структуры рибозного остова, содержащего дополнительные связи, являются «замкнутые нуклеиновые кислоты» (locked nucleic acid, LNA), в которых рибозный цикл содержит дополнительную метиленовую группу, соединяющую гидроксильную группу при C2'-атоме, и C4'-положение. Синтез таких производных протекает в большое число стадий, ключевой из которых является замыкание малого цикла с образованием итогового LNA-звена. Изначально получают 4'-гидроксиметильные нуклеозидные производные путем мягкого окисления 5'-

гидроксильной группы до альдегидной триацетатом иодоксибензойной кислоты (периодинан Десса-Мертина, DMP) и присоединения остатка формальдегида с последующим восстановлением по Канницаро; далее 4'-гидроксиметильная группа активируется тозилхлоридом после чего в присутствии гидроксида натрия происходит нуклеофильное замещение тозильной группы на 2'-ОН группу с замыканием цикла и образованием LNA-звена (рис. 20а, [76, 77]). Помимо стандартных LNA-звеньев, содержащих одну оксиметиленовую соединительную группу, существует множество других вариантов подобных структур, так называемых «мостиковых нуклеиновых кислот» (bridged nucleic acid, BNA). BNA отличаются между собой соединительными элементами C2'- и C4'-атомов; в зависимости от природы малых циклов, разные BNA получают по специфическим методикам, часто отличных от схемы получения LNA-звеньев. Некоторые примеры из множества вариантов структур «мостиковых нуклеиновых кислот» представлены на Рис. 20б [78–81].

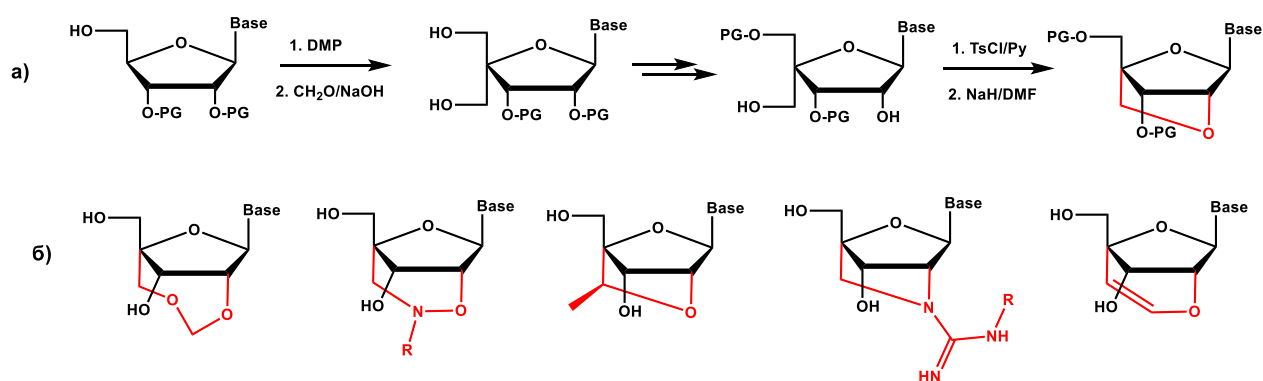


Рис. 20. Ключевая стадия синтеза нуклеозидов «замкнутых нуклеиновых кислот» (LNA-звена) (а) и варианты структур нуклеозидов «мостиковых нуклеиновых кислот» (BNA-звенья) (б); Base – азотистое основание, PG – защитная группы, DMP – периодинан Десса-Мертина (триацетат иодоксибензойной кислоты), R – алкильный заместитель.

В отличие от UNA-звеньев, различные варианты LNA-нуклеотидов обладают пониженной конформационной подвижностью по сравнению с нативными рибозными звеньями, что обуславливает повышенную термодинамическую стабильность соответствующих дуплексов. В ряде работ было показано, что различные LNA- и BNA-содержащие олигонуклеотиды образуют прочные комплексы как с ДНК, так и с РНК [76, 78, 79]. Кроме того, подобные олигонуклеотиды за счет своих физико-химических свойств обладают высокой избирательностью по отношению к единичным мисматчам [78], вследствие чего их можно использовать для селективного поиска подобных несоответствий. Известны также примеры применения LNA-/BNA-содержащих

олигонуклеотидов в качестве антисенс-олигонуклеотидов или siРНК с повышенной эффективностью биологического действия [82, 83].

Несмотря на трудоемкий многостадийный синтез, различные варианты нуклеотидов, содержащие замкнутый или разомкнутый рибозный цикл, в составе олигонуклеотидов нашли свое применение в различных областях.

2.3.3. Аналоги нуклеозидов на основе альтернативных циклических структур

В качестве отдельной категории аналогов нуклеозидов стоит выделить структуры, основанные на альтернативных циклах, строение которого отличается от стандартного рибозного кольца. К наиболее популярным и исследуемым вариантам таких структур можно отнести нуклеозиды морфолиновых олигонуклеотидов (РМО, [84]) (рис. 21а). Морфолиновый цикл может быть получен по синтетической схеме, схожей с синтезом UNA-звена – рибозный цикл с защищенной 5'-гидроксильной группой обрабатывают периодатом натрия, и затем восстанавливают альдегидные группы цианборгидридом натрия в присутствии водного раствора аммиака (рис. 21б) [84]. Стоит отметить, что первоначально разработанные методы синтеза РМО не позволяли вводить такие звенья в рамках стандартного твердофазного амидофосфитного синтеза, и для получения РМО требовалось специализированное оборудование [84, 85]. Однако в последнее время были разработаны методы, позволяющие эффективно получать РМО, в том числе и химерные РМО/ДНК структуры, связанными фосфодиэфирными или тиофосфатными группами, с применением стандартных протоколов амидофосфитного синтеза [86]. Стоит отметить, что в отличие от синтеза большинства олигонуклеотидов с измененным рибозным циклом, адаптированный синтез морфолиновых олигонуклеотидов проходит в направлении 5'→3', для чего используются мономеры с 5'-амидофосфитной группой с цианоэтильной защитой и с 3'-тритильной группой (Рис. 21в) [86].

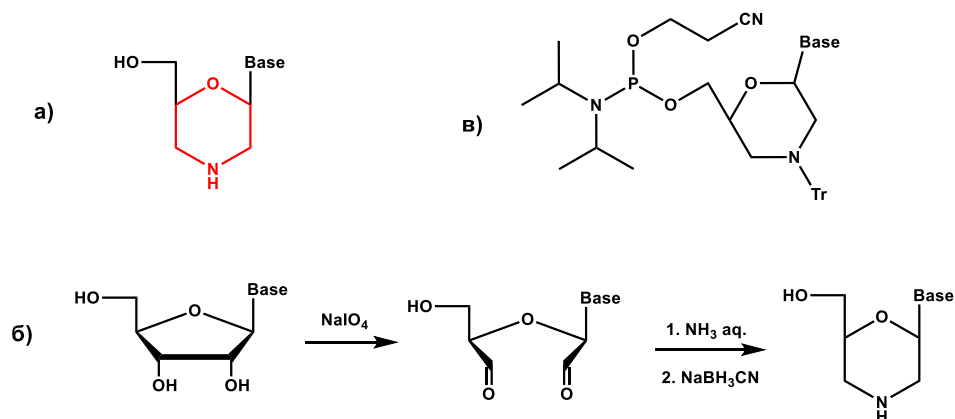


Рис. 21. Структура морфолинового нуклеозида (а), схема синтеза морфолинового цикла из производного рибозы (б) и структура амидофосфитного мономера морфолинового нуклеозида (в); Base – азотистое основание, Tr – тритильная защитная группа.

Классические РМО-олигомеры, содержащие мономеры, связанные диамидофосфатным линкером, широко применяются для создания терапевтических препаратов на основе олигонуклеотидов [3]. Это обусловлено рядом их свойств, таких как низкая токсичность для организма вследствие электронейтрального характера остова и слабым связыванием с клеточными белками, а также высокая нуклеазная устойчивость в связи с значительным изменением структуры сахара-фосфатного остова [87]. В то же время для РМО характерна пониженная эффективность связывания с комплементарной последовательностью в связи с большей длиной звена олигонуклеотида и определенной конформацией морфолинового цикла.

К другому типу альтернативных остовов можно отнести группу природных циклических пентафураноз с конформацией гидроксильных групп, отличной от таковой в рибозном кольце. Одним из самых изученных представителей этого типа является арабинозный остов нуклеозида. В арабинозном цикле в составе нуклеозида 2'-гидроксильная группа обладает S-конформацией, в то время как в рибозном цикле эта группа принимает противоположную R-конформацию (Рис. 22а). Помимо возможности создания амидофосфитных мономеров на основе арабинозы и, соответственно, совместимости с твердофазным методом синтеза [88], арабинонуклеиновые кислоты (ANA) обладают рядом полезных свойств. Так, например, дуплекс ANA/RNA расщепляется ферментом РНКазы H, что позволяет использовать ANA при создании ген-направленных терапевтических олигонуклеотидов [89]. К наиболее популярным модифицированным аналогам ANA можно отнести 2'-F производное (FANA, Рис. 22б). В отличие от стандартной ANA, фторированный аналог обладает гораздо большим сродством к РНК, а

также устойчивостью к воздействию нуклеаз [90, 91]. Получение арабинозных нуклеозидов и их производных основано на обращении конфигурации 2'-ОН группы в составе рибозного цикла – активированная гидроксильная группа в составе нуклеозида подвергается нуклеофильному замещению по механизму S_N2 (Рис. 22в) [89].

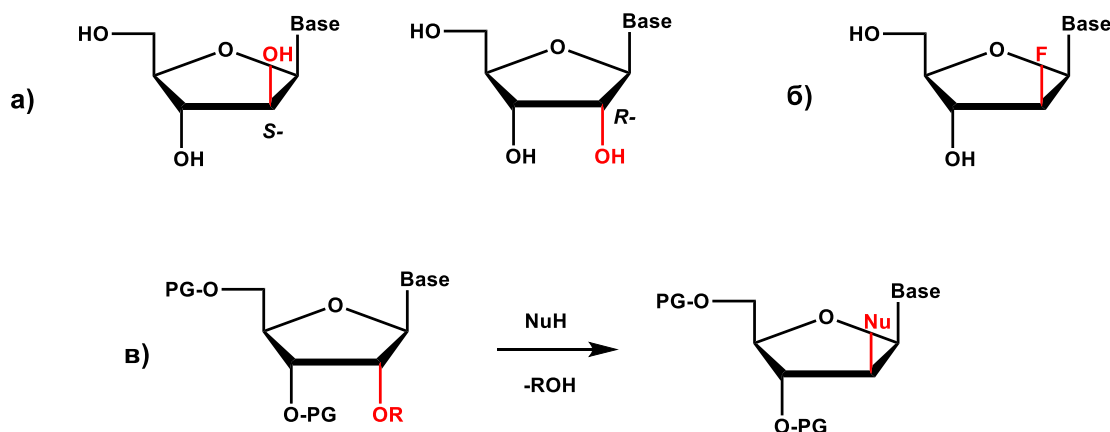


Рис. 22. Конфигурация 2'-гидроксильной группы в составе арабинозного цикла (а); строение 2'-F производного арабинозного нуклеозида (б); общая схема синтеза арабинозных нуклеозидов и их производных (в). Base – азотистое основание, OR – активированная гидроксильная группа, PG – защитная группа, Nu – нуклеофил.

Небольшую, но достаточно исследованную группу аналогов нуклеозидов с измененным циклом представляют собой структуры, в рибозном кольце которых гетероатом в 4'-положении заменен на альтернативный. К таким структурам можно отнести, например, 4'-тионуклеозиды и 4'-селенонуклеозиды (Рис. 23а) [92, 93]. Получение 4'-модифицированных нуклеозидов, в частности 4'-S аналогов, представляет собой многостадийный синтез с рибозой в качестве исходного реагента [94]. Ключевая стадия синтеза заключается в формировании углеводного цикла в ходе нуклеофильного замещения активированной 4'-ОН группы атомом серы в первом положении (Рис. 23б). Олигомеры на основе 4'-тионуклеотидов – 4'-тиоДНК и 4'-тиоРНК – обладают рядом уникальных свойств. Так, например, оба типа 4'-модифицированных олигомеров обладают повышенным сродством к РНК и образуют А-форму двойной спирали [95], что обусловлено большей гидрофобностью атома серы по сравнению с атомом кислорода и, соответственно, уменьшением числа водородных связей 4'-тиоДНК и 4'-тиоРНК с растворителем. Данное свойство, в совокупности с устойчивостью к нуклеазам, а также прочностью образуемых дуплексов с РНК, позволяют использовать 4'-тиоДНК и 4'-тиоРНК в качестве компонентов для создания siРНК и аптамеров [96, 97].

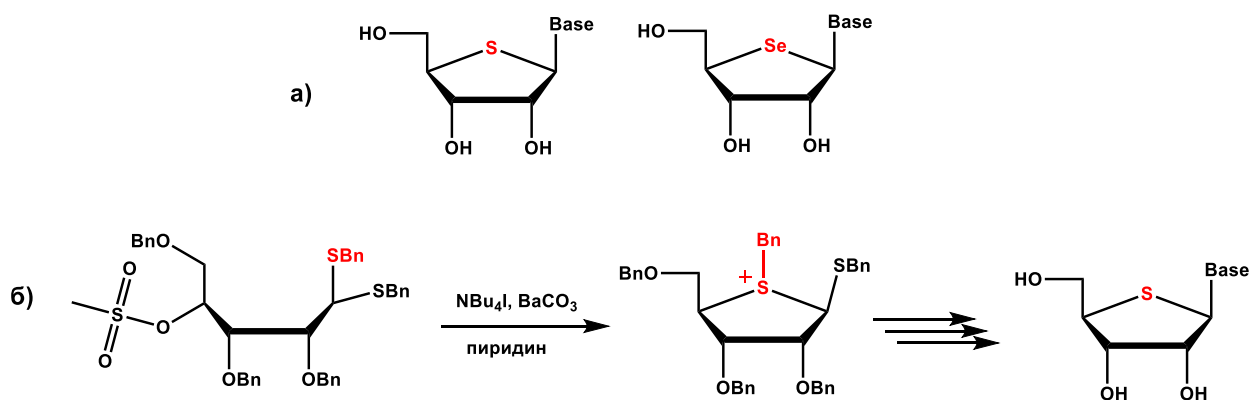


Рис. 23. Структура 4'-тионуклеозида и 4'-селенонуклеозида (а); ключевая стадия получения 4'-тионуклеозида – формирование серосодержащего цикла. Base – азотистое основание, Bn – бензил.

Другой группой 4'-модифицированных нуклеозидов являются структуры, в которых атом кислорода в циклической части молекулы сохранен, в то время как атом водорода в 4'-положении замещен на другие группы. В качестве примеров типичных представителей данной группы нуклеозидов можно привести 4'-O-метильные (OMe), 4'-O-(2-метокси)этильные (OMOE) и 4'-фторные (F) аналоги (Рис. 24а). В отличие от многостадийного синтеза 4'-S и 4'-Se нуклеозидов, альтернативные 4'-модифицированные структуры по одной из схем можно получить всего в две стадии исходя из рибозного цикла. Ключевые этапы синтеза заключаются в изначальном элиминировании 5'-ОН группы с получением алкенового интермедиата, и в дальнейшем одномоментном окислении двойной связи *m*-хлорнадбензойной кислотой (mCPBA) или галогенированными сукцинимидом, например, иод-сукцинимидом (NIS), и нуклеофильном присоединении необходимого заместителя к 4'-атому углерода (Рис. 24б) [98, 99]. Полученные по приведенной схеме 4'-OMe, 4'-OMOE и 4'-F модифицированные нуклеозиды могут конвертированы в амидофосфитные мономеры, полностью совместимые с твердофазным методом синтеза [99]. Наличие дополнительного заместителя в 4'-положении рибозного цикла обеспечивает переход 4'-модифицированных звеньев в составе соответствующей ДНК в С3'-эндо конформацию, что способствует формированию прочных дуплексов с комплементарной РНК [99, 100]. На основе 4'-OMe-ДНК были сконструированы siРНК, обладающие значительной устойчивостью к нуклеазному расщеплению, хотя и не проявляющие значительно большей активности в РНК-интерференции по сравнению с немодифицированной системой [101].

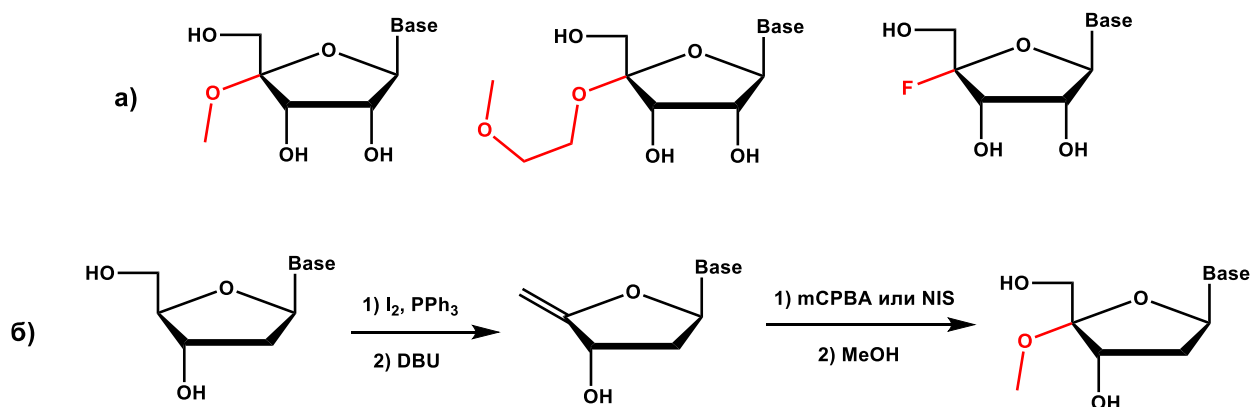


Рис. 24. Структуры 4'-OMe, 4'-OMOE, 4'-F рибонуклеозидов (а); основные этапы синтеза 4'-модифицированных нуклеозидов на примере 4'-OMe-2'-дезоксинуклеозида (б). Base – азотистое основание, mCPBA – *m*-хлорнадбензойная кислота; NIS – N-иодсукцинимид.

Еще одной группой нуклеозидов, содержащих дополнительные группы в составе рибозного цикла, являются 5'-модифицированные аналоги. Среди представителей этой группы наиболее известными и изученными являются 5'-Me-нуклеозиды (Рис. 25а). Получение данных структур основано на первоначальном окислении 5'-ОН группы до альдегида с использованием триацетата иодоксибензойной кислоты (DMP) с дальнейшим присоединением метильной группы по реакции Гриньяра с использованием метилмагний бромида (Рис. 25б) [102, 103]. При введении алкильной группы по 5'-атому углерода в нуклеозиде появляется дополнительный оптический центр с образованием (*R*)- и (*S*)-изомеров (Рис. 25а). Исследования конформационной подвижности нуклеотидных звеньев как в 5'-Me-ДНК, так и в 5'-Me-РНК показали, что оба оптических изомера преимущественно принимают C2'-эндо конформацию, за счет чего использование подобных модификаций уменьшает эффективность дуплексообразования соответствующих НК с РНК [102, 103]. По аналогии с оптическими изомерами тиофосфатных олигонуклеотидов, (*R*)- и (*S*)-изомеры 5'-Me-ДНК проявляют разные свойства. Так, (*R*)-изомер обеспечивает защиту от действия 5'-экзонуклеаз, но при этом значительно дестабилизирует дуплекс, в то время как (*S*)-изомер обеспечивает защиту от 3'-экзонуклеаз [102, 103]. В связи со значительным влиянием модификаций в 5'-положении рибозного цикла на образование комплементарных комплексов, 5'-Me-ДНК не нашли широкого применения в качестве антисмысловых олигонуклеотидов, несмотря на показанную совместимость с системой РНК-интерференции [103].

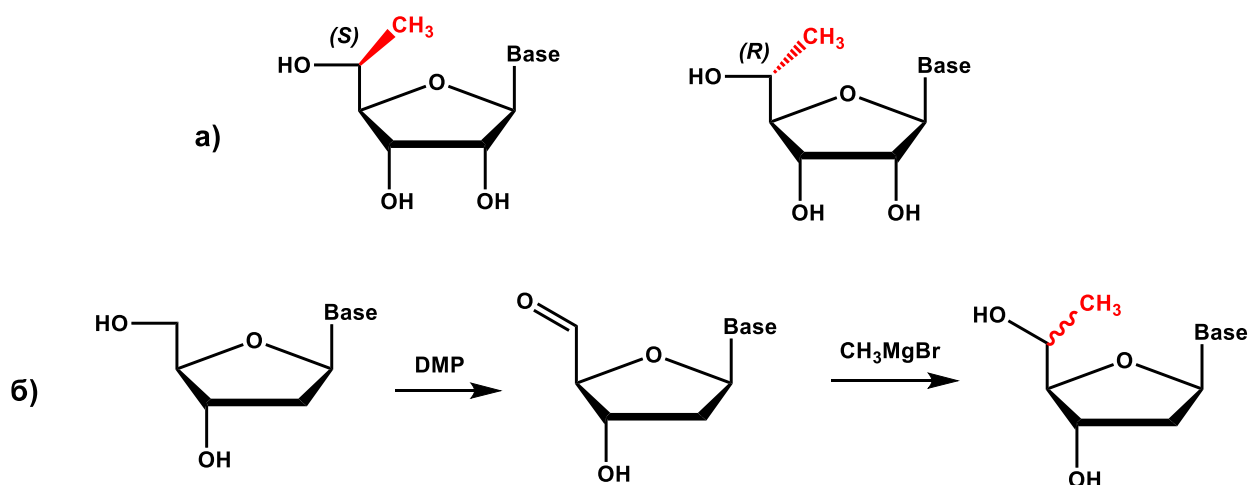


Рис. 25. Структуры (R)- и (S)-изомеров 5'-Ме рибонуклеозидов (а); основные этапы синтеза 5'-модифицированных нуклеозидов на примере 5'-Ме-2'-дезоксинуклеозида (б). Base – азотистое основание, DMP – периодинан Десса-Мерттина (триацетат иодоксибензойной кислоты).

Специфические и достаточно селективные методики модификации углеводов позволили научному сообществу создать большое количество вариантов модифицированных остатков (дезоксир)ибозы. Олигонуклеотиды, построенные на альтернативном сахаро-фосфатном остове с измененной углеводной частью, зачастую обладают совокупностью полезных свойств, что связано в первую очередь с изменением конформации углеводного звена. Возможность комбинации различных остатков сахаров в составе олигонуклеотида позволяет тонко настраивать желаемые свойства получаемой молекулы. Ряд олигонуклеотидов, содержащие модифицированные углеводные звенья, например, 2'-МОЕ нуклеотиды, уже рутинно применяются в качестве терапевтических агентов. Помимо рассмотренных структур, получаемых из (дезоксир)ибозы, существует также огромное множество циклических и ациклических остатков, часто имитирующих природные моносахариды, используемых для создания альтернативных сахаро-фосфатных остовов олигонуклеотидов с уникальными свойствами, например, пептидные нуклеиновые кислоты (PNA). Перечисленные факторы в совокупности с продолжающимися разработками новых типов олигонуклеотидов с альтернативным углеводным остовом указывают на актуальность данной области химии нуклеиновых кислот.

2.4. Методы получения фосфат-модифицированных олигонуклеотидов

Третьим структурным элементом олигонуклеотида, в составе которого могут присутствовать модификации, является фосфатная группа. Основным подходом к получению модифицированных фосфатных групп в составе олигонуклеотида можно назвать подход, основанный на альтернативном окислении в ходе твердофазного

амидофосфитного синтеза (см. Рис. 1). В рамках указанного подхода существует ряд методов, основанных на использовании различных окислительных агентов, и, в некоторых случаях, специальных мономеров с определенными защитными группами, совместимых со стандартным твердофазным синтезом, для получения соответствующих производных. Далее будут рассмотрены подобные методы получения модифицированных фосфатных групп в составе олигонуклеотида. Кроме того, в связи с нестандартностью используемых методов и неочевидностью протекания реакций с точки зрения амидофосфитного олигонуклеотидного синтеза, дополнительно будут рассмотрены механизмы различных вариантов альтернативного окисления. Для фосфат-модифицированных олигонуклеотидов, полученных с применением альтернативных мономеров при стандартном окислении в рамках амидофосфитного синтеза, будут рассмотрены схемы получения мономеров. При описании тех или иных НК-производных также будут перечислены их основные свойства и области применения.

2.4.1. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-S

2.4.1.1. Получение тиофосфатов

Одним из самых распространенных типов фосфат-модифицированных олигонуклеотидов, получаемых путем альтернативного окисления, являются тиофосфаты (рис. 26а). В структуре тиофосфатов в составе олигонуклеотида один из несвязывающих атомов кислорода заменен на атом серы, на котором сконцентрирован отрицательный заряд группы в связи с ее высокой поляризуемостью [104]. В качестве альтернативных окислителей для получения тиофосфатов используют т. н. сульфорирующие агенты. На ранних этапах развития методов синтеза тиофосфатных олигонуклеотидов, в качестве сульфорирующих агентов применялись такие соединения, как, например, фенилацетилдисульфид (PADS) и 3H-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксид (Beaucage reagent, реагент Бокажа) [105–108] (рис. 26б, 26в). Подобные реагенты позволяли с высокой эффективностью получать тиофосфатные группы в составе олигонуклеотидов различной длины. В частности, была показана возможность синтеза полностью модифицированного 20-звенного олигонуклеотида с выходом целевого продукта более 95% при использовании реагента Бокажа в качестве сульфорирующего агента [106]. В настоящее время, в качестве основных сульфорирующих агентов используются различные 3H-1,2,4-дитиазол-3-тионы, в частности N,N-dimethyl-N'-(3-thioxo-3H-1,2,4-dithiazol-5-yl)methanimidamide (DDTT, в каталогах производителей – «Sulfurizing Reagent II», Рис. 26г) – по сравнению с ранее используемым реагентом Бокажа, данные соединения более эффективны в реакции

окисления, более стабильны при хранении в растворе, а также позволяют получать модифицированные РНК и их аналоги [109].

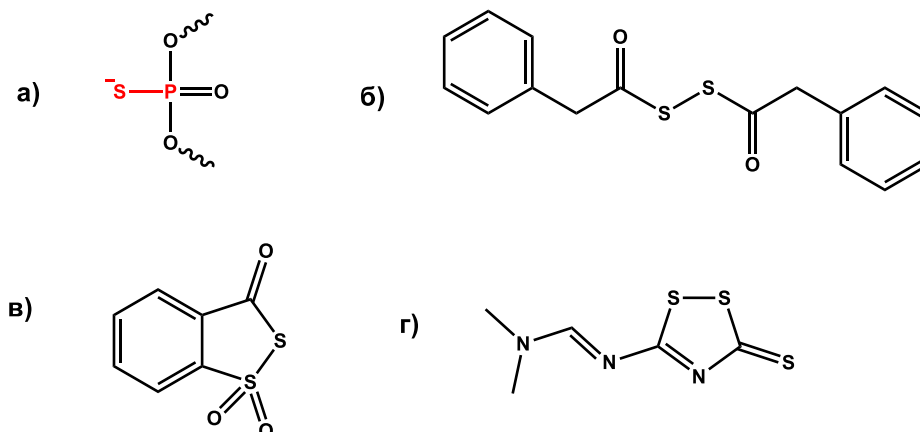


Рис. 26. Строение тиофосфатной группы в составе олигонуклеотида (а) и разных сульфирующих агентов для ее получения – фенилацетилдисульфида (б), 3Н-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксида (реагент Бокажа, в), DDTT (Sulfurizing reagent II, г).

Механизм реакции окисления фосфит-триэфира до тиофосфатной группы схож для всех типов сульфирующих агентов. Первоначально происходит нуклеофильная атака неподеленной пары фосфора на атом серы в составе сульфирующего агента с образованием положительно заряженного интермедиата (P^+-S) (Рис. 27а). Далее для разных сульфирующих агентов происходят специфические перегруппировки, приводящие к итоговой структуре тиофосфата ($P=S$) [105, 110–112]. Полный механизм сульфирования фосфит-триэфира на примере использования сульфирующего агента DDTT приведен на Рис. 27б [111]. Образование интермедиата в данном случае происходит при атаке неподеленной пары фосфора по атому серы во втором положении цикла. В результате последующей перегруппировки от интермедиата отщепляется соответствующий тиокарбамоил изотиоцианат, и образуется итоговый тиофосфат.

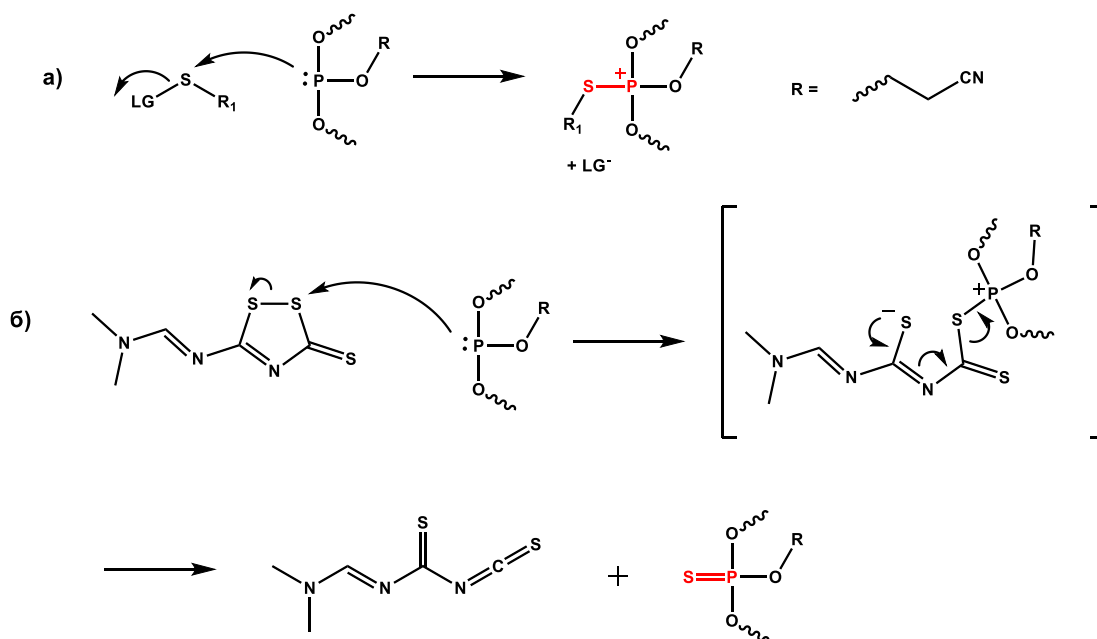


Рис. 27. Общая схема сульфирования фосфит-триэфира олигонуклеотида с образованием положительно заряженного интермедиата ($\text{P}^+\text{-S}$) (а) и полный механизм сульфирования фосфит-триэфира олигонуклеотида реагентом DDTT (Sulfurizing reagent II) с образованием тиофосфатной группы (б). R_1 – заместитель, LG – уходящая группа.

Тиофосфатная группа в составе олигонуклеотидов является хиральным центром и представлена в виде двух стереоизомеров – *Sr* и *Rp* изомеров (Рис. 28а). Известно, что олигонуклеотиды, преимущественно содержащие разные стереоизомеры тиофосфатной группы обладают отличающимися свойствами. Так, например, олигонуклеотиды, содержащие преимущественно *Rp*-изомеры тиофосфатных звеньев усиливают эффективность связывания с РНК мишенью, а также с большей эффективностью распознаются РНКазой Н, однако сильнее подвержены ферментативному расщеплению. В то же время, олигонуклеотиды с *Sr*-изомерами тиофосфатов обеспечивают значительную нуклеазоустойчивость [113, 114]. Современные методы синтеза позволяют контролируемо получать тиофосфатные олигонуклеотиды с определенной конфигурацией каждой тиофосфатной группы, обладающие уникальными свойствами. Для этого, например, используют специализированные оптически чистые амидофосфитные мономеры (Рис. 28б) [115]. Стоит также отметить, что тиофосфатные олигонуклеотиды обладают улучшенным проникновением в клетку и биораспределением по сравнению с немодифицированными аналогами в связи с повышенным взаимодействием с белками клеточной мембраны и плазмы крови соответственно [116, 117]. В то же время, связывание тиофосфатных олигонуклеотидов с белками носит в целом неспецифический характер, что обуславливает их повышенную токсичность [118].

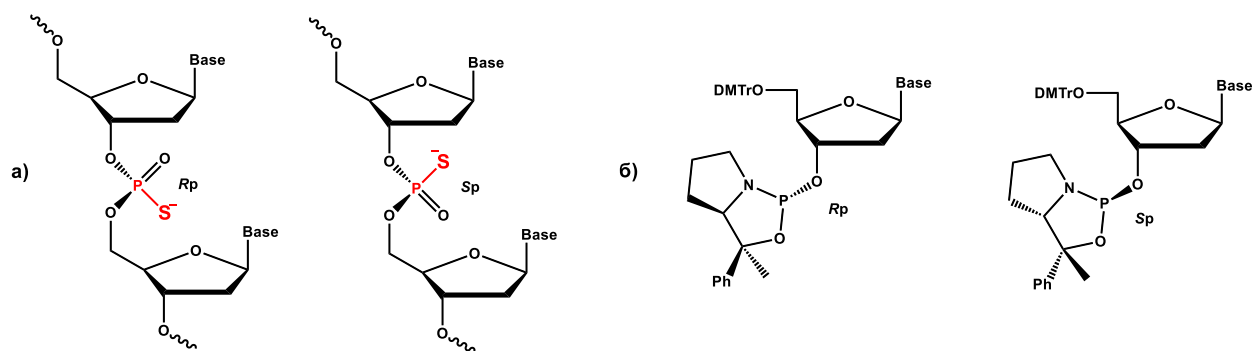


Рис. 28. Структуры стереоизомеров тиофосфатной группы в составе олигонуклеотида (а) и строение стереоспецифичных мономеров для получения оптически чистых тиофосфатных олигонуклеотидов (б).

Base – азотистое основание; DMTг – 4,4'-диметокситритильная группа.

Вследствие простоты и эффективности синтеза тиофосфатных олигонуклеотидов, в том числе и оптически чистых, в совокупности с рядом их полезных свойств, данный класс фосфат-модифицированных НК-производных в настоящее время является самым изученным и применяется на практике в различных областях. В частности, бо́льшая часть олигонуклеотидных препаратов, одобренных FDA, содержит в своем составе тиофосфатные модификации [2, 6].

2.4.1.2. Получение дитиофосфатов

К другому типу фосфатных модификаций, содержащих связь P-S, можно отнести дитиофосфаты, в которых оба несвязывающих атома кислорода заменены на атомы серы (Рис. 29а). При получении данных производных используются не только сульфирующие агенты (см. выше) на стадии окисления, но и специфические мономеры в виде тиамидофосфитов на стадии конденсации. Получение тиамидофосфитных мономеров протекает в две ключевые стадии, включающие взаимодействие нуклеозида с бис-пирролидинохлорфосфином и замещение одного из пирролидиновых остатков на (S-бензоил)этилендитиол (Рис. 29б) [119]. Упрощенная схема получения дитиофосфатного звена олигонуклеотида приведена на Рис. 29в. В ходе конденсации тиамидофосфитного мономера с предыдущим звеном олигонуклеотида, образуется тиофосфит-триэфир, который в ходе дальнейшего сульфирования стандартными агентами превращается в дитиофосфат, содержащий защитную β-тиобензоильную группу. При деблокировании олигонуклеотида в щелочной среде, защитная группа с дитиофосфата удаляется с получением итогового дитиофосфатного звена [120].

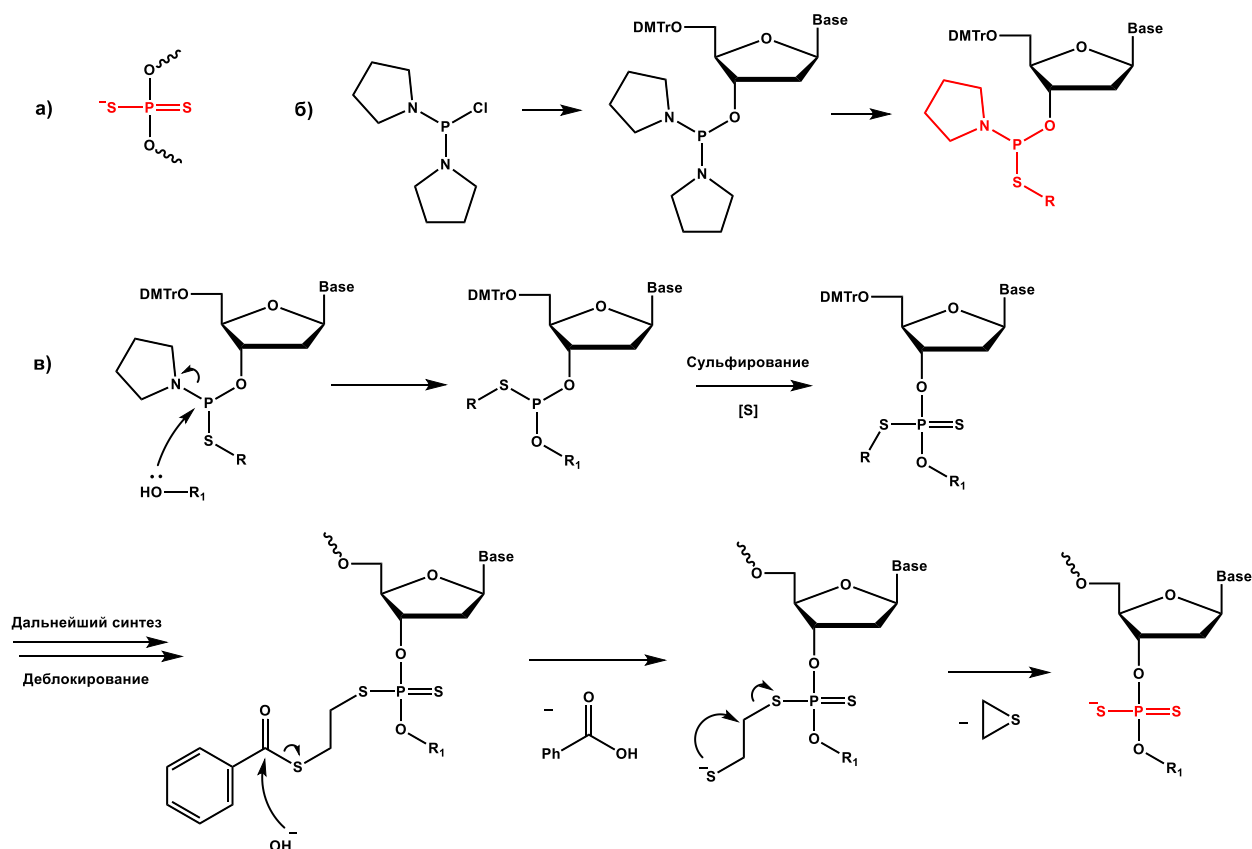


Рис. 29. Структура дитиофосфатной группы (а) и схемы получения тиамидофосфитного мономера (б) и дитиофосфатной группы в составе олигонуклеотида (в). Base – азотистое основание; R – β -тиобензоильная группа; R_1OH – олигонуклеотидная цепь со свободным 5'-концом; DMTr – 4,4'-диметокситритильная группа.

Замена второго немостикового атома кислорода на атом серы в еще большей степени повышает поляризуемость модифицированной фосфатной группы, что может в значительной мере усиливать взаимодействие соответствующих олигонуклеотидов с белками [121]. В связи с этим, дитиофосфатные олигонуклеотиды нашли применение в качестве аптамеров к различным белковым мишеням, таким как, например, тромбин и обратная транскриптаза ВИЧ [120, 121]. Также было продемонстрировано, что введение всего одного дитиофосфатного нуклеотида в состав siRNA в значительной степени увеличивает эффективность образования комплекса RISC и РНК-интерференции [122]. При использовании дитиофосфатных олигонуклеотидов в качестве антисмысловых конструкций, эффективность рекрутирования РНКазы H и расщепления РНК мишени падает с увеличением количества дитиофосфатных модификаций, что обусловлено, вероятно, сильным связыванием олигонуклеотидов с РНКазой H [123].

Дитиофосфатные олигонуклеотиды применяются не так широко, как тиофосфатные аналоги, что в том числе связано с необходимостью использования специфических мономеров для их синтеза. Однако основополагающее свойство таких производных –

высокая эффективность связывания с белками даже по сравнению с тиофосфатными олигонуклеотидами – позволило найти им применение в качестве аптамеров к различным мишеням.

2.4.1.3. Получение тиолофосфатов

Помимо (ди)тиофосфатных олигонуклеотидов, содержащих атомы серы вместо несвязывающих атомов кислорода, описаны также тиолофосфатные производные, в составе которых атом серы связывает фосфатную группу и нуклеозид в НК-цепи. В зависимости от расположения атома серы в фосфатной группе, выделяют 5'- и 3'-тиолофосфаты (Рис. 30а) [124, 125]. В отличие от тиофосфатных производных, синтезируемых с применением метода альтернативного окисления, для получения тиолофосфатов используют специальные мономеры. При этом для получения 5'-тиолофосфатной группы используют тритилированные 5'-тиоамидофосфитные нуклеозиды, а для введения 3'-тиолофосфатной группы – 3'-тиоамидофосфитные мономеры (Рис. 30б) [126–128]. Синтез 5'-тиоамидофосфитного мономера протекает в несколько стадий, ключевой из которых является активация 5'-гидроксильной группы путем тозилирования и ее дальнейшее замещение на трифенилметилмеркаптан (Рис. 30в) [127]. Получение 3'-тиоамидофосфитных мономеров основано на проведении последовательности таких принципиальных реакций, как введение защищенного тиола по 3'-положению нуклеозида с обращенной конформацией, деблокирование защитной группы тиола и присоединение к тиольной группе фосфитилирующей компоненты. Пример такой схемы с конкретными соединениями представлен на Рис. 30г [128].

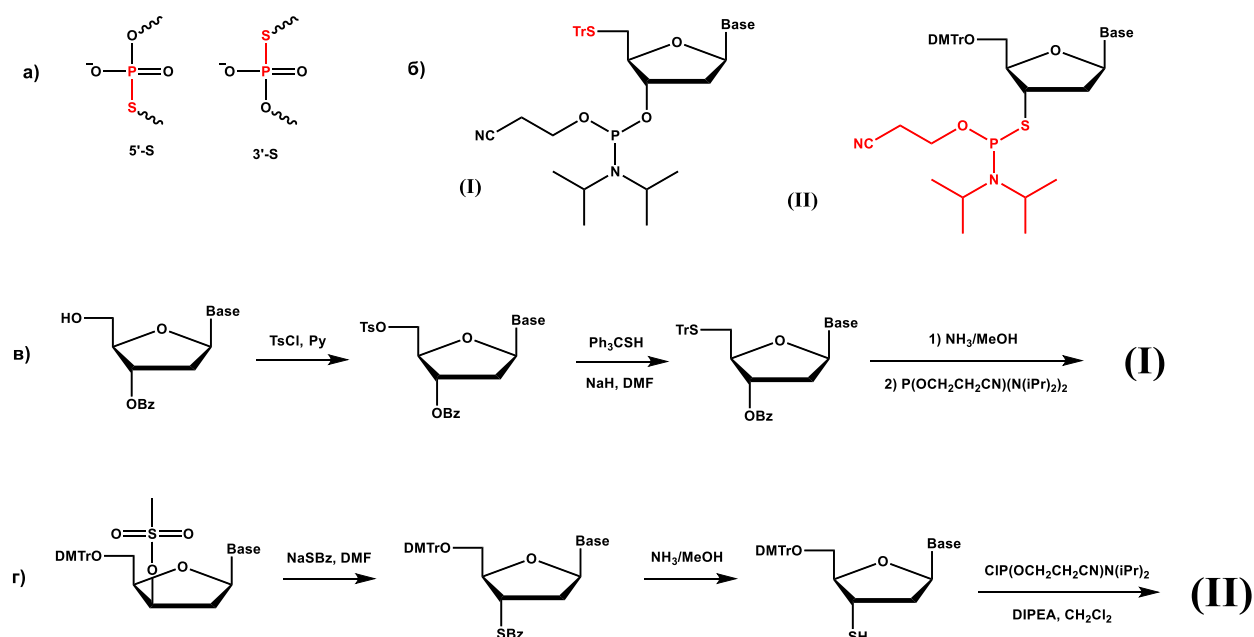


Рис. 30. Структура 5'- и 3'-тиолофосфатной группы (а), тритилированного 5'-тиоамидофосфитного и 3'-тиоамидофосфитного мономеров (б) и схемы получения представленных мономеров соответственно (в, г). Base – азотистое основание; Tr – тритильная группа; DMTr – 4,4'-диметокситритильная группа; Bz – бензоильная группа; Ts – пара-толуолсульфонилхлоридная группа; DIPEA – N,N-диизопропилэтиламин.

5'- и 3'-тиолофосфаты нашли применение в качестве удобных инструментов для детального изучения различных молекулярных механизмов, включающих реакции нуклеазного расщепления [128]. Так, например, при включении 5'-тиолофосфатной группы в субстрат для ДНК-топоизомеразы I после реакции расщепления образуется 5'-тионуклеозид на конце одной из цепей, который препятствует дальнейшему сшиванию цепей [129]. Введение 3'-тиолофосфатной группы в субстрат для рестриктазы *EcoRV* по месту расщепления практически полностью блокирует реакцию рестрикции [130]. Использование подобных «суицидальных» субстратов позволяеткратно замедлить скорость ферментативных реакций и более детально исследовать их механизмы. Стоит также отметить, что с использованием субстратов с 3'-тиолофосфатной группой на основании теории жесткости-мягкости кислот и оснований (ЖМКО) была определена ключевая роль взаимодействия различных ионов металлов с уходящей 3'-группой нуклеозида в реакции нуклеазного расщепления [131].

Тиолофосфатные олигонуклеотиды могут быть использованы и в качестве антисмысловых конструкций [125], однако низкая стабильность *in vivo* сильно ограничивает их применение в этой области.

2.4.2. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-B

Достаточно изученным с точки зрения синтеза и разнообразия практических приложений можно назвать класс боранофосфатных олигонуклеотидов (Рис. 31а). В связи с электрондефицитным характером бораногруппы, в соответствующих производных она обладает отрицательным зарядом [132]. По аналогии с тиофосфатными производными, для получения боранофосфатной группы в составе олигонуклеотида на стадии окисления фосфит-триэфирной группы используют различные боронирующие агенты. В качестве боронирующих агентов выступают комплексы гидрида бора с различными стабилизирующими молекулами нуклеофильной природы, такими как, например, N,N-диизопропилэтиламин (DIPEA), диметилсульфид (Me₂S), тетрагидрофуран (THF) [132–134]. Реакция боронирования заключается в нуклеофильной атаке неподеленной парой атома фосфора комплекса гидрида бора. В связи с электроннодефицитным характером бораногруппы, в результате реакции образуется устойчивый интермедиат четырехкоординационного фосфора. После удаления защитной группы в ходе финального деблокирования олигонуклеотида в основной среде, интермедиат переходит в пентавалентное состояние, приобретая отрицательный заряд (Рис. 31б) [135].

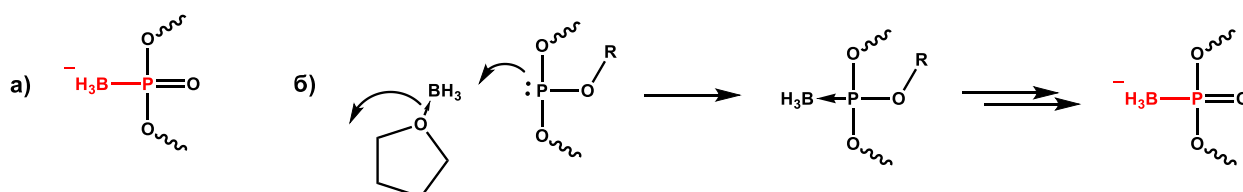


Рис. 31. Строение боранофосфатной группы (а) и механизм боронирования фосфит-триэфира олигонуклеотида на примере использования комплекса BH₃·THF (б). R – β-цианоэтильная группа.

Довольно продолжительное время основным препятствием на пути к полностью автоматизированному высокоэффективному синтезу боранофосфатных олигонуклеотидов являлась несовместимость бораногруппы со стандартными реагентами и защитными группами твердофазного амидофосфитного синтеза. В частности, известно, что борано фосфотриэфирный интермедиат способен деблокировать защитные амидные группы в составе азотистых оснований, а также данный интермедиат деградирует при взаимодействии с диметокситритильным катионом [136]. В связи с этим, стандартный амидофосфитный метод был несколько модернизирован, и в настоящее время для автоматического синтеза боранофосфатных олигонуклеотидов используется адаптированная схема со следующими ключевыми изменениями. В качестве защитных группировок экзоциклических групп азотистых оснований используют ди-*трет*-

бутилизобутилсилильные группы, стабильные в ходе синтеза и удаляемые в присутствии ионов фтора (Рис. 32а). При проведении деблокирования диметокситритильной группы к раствору кислоты добавляют триметилфосфит боран в качестве молекулы-«захватчика» диметокситритильных катионов (trityl scavenger, Рис. 32б) [135]. Применение такой адаптированной схемы позволяет получать боранофосфатные олигонуклеотиды с высокой эффективностью без образования побочных продуктов.

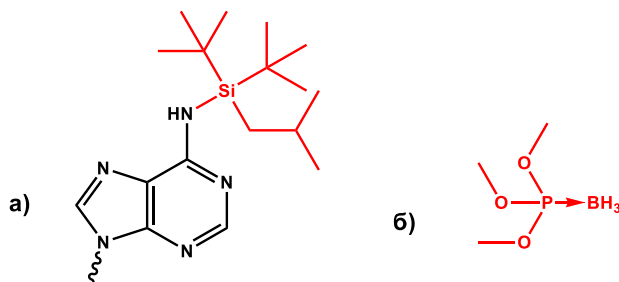


Рис. 32. Строение ключевых элементов при проведении автоматического синтеза боранофосфатных олигонуклеотидов – ди-трет-бутилизобутилсилильной защитной группы в составе одного из азотистых оснований (а) и триметилфосфит борана, «захватчика» тритильных катионов (trityl scavenger) (б).

Интересной особенностью боранофосфатных групп олигонуклеотидов является возможность их дальнейшей функционализации в рамках автоматического синтеза. Так, например, был предложен метод введения в состав боранофосфатной группы остатка пиридина [137]. Для получения подобных производных, боранофосфат обрабатывают смесью пиридина и N-иодсукцинимидом, содержащей активный пиридиновый-йодид, который атакуется бораногруппой, в результате чего образуется цвиттер-ионная пиридиновый боранофосфатная модификация (Рис. 33). Для пиридиновых боранофосфатных олигонуклеотидов была показана высокая эффективность проникновения через клеточные мембраны, а также восстановления ионов металлов.

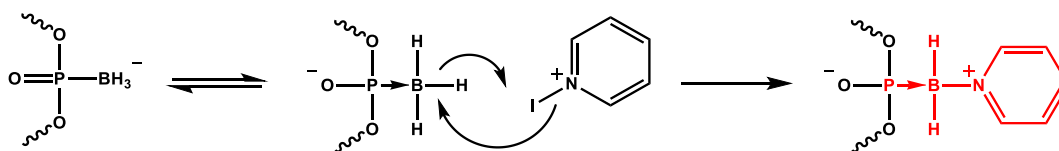


Рис. 33. Схема получения цвиттер-ионной пиридиновый-боранофосфатной модификации.

По аналогии с тиофосфатной модификацией, боранофосфатная группа в составе олигонуклеотида несет отрицательный заряд, а также является химически стабильной. Данные особенности позволяют применять боранофосфатные олигонуклеотиды в качестве, например, малых интерферирующих РНК. Было показано, что боранофосфатные siРНК обладают повышенной активностью в РНК интерференции, превышая таковую для

тиофосфатных аналогов [138]. Кроме того, боранофосфатные siРНК проявляют эффект подавления генов даже в виде одной антисмысловой цепи с эффективностью на уровне немодифицированной двуцепочечной siРНК. Боранофосфатные олигонуклеотиды стабильны к нуклеазному расщеплению, а также эффективно проникают через клеточные мембраны, что повышает их общую эффективность при использовании в качестве siРНК конструкций [139, 140]. При определенном паттерне боранофосфатных модификаций, соответствующие производные можно использовать, как антисмысловые олигонуклеотиды с высокой эффективностью рекрутирующие РНКазу H [139]. За последнее время также были разработаны методы получения оптически чистых боранофосфатных олигонуклеотидов, при этом в ходе их получения используются такие же стереоспецифические мономеры, как и в случае тиофосфатных производных (см. Рис. 28). Контролирование оптической чистоты позволяет тонкого настраивать некоторые свойства получаемых боранофосфатных олигонуклеотидов, например, термическую стабильность их дуплексов с ДНК/РНК [141, 142].

Таким образом можно заключить, что боранофосфатные олигонуклеотиды являются перспективными производными с точки зрения применения в качестве терапевтических агентов в связи с совокупностью проявляемых полезных свойств. Однако, их широкое использование ограничено малой масштабируемостью синтеза, что связано с необходимостью значительной модернизации синтетических протоколов для их получения.

2.4.3. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь Р-С

2.4.3.1. Получение метилфосфонатов

С-фосфонаты олигонуклеотидов, наряду с тиофосфатами и боранофосфатами, представляют собой один из первых открытых классов фосфат-модифицированных олигонуклеотидов. Самым изученным представителем С-фосфонатов олигонуклеотидов можно назвать метилфосфонаты (Рис. 34а) [143]. При получении метилфосфонатов в настоящее время используются специальные амидофосфиновые мономеры, которые в ходе присоединения к растущей олигонуклеотидной цепи и дальнейшего стандартного окисления молекулярным иодом превращаются в метилфосфонатные звенья (Рис. 34б) [144–146]. Получение амидофосфиновых мономеров содержит две ключевые стадии, а именно присоединение дихлорметилфосфина к 3'-ОН группе нуклеозида и введение остатка диизопропиламина по фосфитной компоненте (Рис. 34в) [145, 146]. Метилфосфонатные звенья устойчивы в ходе амидофосфитного синтеза, однако при стандартном отщеплении метилфосфонатных олигонуклеотидов от твердофазного носителя концентрированным раствором аммиака может происходить их деградация. В

связи с этим, для отщепления метилфосфонатных олигонуклеотидов используют растворы этилендиамина в присутствии небольшого количества аммиака для деблокирования защитных групп азотистых оснований [147, 148].

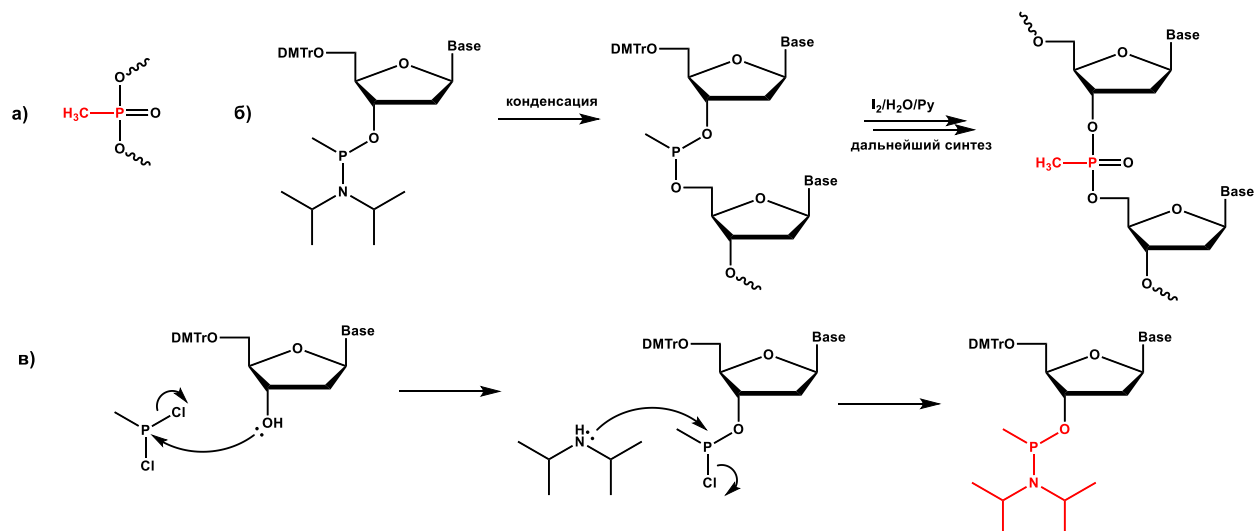


Рис. 34. Структура метилфосфонатного звена (а) и схемы получения метилфосфонатного звена в составе олигонуклеотида (б) и амидофосфинового мономера (в). Base – азотистое основание; DMTr – 4,4'-диметокситритильная группа.

Метилфосфонатные группы в составе олигонуклеотидов не заряжены, а также представлены в виде двух диастереомеров [149], что обуславливает ряд их специфических свойств. Так, например, в сравнении с нативными олигонуклеотидами, метилфосфонатные аналоги образуют более стабильные дуплексы в В-форме с ДНК, однако дуплексы с РНК в А-форме менее стабильны. Кроме того, *Rp*-изомер метилфосфонатной группы в большинстве случаев повышает или не меняет температуру плавления дуплекса, в то время как *Sr*-изомер в значительной мере снижает ее [144, 149, 150]. Наблюдаемые эффекты связаны с совокупностью факторов, а именно с переходом метилфосфонатной группой в наиболее энергетически выгодную конформацию в дуплексе и нивелированием электростатического отталкивания цепей дуплекса за счет нейтрализации заряда фосфатной группы. Вследствие нейтрального заряда метилфосфонатных групп, соответствующие олигонуклеотиды не распознаются нуклеазами и гидролитически стабильны в организме, однако в то же время не способны активировать РНКазу Н [143, 146].

Несмотря на ряд полезных свойств, повышающих терапевтический потенциал, а также оптимизированные протоколы синтеза, метилфосфонаты не нашли широкого применения, что связано со значительной вариабельностью свойств *Rp*- и *Sr*-

диастереомеров и затруднительностью получения оптически чистых олигонуклеотидов, а также малой растворимостью в воде за счет отсутствия заряда.

2.4.3.2. Получение этинилфосфонатов

Еще одним известным типом С-фосфонатов являются алкинилфосфонаты, содержащие группы с тройной связью углерод-углерод при атоме фосфора, в частности этинильную группу (Рис. 35а) [151]. Для введения таких групп в состав олигонуклеотидов необходимо использовать специальные мономеры, синтез которых протекает в несколько стадий со следующими принципиальными этапами. К исходному соединению в виде *бис*(N,N-диизопропиламино)хлорфосфина присоединяют этинильную группу по реакции Гриньяра с использованием этинил магний бромид, или при взаимодействии с ацетилинидом натрия [152]. Далее полученный алкин-содержащий амидофосфин присоединяют к 5'-защищенному нуклеозиду с получением финальной структуры мономера (Рис. 35б) [151]. Синтез этинилфосфонатных олигонуклеотидов происходит по стандартным протоколам за исключением стадии деблокирования с полимерного носителя, которую, по аналогии с метилфосфонатами, проводят в растворе этилендиамина в толуоле во избежание деградации фосфонатной группы.

Этинилфосфонатные олигонуклеотиды как индивидуальные соединения практически не используются для различных исследований, но выступают в качестве предшественника для получения других производных. Так, этинилфосфонатная группа олигонуклеотида может быть использована для присоединения различных органических азидов по реакции азид-алкинового циклоприсоединения с получением 1,2,3-триазилилфосфонатов (Рис. 35в). По такой схеме были получены триазилилфосфонаты, содержащие, например, остатки триметилсилана, триметилэтиламмония, различных аминокислот и пептидов, несущих положительный заряд [151, 153].

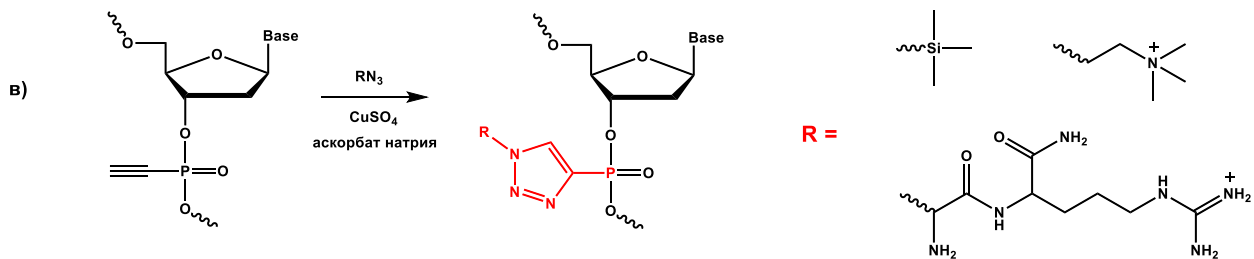


Рис. 35. Структура этинилфосфонатного звена (а), схема получения этиниламидофосфинового мономера (б) и схема получения 1,2,3-триазиолфосфонатного звена олигонуклеотида (в). Base – азотистое основание; DMTr – 4,4'-диметокситритильная группа.

Наличие 1,2,3-триазолилфосфонатной группы в составе олигонуклеотида несколько снижает его аффинность к комплементарной РНК и температуру плавления дуплекса, что связано, вероятно, с объемом такой группы и жесткостью триазолового остова. В то же время введение 1,2,3-триазолилфосфонатных групп в район 5'- и 3'-концов олигонуклеотида значительно усиливает его нуклеазоустойчивость, и, кроме того, повышает эффективность проникновения в клетки в отсутствие агентов доставки, что особенно выражено для 1,2,3-триазолилфосфонатов, несущих остатки аргинин- и лизин-богатых пептидов. Также было показано, что 1,2,3-триазолилфосфонаты с положительно заряженными пептидными остатками могут выступать в качестве анти-микроРНК [151, 153].

Удобство синтеза, возможность широкой функционализации и ряд полезных свойств обуславливают высокий терапевтический потенциал 1,2,3-триазолилфосфонатов, что уже было продемонстрировано на примере ингибирования микроРНК. Несмотря на перспективы использования 1,2,3-триазолилфосфонатных олигонуклеотидов в качестве антисмысловых агентов, они не получили дальнейшего развития. Это может быть связано как с наличием более удобных способов конъюгации азидо- и алкиновых групп, так и с возможностью создания С-фосфонатных олигонуклеотидов со схожими свойствами более простыми методами.

2.4.3.3. Получение отрицательно заряженных С-фосфонатов

Другая группа С-фосфонатов состоит из производных, одновременно содержащих связь Р-С и несущих отрицательный заряд. К таким С-фосфонатам относятся, например,

фосфоноацетаты и их серосодержащие аналоги тиофосфоноацетаты (Рис. 36а) [154]. По аналогии с метилфосфонатами, для синтеза (тио)фосфоноацетатных производных необходимо использовать соответствующие амидофосфиновые мономеры. Схема получения таких мономеров содержит большое количество стадий со следующими ключевыми элементами. Ацетатную группу в виде сложного эфира бромацетата присоединяют к фосфорной компоненте в виде *бис*(N,N-диизопропиламино)хлорфосфина по реакции Реформатского в присутствии металлического цинка в качестве катализатора. Далее происходит присоединение получившегося диаминофосфина к 3'-ОН группе нуклеозида с получением итогового мономера (Рис. 36б). Полученные мономеры используют в амидофосфитном синтезе с адаптированными протоколами. В частности, на этапе окисления до фосфоноацетатной группы используют более мягкий окислитель в виде производного камфоры во избежание деградации межнуклеотидного звена; при этом тиофосфоноацетатные группировки получают с использованием в качестве окислителя реагента Бокажа. Кроме того, в составе фосфоноацетата присутствует защитная α,α -диметил- β -цианоэтильная группа, селективно удаляемая в безводных условиях в присутствии 1,8-дiazобисцикло[5.4.0]ундец-7-ена (DBU), что предотвращает деградацию фосфоноацетата при стандартном деблокировании олигонуклеотида в водном растворе аммиака (Рис. 36в).

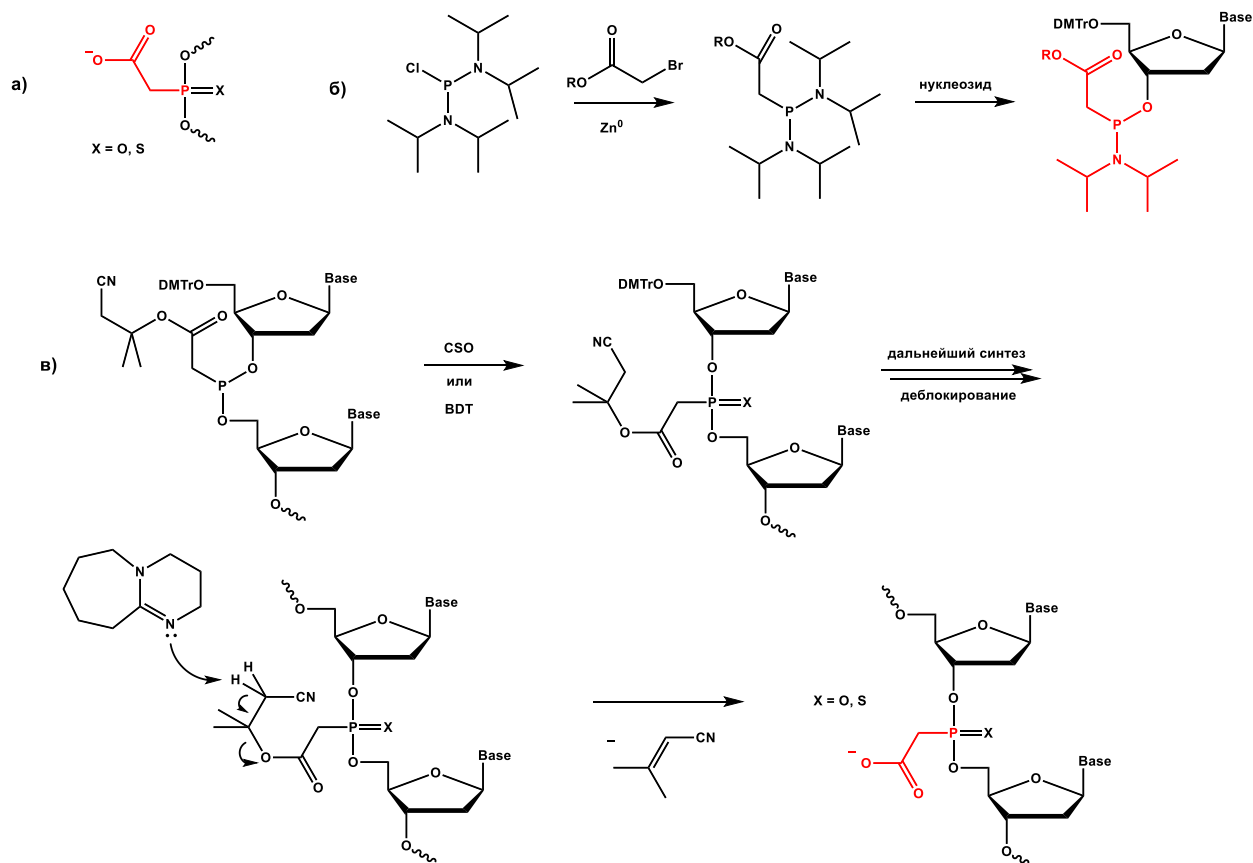


Рис. 36. Структура (тио)фосфоноацетатного звена (а) и схемы получения амидоацетилфосфинового мономера (б) и (тио)фосфоноацетатного звена в составе олигонуклеотида (в). Base – азотистое основание; DMTr – 4,4'-диметокситритильная группа; R = α,α -диметил- β -цианоэтил; CSO – (1S)-(+)-(10-камфоросульфонил)оксазиридин; BDT – 3-*H*-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксид (реагент Бокажа).

В случае замены диметилцианоэтильной защитной группы в составе амидоацетилфосфинового мономера на другие группы, нерасщепляемые в условиях твердофазного синтеза, возможно создание сложных эфиров фосфоноацетатов [155]. Для ряда таких производных, содержащих пивалоильные группы (Рис. 37), была продемонстрирована высокая эффективность проникновения через клеточную мембрану в отсутствие трансфектантов. В экспериментах *in vitro* сложноэфирная группа в составе модифицированных фосфоноацетатов практически количественно расщеплялась эстеразой из печени свиньи (porcine liver esterase, PLE), что указывает на возможность использования таких производных в качестве про-лекарств (pro-drug).

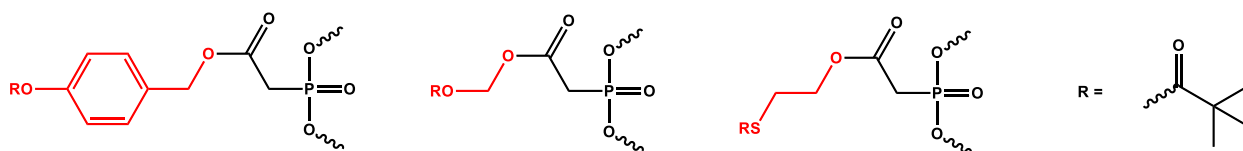


Рис. 37. Примеры структур сложных эфиров фосфоацетатов, содержащих пивалоильные группы.

В связи с сочетанием в структуре фосфоацетатов незаряженной связи Р-С и отрицательно заряженной ацетатной группой, данные производные обладают необычной комбинацией свойств. Так, фосфоацетаты стабильны к ферментативному гидролизу различными нуклеазами и в то же время способны эффективно активировать РНКазу Н для расщепления последовательности мишени, чему способствует образование прочного дуплекса с РНК в А-форме [156]. Введение нескольких (тио)фосфоацетатных групп в состав различных антисмысловых конструкций повышает эффективность их действия. Например, модифицированные фосфоацетатными группами siРНК показали высокую степень расщепления мишени в двойном люциферазном тесте, а в одноцепочечном состоянии подобные олигонуклеотиды выступали в качестве эффективного ингибитора микроРНК 122 [157]. Тиофосфоацетатные группы в составе соответствующих конструкций способны улучшать действие антисмысловых олигонуклеотидов, блокирующих экспрессию генов, а также sgРНК для редактирования генома с применением системы CRISPR/Cas9 [158, 159].

Другим типом отрицательно заряженных С-фосфонатов являются фосфоформаты (Рис. 38а) [160]. Как и в случае фосфоацетатов, для синтеза фосфоформатов необходимо использование специальных мономеров. К основным этапам получения амидоформилфосфиновых мономеров можно отнести восстановление бис(N,N-диизопропиламино)хлорфосфина до соответствующего Н-фосфина алюмогидридом лития, присоединение к фосфину сложного эфира хлорформата в присутствии металлического натрия, и присоединение нуклеозида с получением итоговой структуры мономера (Рис. 38б). Стоит отметить, что фосфоформатная группа достаточно лабильна в условиях амидофосфитного синтеза и стандартного деблокирования в водных щелочных растворах, в связи с чем в ее состав вводят (дифенилметил)силилэтильную группу, селективно удаляемую в присутствии фторид-ионов. Такая неустойчивость фосфоформатной группы накладывает дополнительные ограничения и на другие защитные и отщепляемые группы, используемые в амидофосфитном синтезе, вследствие чего для получения фосфоформатных олигонуклеотидов необходимо использовать альтернативные структуры защитных групп

a)

б)

нуклеозид

R =

Для фосфоноформиатных олигонуклеотидов была показана полная стабильность к нуклеазной деградации, что, как и для всех С-фосфонатных производных, связано с отсутствием заряда в связи Р-С. Фосфоноформиатные производные способны образовывать дуплексы А-формы с комплементарной РНК, при этом введение фосфоноформиатных групп несколько повышает температуру плавления гибридизационного комплекса. Интересно, что несмотря на наличие отрицательного заряда в фосфоноформиатной группе, полностью модифицированные фосфоноформиаты не способны активировать РНКазу H. В то же время фланкирование немодифицированного ДНК олигонуклеотида фосфоноформиатными группами в разы повышает эффективность РНКазы H опосредованной деградации мишени [160].

56

2.4.4. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь Р-О- R

Олигонуклеотидные производные, содержащие третью связь типа Р-О-Р в дополнение к двум элементам фосфодиэфирной группы, связывающих нуклеозиды между собой, называют фосфотриэфирными олигонуклеотидами (Рис. 39а). Для получения фосфотриэфирных производных используют амидофосфитные мономеры с алкильным заместителем отличным от остатка β -цианоэтила при атоме кислорода в фосфорной компоненте; получение таких мономеров полностью идентично синтезу стандартных амидофосфитных мономеров (Рис. 39б). Фосфотриэфирные олигонуклеотиды крайне неустойчивы в щелочной среде, поэтому их деблокирование с твердофазного носителя проводят в очень мягких условиях в растворе диизопропиламина в метаноле [161]. В связи с этим необходимо использовать альтернативные *N*-трет-бутилфеноксиацетильные защитные группы для азотистых оснований, так же отщепляемые в этих условиях [162].

В качестве функциональных групп в состав фосфотриэфиров обычно вводят различные гидрофобные и положительно заряженные остатки, такие как, например, *N*-бензилоксикарбонильные группы, диаминогруппы, *S*-ацил-2-тиоэтильные (SATE) остатки (Рис. 39в) [161–163]. Такие группы в составе олигонуклеотидов обеспечивают их пассивную трансфекцию в клетки без использования агентов-доставщиков, а также препятствуют их расщеплению нуклеазами [162]. Известна также стратегия использования фосфотриэфирных олигонуклеотидов, несущих SATE-группы, в качестве про-лекарств – присутствующий в клетках фермент цитоплазматическая тиюэстераза способен расщеплять тиюэфирные связи, после чего происходит перегруппировка с отщеплением молекулы эписульфида и получением нативного фосфодиэфирного олигонуклеотида (Рис. 39г) [161, 164]. Такая стратегия была реализована на примере модельной siРНК, которая показала высокую эффективность РНК-интерференции за счет наличия SATE-групп, обеспечивающих самостоятельное проникновение siРНК в клетки и ее улучшенное связывание с сывороточным альбумином [161].

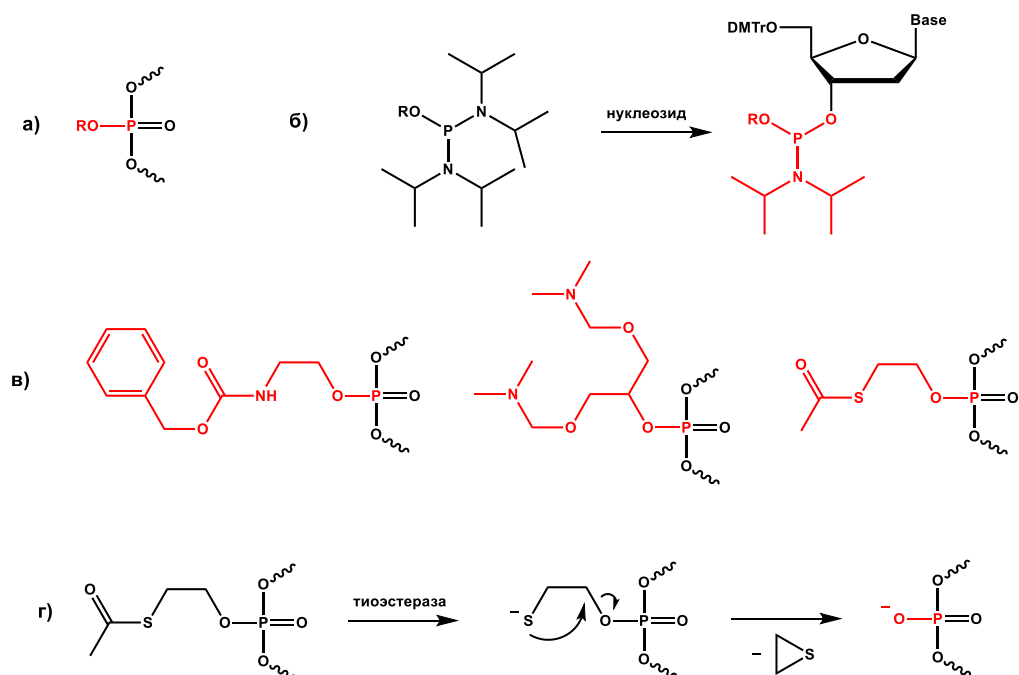


Рис. 39. Структуры фосфотриэфирного звена (а), амидофосфитного мономера с альтернативным алкоксильным заместителем (б), примеров фосфотриэфирных групп в составе олигонуклеотида (в) и схема ферментативного расщепления S-ацил-2-тиоэтильной (SATE) группы (г). Base – азотистое основание; DMTr – 4,4'-диметокситрильная группа; R – функциональный неотщепляемый заместитель.

Несмотря на возможность использования фосфотриэфирных производных нуклеиновых кислот в качестве эффективных про-лекарств, их применение в терапевтической области значительно ограничено их низкой стабильностью как в химических, так и в биологических средах, а также рядом затруднений при их получении.

2.4.5. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-N

Олигонуклеотидные производные, содержащие связь P-N, называют амидофосфатами. В большинстве амидофосфатных производных атом азота заменяет немостиновый атом кислорода. Выделяют несколько способов получения таких амидофосфатов, основанных на альтернативном окислении с применением различных агентов, совместимых с амидофосфитным синтезом.

Первый способ заключается в окислении фосфит-триэфира олигонуклеотида иодом в присутствии различных аминов [165–168]. Данный способ по сути является вариацией процесса окисления в амидофосфитном синтезе, в котором в окисляющей смеси в качестве нуклеофила применяют амины вместо стандартно используемой воды. Механизм указанного процесса состоит из нескольких стадий. На первой стадии неподеленная пара атома фосфора в составе фосфит-триэфира атакует молекулу иода с образованием положительно заряженного интермедиата (P^+-I). Далее происходит замещение атома иода

на остаток амина, протекающее практически одновременно с элиминированием β -цианоэтильной защитной группы, в результате чего образуется искомая амидофосфатная группа (Рис. 40а). Стоит отметить, что интермедиат (P^+-I) крайне неустойчив, однако стабильность промежуточного соединения можно повысить путем его перевода в иод-ангидридное состояние ($O=P-I$) в ходе предварительного элиминирования защитной группы. Для селективного получения такого интермедиата в олигонуклеотидном синтезе используют амидофосфитные мономеры с более лабильными защитными группами, например, *трет*-бутильными, которые могут быть легко удалены по реакции Арбузова (Рис. 40б) [165].

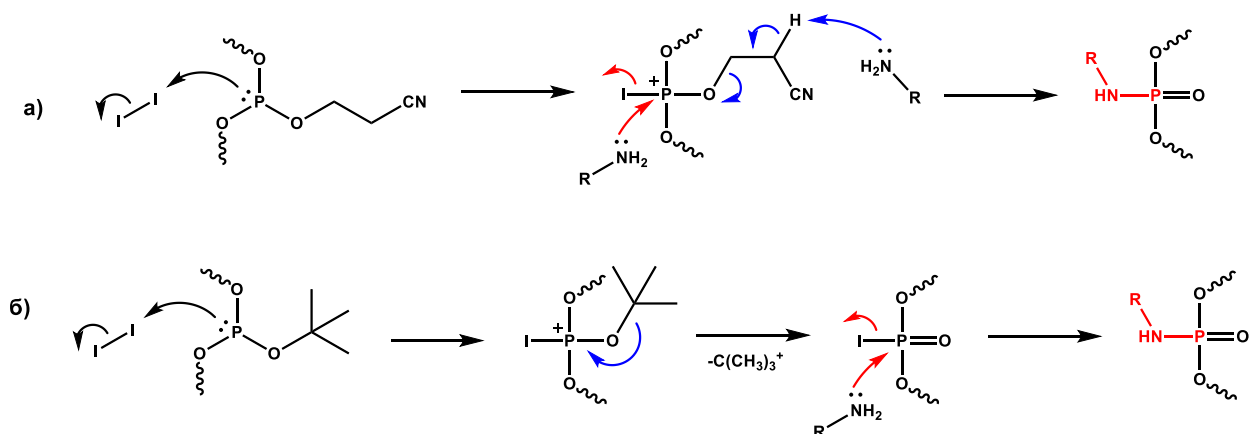


Рис. 40. Механизмы получения амидофосфатных групп при окислении фосфит-триэфиров молекулярным иодом, протекающие через образование положительно заряженного интермедиата типа (P^+-I) (а) и ангидридного интермедиата типа ($O=P-I$) (б). Красными стрелками обозначены реакции замещения амином, синими – реакции удаления защитных групп. R – функциональный заместитель.

Второй способ получения амидофосфатов основан на реакции Штаудингера – окислении фосфит-триэфиров органическими азидами [167–170]. В ходе реакции Штаудингера на первом этапе неподеленная пара атома фосфора атакует терминальный атома азота в составе азида с образованием фосфазида. На следующем этапе происходит циклизация фосфазида с образованием крайне неустойчивого четырехчленного интермедиата, который быстро распадается до фосфазена, содержащего связь $P=N$, с выделением молекулы азота (Рис. 41а) [171]. Фосфазены в значительной степени подвержены гидролизу, в ходе которого происходит образование фосфата и амина [172]. Тем не менее при синтезе олигонуклеотидов возможен селективный перевод лабильного фосфазена в необходимую амидофосфатную группу путем проведения отдельного этапа элиминирования β -цианоэтильной защитной группы в присутствии третичных аминов (Рис. 41б) [170, 173].

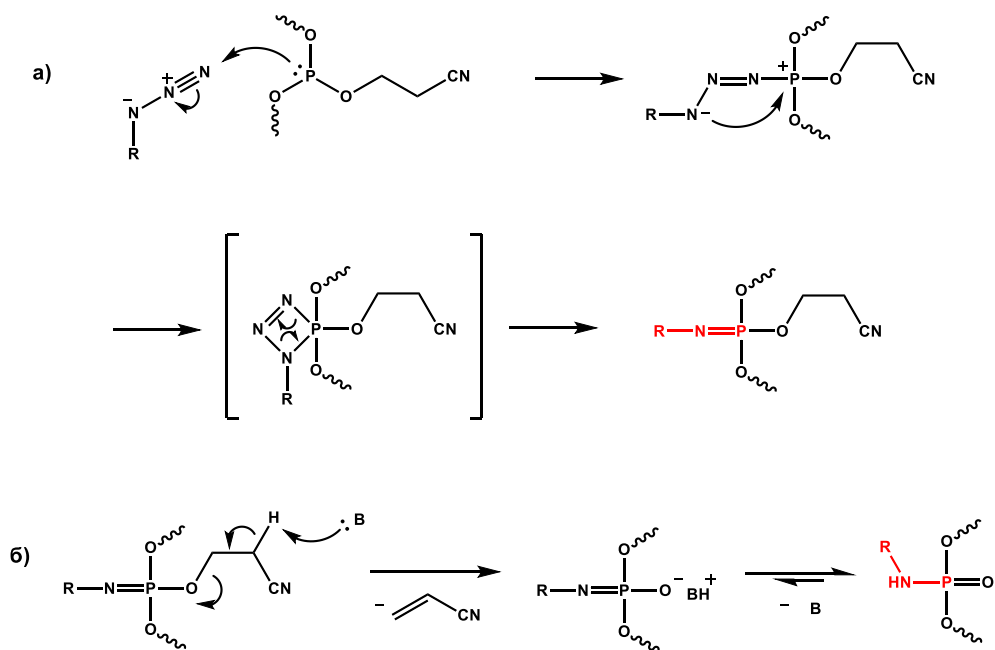


Рис. 41. Механизмы образования фосфазена по реакции Штаудингера (а) и амидофосфата из фосфазена путем элиминирования β-цианоэтильной защитной группы (б). R – функциональный заместитель; В – основание.

Одна из ключевых особенностей амидофосфатных производных заключается в возможности введения в состав олигонуклеотида широкого круга функциональных групп, присоединенных к амидофосфатной компоненте. При этом большая часть из известных классов амидофосфатных производных может быть получена с применением описанных способов. Далее будут рассмотрены конкретные типы амидофосфатных производных с указанием способа их получения, используемых модификаторов и вводимых функциональных групп, а также областей их применения.

2.4.5.1. Получение N-алкиламидофосфатов

Одним из первых описанных типов амидофосфатных олигонуклеотидов являются N-алкиламидофосфаты (Рис. 42а). На начальных этапах развития синтеза модифицированных олигонуклеотидов, алкиламидофосфатные производные в основном получали по реакции Атертона-Тодда, основанной на взаимодействии амина и Н-фосфоната в присутствии четыреххлористого углерода [174, 175]. Более современные методы получения алкиламидофосфатов могут быть адаптированы под амидофосфитный синтез и основаны на окислительном аминировании фосфит-триэфира в присутствии иода (см. Рис. 40) или взаимодействии фосфит-триэфира с алкилазидами по реакции Штаудингера (см. Рис. 41) [165, 166, 176]. Среди описанных в литературе функциональных групп, вводимых в состав олигонуклеотида с образованием алкиламидофосфатной группы,

можно выделить гидрофобные остатки (додецил, холестерин), алкиламиногруппы, алкилазидогруппы, алкинильные группы, ароматические группы, флуорофорные остатки (пирен); некоторые примеры исходных соединений для модификации приведены на Рис. 42б [165, 166, 176]. Алкиламидофосфатные модификации в основном используются для наделения олигонуклеотида дополнительными свойствами путем избирательного введения функциональных групп. Например, додецил-содержащие алкиламидофосфатные олигонуклеотиды могут быть применены в качестве доставщика нуклеиновых кислот в клетки [177].

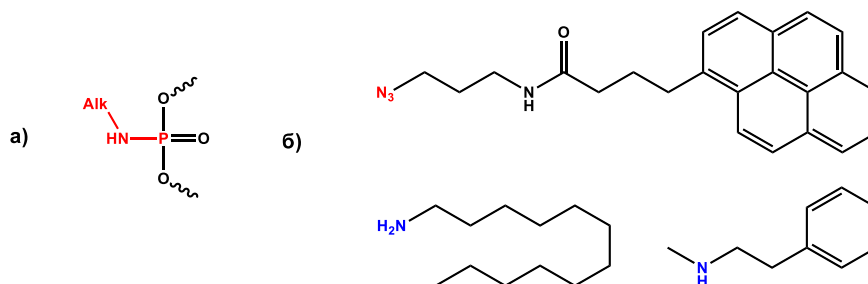


Рис. 42. Строение N-алкиламидофосфатной группы (а) и примеры исходных соединений в виде азидов (обозначены красным) и аминов (обозначены синим) для получения функционализированных N-алкиламидофосфатов (б).

При получении алкиламидофосфатов по методу окислительного аминирования необходимо абсолютизировать растворы во избежание гидролиза лабильных интермедиатов [166]. В случае же введения модификации по реакции Штаудингера необходимо соблюдать достаточно жесткие условия в связи с донорным характером алкилазидов [176]. Кроме того, алкиламидофосфаты в целом и алкиламидофосфатные олигонуклеотиды в частности в значительной мере подвержены кислотному гидролизу [178, 179]. Указанные факторы сильно ограничивают применение N-алкиламилофосфатных олигонуклеотидов, несмотря на существующее разнообразие представителей класса.

2.4.5.2. Получение сульфониламидофосфатов

Сульфониламидофосфатные производные являются одним из новых классов амидофосфатных олигонуклеотидов, открытых сравнительно недавно (Рис. 43а) [180]. Сульфониламидофосфаты получают по реакции Штаудингера (см. Рис. 41) с применением сульфонилазидов. В отличие от алкилазидов, сульфонилазиды являются достаточно сильными акцепторами и обеспечивают быстрое встраивание модификации в состав олигонуклеотида; такая тенденция весьма характерна для реакции Штаудингера [173]. На данный момент лишь для малого количества сульфонилазидов была продемонстрирована возможность введения в состав олигонуклеотида. К таким структурам можно отнести,

например, алкансульфонилазиды, в том числе и простейший представитель метансульфонилазид (мезилазид) и различные варианты ацилированных аминоэтилсульфонилазидов (Рис. 43б) [169, 180–182]. Тем не менее стоит отметить значительное число коммерчески доступных сульфонилахлоридов, которые могут выступать в качестве предшественников сульфонилазидов для расширения представителей класса сульфониламидофосфатов.

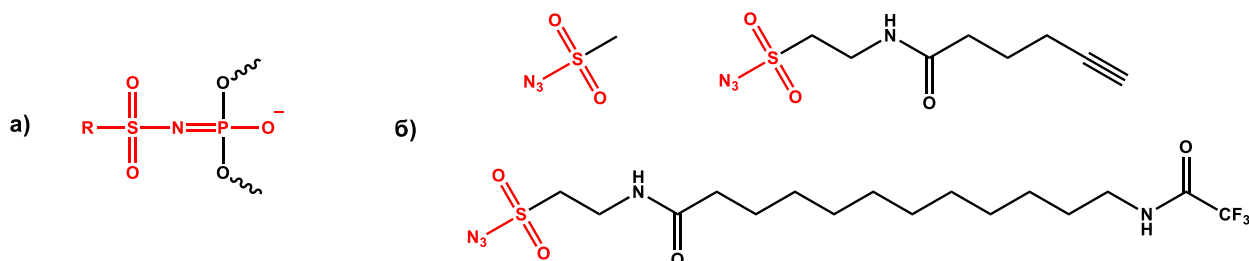


Рис. 43. Строение сульфониламидофосфатной группы (а) и примеры исходных сульфонилазидов для получения функционализированных сульфониламидофосфатов (б). R – функциональный заместитель.

Одной из ключевых особенностей рассматриваемого класса олигонуклеотидов является наличие отрицательного заряда на сульфониламидофосфатной группе, что обуславливает ряд их свойств. Так, например, для мезильных олигонуклеотидов была показана возможность рекрутирования РНКазы Н для расщепления микроРНК-21 с эффективностью выше, чем у тиофосфатного аналога [183]. Мезильные олигонуклеотиды также практически не обладают цитотоксичностью, что позволяет некоторым научным группам рассматривать их в качестве альтернативы тиофосфатам [184]. Таким образом, потенциальная возможность варьирования вводимых функциональных групп и базовые свойства класса указывают на высокий потенциал сульфониламидофосфатных олигонуклеотидов, в том числе и в области создания терапевтических препаратов.

2.4.5.3. Получение фосфорилгуанидинов

Другим типом новых и уже хорошо изученных амидофосфатов являются фосфорилгуанидины (ФГО) (Рис. 44а) [185, 186]. Метод получения фосфорилгуанидинов первоначально основывался на окислении фосфит-триэфиров различными гуанидинами в присутствии иода [185], однако в настоящее время фосфорилгуанидины получают по реакции Штаудингера с использованием диаминокарбенийазидов (Рис. 44б) [170, 186]. Данные соединения являются крайне сильными акцепторами, в связи с чем реакция Штаудингера с их использованием в условиях автоматического синтеза протекает всего за несколько минут [173, 186]. В отличие от большого количества предшественников для синтеза сульфонилазидов, существует всего один коммерчески доступный вариант

диаминокарбенийазида, а также два варианта диаминокарбенийхлоридов как предшественников. Для расширения класса ФГО была предложена синтетическая схема получения различных диаминокарбенийазидов, состоящая из нескольких ключевых этапов [170]. Исходно при взаимодействии вторичного амина и тиофосгена образуется тиомочевина, которая далее хлорируется с использованием реагента Вильсмайера. В получившемся соединении проводят замещение атома хлора на азидо-группу и замену противоиона на гексафторфосфат, в результате чего образуются искомые диаминокарбенийазиды (Рис. 44в). По данной схеме были получены фосфорилгуанидины, несущие различные гидрофобные остатки [170].

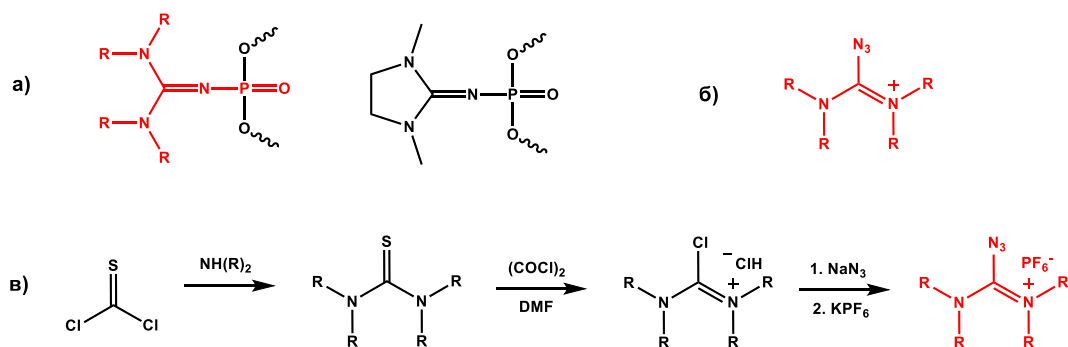


Рис. 44. Строение фосфорилгуанидинового звена и простейшего представителя класса – диметилимидазолидин фосфорилгуанидина (а), общий вид реагента для получения фосфорилгуанидинов – диаминокарбенийазида (б), схема получения диаминокарбенийазидов (в). R – функциональный заместитель.

Простейшим изученным представителем класса ФГО является диметилимидазолидин фосфорилгуанидин (DMI) (Рис. 44а). С использованием DMI-модифицированных олигонуклеотидов были описаны базовые свойства ФГО. Так, например, фосфорилгуанидиновые группы не заряжены, что обуславливает их высокую стабильность к нуклеазам, в частности к фосфодиэстеразе змеиного яда (SVPDE) [187, 188]. В то же время, нейтрально заряженные ФГО эффективно образуют дуплексы как с РНК, так и с ДНК в стандартной А-форме практически независимо от солевых условий лишь с незначительным уменьшением температуры плавления (1,2°C на модификацию) [189, 190]. Полезные свойства и простота получения DMI-модифицированных олигонуклеотидов, в том числе возможность введения модификации в автоматическом режиме в условиях амидофосфитного синтеза, позволили создать ряд ФГО с высоким терапевтическим потенциалом. В частности, была продемонстрирована эффективность применения антисмысловых гапмерных, сплайсинг корректирующих (splice correction), экзон-пропускающих (exon-skipping) ФГО, направленных на лечение мышечной дистрофии Дюшенна, а также на подавление генов *C9orf72*, *MDR1*, отвечающих за развитие бокового амиотрофического склероза и лекарственной устойчивости раковых клеток соответственно,

и длинной некодирующей РНК *Malat1*, участвующей в регуляции метастазирования [10, 11, 187]. Стоит отметить, что часть из перечисленных олигонуклеотидов уже находится на различных стадиях клинических испытаний (см. <https://wavelifesciences.com/pipeline/research-and-development/>).

2.4.5.4. Получение N3'-P5' амидофосфатов

Еще одним достаточно изученным типом амидофосфатов являются т.н. N3'-P5' амидофосфаты, содержащие атом азота вместо атома кислорода, связывающего фосфатную группу и 3'-положение нуклеозида (Рис. 45а) [191]. В отличие от уже описанных типов амидофосфатных производных, N3'-P5' олигонуклеотиды могут быть получены только с использованием альтернативных мономеров. Первый предложенный способ синтеза основывался на окислительном присоединении (oxidative coupling) 3'-аминонуклеозида к 5'-Н-фосфонату по реакции Аттертона-Тодда [191]. Несмотря на показанную эффективность, данный способ получения N3'-P5' олигонуклеотидов несовместим со стандартным амидофосфитным синтезом. Немного позднее была разработана альтернативная схема получения N3'-P5' амидофосфатов, подразумевающая использование 3'-(4-монометокситритил)амино-5'-(2-цианоэтил)амидофосфитов нуклеозидов в качестве мономеров и синтез в амидофосфитном варианте в направлении 5'→3' (Рис. 45б) [9, 192]. Получение указанных мономеров происходит в большое число стадий, основная часть которых применяется для получения 3'-аминонуклеозида. Упрощенная схема заключается в введении азидо-группы по 3'-положению нуклеозида путем замещения активированной гидроксильной группы со сменой ориентации заместителя с S-конфигурации на R-конфигурацию, восстановлению азидо-группы до аминогруппы водородом на палладиевом катализаторе и введении 4-монометокситритильной защиты по 3'-аминогруппе и 5'-(2-цианоэтил)диизопропиламидофосфитной группы (Рис. 45в) [192]. Стоит отметить, что схема была также адаптирована для получения мономеров, необходимых для синтеза N3'-P5' амидофосфатных аналогов РНК и 2'-модифицированных вариантов РНК [9, 193].

Модификации межнуклеотидного фосфата представлены значительным разнообразием, которое продолжает расширяться и в настоящее время. Интерес к данному типу модификаций обусловлен в первую очередь некоторыми их фундаментальными свойствами. Так, например, большая часть фосфатных модификаций обеспечивает устойчивость олигонуклеотидов к расщеплению нуклеазами, а также в некоторой мере увеличивает степень проникновения через мембраны клеток, что можно отнести к важным аспектам в контексте терапевтического применения олигонуклеотидов. Некоторые из типов фосфатных модификаций могут быть введены в состав олигонуклеотидов с минимальными изменениями протоколов стандартного амидофосфитного синтеза, что упрощает процесс получения соответствующих НК-производных. Простота синтеза способствует более эффективному изучению различных типов модификаций, и, как следствие, поиску потенциальных областей их применения. Так, например, в связи с простотой получения, тиофосфатная модификация является одной из самых изученных модификаций олигонуклеотидов и уже рутинно применяется при создании новых терапевтических препаратов. Стоит отдельно выделить такую особенность некоторых типов фосфатных модификаций, как возможность их использования в качестве линкеров для введения дополнительных функциональных групп в состав олигонуклеотидов. Таким образом, исходя из широкого разнообразия, базовых свойств и продолжающихся разработок новых представителей, модификации межнуклеотидной фосфатной группы можно выделить в отдельный тип модификаций олигонуклеотидов с большим прикладным потенциалом.

2.5. Заключение

В соответствии с рассмотренной в обзоре литературы информацией, существует множество подходов к введению различных типов химических модификаций в состав олигонуклеотида в рамках трех структурных элементов нуклеотидного звена, а именно азотистого основания, углеводного остова и межнуклеотидной фосфатной группы. Благодаря большому разнообразию специфических реакций органического синтеза, научным сообществом предложено значительное количество вариантов модифицированных олигонуклеотидов с измененными свойствами. Большая часть разработанных модификаций может быть введена в состав олигонуклеотида в рамках автоматического твердофазного амидофосфитного синтеза, что повышает эффективность их дальнейшего исследования.

Модифицированные азотистые основания, содержащие конкретные функциональные группы, вводятся в состав олигонуклеотида в основном единичным

варианте. Такие олигонуклеотиды в подавляющем большинстве случаев используют в различных реакциях конъюгации с биомолекулами (см., например, [31, 55, 56, 59]). В связи с этим при разработке новых вариантов структур модификаций азотистых оснований практически не руководствуются подходами, подразумевающими возможность гибкого изменения функциональных групп и, как следствие, свойств олигонуклеотидов. Модификации углеводного остова, в отличие от модификаций азотистых оснований, вводят в состав олигонуклеотида во множественном варианте, и используют для более тонкой модуляции свойств НК. В качестве подобных модификаций можно выделить морфолиновые, 2'-F, 2'-ОМе, 2'-МОЕ звенья, введение которых позволяет направленно варьировать гибридизационные свойства олигонуклеотидов, их устойчивость к ферментативному расщеплению, связывание с белками и т.п. (см., например, [68, 87]). Стоит отметить, что вышеперечисленные варианты модификаций углеводного остова входят в состав большинства одобренных олигонуклеотидных препаратов [4]. Вместе с тем, однако, для введения модификаций углеводного остова в состав олигонуклеотида, необходимо проведение многостадийного органического синтеза соответствующего амидофосфитного мономера в четырех вариантах с каждым из азотистых оснований.

В контексте возможности гибкого варьирования свойств олигонуклеотида особое внимание привлекают модификации межнуклеотидного фосфата. В отличие от модификаций азотистых оснований и углеводного остова, многие варианты модификаций фосфата могут быть введены в ходе стадии окисления в амидофосфитном синтезе. Такая особенность позволяет вводить модификации в любое положение цепи олигонуклеотида без ресурсозатратного синтеза модифицированных амидофосфитных мономеров. Для реализации такого подхода используют различные окислительные агенты, которые заменяют стандартную окислительную смесь на основе воды и молекулярного иода. К подобным окислительным агентам можно отнести, например, тионирующие, боронирующие соединения, смеси аминов с молекулярным иодом и органические азиды (см., например, [109, 134, 165, 166, 176]). Стоит отметить, что для некоторых типов фосфатных производных олигонуклеотидов уже разработаны схемы, позволяющие введение и варьирование функциональных остатков в рамках структуры модифицированного фосфата. К подобным производным можно отнести фосфорилгуанидиновые и сульфониламидофосфатные олигонуклеотиды, схема получения которых включает реакцию Штаудингера с применением соответствующих функционализированных азидов вместо стандартной реакции окисления [169, 170].

Несмотря на значительное разнообразие химических модификаций нуклеиновых кислот и подходов к их получению, очень немногие из них подразумевают возможность

эффективного варьирования функциональных групп в составе олигонуклеотидов. Учитывая активное развитие тематики применения модифицированных олигонуклеотидов в качестве терапевтических соединений и необходимость все более тонкого настраивания их свойств, разработка новых типов модификаций НК и подходов к их введению с возможностью гибкой функционализации представляется особенно актуальной задачей.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Химические реагенты

В работе были использованы нуклеотидные амидофосфиты (Glen Research, США), цианурхлорид, азид натрия, формамид (PanReac AppliChem, Испания), иодид калия (Кемстор, Россия), бутиламин (Merck, Германия), додециламин, олеиламин, (N-метил-N-октадецил)амин, (N,N-диметиламино)пропиламин, 3,3'-иминобис(N,N-диметилпропиламин), 1,6-диаминогексан, 1,4-диаминобутан, пиперазин, трис-(2-аминоэтил)амин, *n*-толуолсульфонилхлорид, S-метилмочевина, N,N-диметилимидазолидиний хлорид гексафторфосфат, 3-аминопропанол-1, 6-аминогексанол-1, 2-(2-аминоэтокси)этанол, (N-метил)аминоэтанол, диэтаноламин, пиперидин, диметиламин, морфолин, водный раствор метиламина (Acros Organics, США), водный раствор аммиака (Реахим, Россия), (N,N,N',N'-тетраметил)этилендиамин, бис-акриламид (Amresco, США), трис, бромфеноловый синий, реагент для прокраски ПААГ StainsAll® (Sigma Aldrich, США), акриламид, ЭДТА, ксиленцианол, персульфат аммония (Helicon, Россия), мочеви́на (ДИАМ, Россия), перхлорат лития (Fluka, Германия), реактивы и растворители квалификации х.ч. и о.с.ч. марок PanReac AppliChem (Испания), Sigma Aldrich, Acros Organics (США), Biochem Chemopharma (Франция), Merck (Германия), Вектон, Реахим (Россия).

3.2. Азидо-триазины

3.2.1. Методы характеристики и очистки азидо-триазинов

Для проведения тонкослойной хроматографии использовали пластинки DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия).

Для колоночной адсорбционной хроматографии использовали колонки V = 100 и 200 мл, с рассчитанным количеством сорбента Kieselgel 60 (размер частиц 0.060 – 0.200 мм, размер пор 60 Å; Merck, Германия).

Для концентрирования водных и органических растворов использовались приборы Rotavapor R200 (Buchi, Швейцария), Hei-VAP Expert (Heidolph, Германия), Concentrator 5301 (Eppendorf, Германия) и Savant DNA 120 SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific, США) при давлении 10-15 мм рт. ст. и температуре до 60°C. Получаемые соединения высушивали до постоянной массы, выдерживая их в эксикаторе при пониженном давлении (до 4 мм.рт.ст) над P₂O₅.

Спектры ЯМР ¹³C и ЯМР ¹H регистрировали на спектрометре «Bruker AC 200» (300, 500 МГц) в дейтерированном хлороформе с концентрацией 50 мг/500 мкл. Спектры анализировали с помощью программы SPINWORKS. Спектры ИК соединений в виде

спрессованной таблетки на основе бромида калия регистрировали на спектрометре Varian 640-IR (Varian, США). Спектры регистрировали в ЦКП при ИОХ СО РАН.

3.2.2. Органический синтез азидо-триазинов

Синтез 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина

К раствору цианурхлорида (3 г, 16.3 ммоль) в 40 мл ацетона добавляли азид натрия (1.06 г, 16 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 2 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 20 мл CH_2Cl_2 , промывали концентрированным раствором NaCl (4 × 20 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали до получения белого осадка продукта. Очистка проводилась методом колоночной хроматографии в системе CH_2Cl_2 /гексан, 1:1. Объединенные фракции упаривали, вещество сушили до постоянного веса. Масса полученного вещества 1.016 г (выход 33 %). $R_f = 0.325$; система CH_2Cl_2 /гексан, 1:1. ^{13}C ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , м.д): 171.41, 172.61. ИК (KBr, ω , cm^{-1}): 2190 (N_3).

Синтез 2-азидо-4,6-диметиламино-1,3,5-триазина

К раствору 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (0.1 г, 0.52 ммоль, 1 экв.) в 10 мл CH_2Cl_2 добавляли избыток водного раствора метиламина (0.082 г, 1.04 ммоль, 2 экв.). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 2 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь промывали концентрированным раствором NaCl (3 × 20 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали до получения белого осадка 2-азидо-4,6-диметиламино-1,3,5-триазина, который высушивали до постоянного веса ($m = 0.035$ г, выход = 37%). $R_f = 0.7$ (система ТСХ = 10% этанола в толуоле). ^1H ЯМР (80 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 3.05 (d, 6 H, $-\text{NHCH}_3$), 6.57 (br s, 2 H, $-\text{NHCH}_3$).

Синтез 2-азидо-4,6-дибутиламино-1,3,5-триазина

К раствору 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (0.25 г, 1.3 ммоль, 1 экв.) в 20 мл тетрагидрофурана добавляли избыток бутиламина (0.51 мл, 5.2 ммоль, 4 экв.). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 12 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь очищали от бутиламмоний хлорида на стеклянном фильтре. Реакционную смесь упаривали до получения белого осадка 2-азидо-4,6-дибутиламино-1,3,5-триазина, который высушивали до постоянного веса ($m = 0.34$ г, выход = 99%). $R_f = 0.58$ (система ТСХ = 10% этанола в толуоле). ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 0.92 (m, 6 H, $-\text{CH}_3$), 1.35 (m, 4 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.53 (m, 4 H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$), 3.38 (m, 4 H, -

NHCH₂-), 5.69 (m, 2 H, -NH-). ¹³C ЯМР (500 МГц, CDCl₃, δ, ppm): 13.37, 19.73, 29.48, 39.65, 165.64, 167.89.

Синтез 2-азидо-4-амино-6-хлоро-1,3,5-триазины

К раствору 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазины (0.1 г, 0.52 ммоль) в 20 мл CH₂Cl₂ добавляли водный раствор аммиака (0.03 г, 0.52 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 2 часов при охлаждении до 0°C. Реакционную смесь промывали концентрированным раствором NaCl (3 × 20 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na₂SO₄, упаривали до получения белого осадка 2-азидо-4-амино-6-хлоро-1,3,5-триазины, который высушивали до постоянного веса (m = 0.036 г, выход = 40%). R_f = 0.28 (система ТСХ = 20% раствор EtOAc в гексане).

Синтез 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазины

К раствору цианурхлорида (5.0 г, 27.1 ммоль) в 30 мл ацетона добавляли водный раствор метиламина (2.1 г, 27.1 ммоль) и диизопропилэтиламин (4.71 мл, 27.1 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 4 часов при охлаждении до 0°C. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 30 мл CH₂Cl₂, промывали насыщенным раствором NaCl (3 × 30 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na₂SO₄, упаривали до получения желто-белого осадка 2-метиламино-4,6-дихлоро-1,3,5-триазины. Очистка проводилась методом колоночной хроматографии в градиенте 0-20% EtOAc в гексане. Объединенные фракции упаривали, вещество сушили до постоянного веса.

К очищенному веществу добавляли 1 эквивалент азиды натрия в 25 мл сухого ацетонитрила. Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение суток при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 30 мл CH₂Cl₂, промывали насыщенным раствором NaCl (3 × 30 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na₂SO₄, упаривали с получением желто-белого осадка 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазины, который высушивали до постоянного веса (m = 2.9 г, выход по двум стадиям 60 %). R_f = 0.5 (система ТСХ = 20% EtOAc в гексане. ¹H ЯМР (80 МГц, CDCl₃, δ, ppm): 3.11 (d, 3 H, -NHCH₃), 7.23 (m, 1 H, -NHCH₃).

Синтез 2-азидо-4-бутиламино-6-хлоро-1,3,5-триазины

К раствору цианурхлорида (1.0 г, 5.4 ммоль) в 15 мл ацетонитрила по каплям добавляли раствор бутиламина (0.53 мл, 5.4 ммоль) и диизопропилэтиламина (0.94 мл, 5.4 ммоль) в 10 мл ацетонитрила при 0°C, после чего температуру постепенно поднимали до комнатной. Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 4 часов при

комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали до получения желтого осадка 2-бутиламино-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина. Очистка проводилась методом флеш-колоночной хроматографии в 10% растворе EtOAc в гексане. Объединенные фракции упаривали, вещество сушили до постоянного веса ($m = 0.98$ г, выход = 82%).

К раствору очищенного 2-бутиламино-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (0.98 г, 4.4 ммоль, 1 экв.) в 25 мл ацетона добавляли небольшой избыток азидата натрия (0.32 г, 4.8 ммоль, 1.1 экв.). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение суток при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 30 мл CH_2Cl_2 , промывали насыщенным раствором NaCl (3×30 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением желтого масла, кристаллизующегося в осадок 2-азидо-4-бутиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина, который высушивали до постоянного веса ($m = 0.49$ г, выход = 49 %). $R_f = 0.62$ (система ТСХ = 15% EtOAc в гексане). ^1H ЯМР (80 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 0.94 (t, 3 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.25 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.50 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.47 (m, 2 H, $-\text{NHCH}_2-$), 6.12 (br s, 1 H, $-\text{NHCH}_2-$).

Синтез 2-азидо-4-(N-морфолино)-6-хлоро-1,3,5-триазина

К раствору цианурхлорида (1.0 г, 5.4 ммоль, 1 экв.) в 15 мл ацетонитрила по каплям добавляли раствор морфолина (0.42 мл, 4.9 ммоль, 0.9 экв.) и диизопропилэтиламина (0.85 мл, 4.9 ммоль, 0.9 экв.) в 10 мл ацетонитрила при 0°C , после чего температуру постепенно поднимали до комнатной. Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 1 часа при комнатной температуре. Реакционную смесь промывали водой с образованием белого осадка 2-(N-морфолино)-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина. Осадок отфильтровывали на стеклянном фильтре и сушили до постоянного веса ($m = 0.72$ г, выход = 63%).

К раствору очищенного 2-(N-морфолино)-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (0.7 г, 2.98 ммоль, 1 экв.) в 25 мл ацетонитрила добавляли небольшой избыток азидата натрия (0.21 г, 3.28 ммоль, 1.1 экв.). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение суток при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 30 мл CH_2Cl_2 , промывали насыщенным раствором NaCl (3×30 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением белого осадка 2-азидо-4-(N-морфолино)-6-хлоро-1,3,5-триазина, который высушивали до постоянного веса ($m = 0.33$ г, выход = 46 %). $R_f = 0.5$ (система ТСХ = 20% раствор EtOAc в гексане). ^1H ЯМР (80 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 3.78 (br m, 8 H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ + $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$).

Синтез 2-азидо-4-додециламино-6-хлоро-1,3,5-триазина

К раствору цианурхлорида (0.7 г, 3.8 ммоль) в 30 мл CHCl_3 и 10 мл 10% масс водного раствора NaOH добавляли додециламин (0.7 г, 3.8 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 2 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь промывали насыщенным раствором NaCl (3×15 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением белого осадка 2-додециламино-4,6-дихлоротриазина. Очистка проводилась перекристаллизацией в смеси $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$ 5:1, осадок высушивали до постоянного веса ($m = 0.87$ г, выход = 69%).

К раствору очищенного 2-додециламино-4,6-дихлоротриазина (0.82 г, 2.47 ммоль, 1 экв.) в 25 мл ацетона добавляли небольшой избыток азидата натрия (0.2 г, 3.08 ммоль, 1.25 экв.). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 5 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 20 мл CH_2Cl_2 , промывали насыщенным раствором NaCl (3×15 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением белого осадка 2-азидо-4-додециламино-6-хлор-1,3,5-триазина. Очистка проводилась методом колоночной хроматографии в градиенте 0-10% EtOAc в гексане. Объединенные фракции упаривали, вещество сушили до постоянного веса ($m = 0.17$ г, выход = 20 %). $R_f = 0.45$ (система $\text{TCX} = 10\%$ раствор EtOAc в гексане). ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 0.87 (t, 3 H, $-\text{CH}_3$), 1.20-1.37 (m, 18 H, $-\text{CH}_2-$), 1.59 (m, 2 H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$), 3.45 (m, 2 H, $-\text{NHCH}_2-$), 6.37 (m, 1 H, $-\text{NH}-$). ^{13}C ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 14.03, 22.64, 26.68, 29.08, 29.17, 29.20, 29.29, 29.47, 29.51, 29.58, 31.87, 41.34, 166.28, 166.39, 169.24, 170.18, 170.25, 171.34.

Синтез 2-азидо-4-олеиламино-6-хлор-1,3,5-триазина

К раствору цианурхлорида (0.7 г, 3.8 ммоль) в 30 мл CHCl_3 и 10 мл 10% масс водного раствора NaOH добавляли олеиламин (1.02 г, 3.8 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 2 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь промывали насыщенным раствором NaCl (3×15 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением розового масла 2-олеиламино-4,6-дихлоротриазина. Очистка проводилась методом колоночной хроматографии в градиенте 0-7.5% EtOAc в гексане. Объединенные фракции упаривали, вещество сушили до постоянного веса ($m = 0.95$ г, выход = 60 %).

К раствору очищенного 2-олеиламино-4,6-дихлоротриазина (0.88 г, 2.12 ммоль, 1 экв.) в 25 мл ацетона добавляли небольшой избыток азидата натрия (0.17 г, 2.65 ммоль, 1.25 экв.). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 5 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 20 мл CH_2Cl_2 , промывали насыщенным раствором NaCl (3×15 мл). Органическую фазу сушили над

безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением желтого масла 2-азидо-4-олеиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина. Очистка проводилась методом колоночной хроматографии в градиенте 0-10% EtOAc в гексане. Объединенные фракции упаривали, вещество сушили до постоянного веса ($m = 0.48$ г, выход = 49 %). $R_f = 0.35$ (система $\text{TCX} = 10\%$ раствор EtOAc в гексане). ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 0.87 (t, 3 H, $-\text{CH}_3$), 1.20-1.39 (m, 22 H, $-\text{CH}_2-$), 1.59 (m, 2 H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$), 1.90-2.08 (m, 4 H, $-\text{CH}_2\text{CHCHCH}_2-$), 3.45 (m, 2 H, $-\text{NHCH}_2-$), 5.27-5.42 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{CHCHCH}_2-$), 6.40 (m, 1 H, $-\text{NH}-$). ^{13}C ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 14.08, 22.66, 26.65, 26.68, 27.14, 27.19, 29.06, 29.15, 29.29, 29.37, 29.50, 29.68, 29.73, 31.88, 32.57, 41.28, 41.32, 129.68, 129.97, 166.19, 166.28, 169.18, 170.11, 170.20, 171.28.

Синтез 2-азидо-4-(N-метил-N-октадецил)амино-6-хлоро-1,3,5-триазина

К раствору цианурхлорида (0.25 г, 1.36 ммоль) в 30 мл CHCl_3 и 10 мл 10% масс водного раствора NaOH добавляли (N-метил-N-октадецил)амин (0.38 г, 1.36 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 2 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь промывали насыщенным раствором NaCl (3×15 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением белого осадка 2-(N-метил-N-октадецил)амино-4,6-дихлоро-триазина, который сушили до постоянного веса ($m = 0.47$ г, выход = 80 %).

К раствору очищенного 2-(N-метил-N-октадецил)амино-4,6-дихлоро-триазина (0.43 г, 0.99 ммоль, 1 экв.) в 25 мл ацетона добавляли небольшой избыток азид натрия (0.077 г, 1.18 ммоль, 1.2 экв.). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 5 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 20 мл CH_2Cl_2 , промывали насыщенным раствором NaCl (3×15 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением белого осадка 2-азидо-4-(N-метил-N-октадецил)амино-6-хлоро-1,3,5-триазина. Очистка проводилась методом колоночной хроматографии в градиенте 0-4% EtOAc в гексане. Объединенные фракции упаривали, вещество сушили до постоянного веса ($m = 0.31$ г, выход = 70 %). $R_f = 0.6$ (система $\text{TCX} = 10\%$ раствор EtOAc в гексане). ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 0.87 (t, 3 H, $-\text{CH}_3$), 1.21-1.33 (m, 30 H, $-\text{CH}_2-$), 1.59 (m, 2 H, $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 3.14 (m, 3 H, $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$), 3.59 (m, 2 H, $-\text{N}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-$). ^{13}C ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 14.09, 22.67, 26.53, 26.62, 26.82, 26.97, 29.26, 29.34, 29.48, 29.68, 31.90, 34.92, 35.10, 49.17, 49.30, 164.94, 165.01, 169.27, 169.36, 170.36, 170.53.

Синтез 2-азидо-4,6-диидо-1,3,5-триазина

К раствору цианурхлорида (0.5 г, 2.7 ммоль, 1 экв.) в 25 мл ацетона добавляли избыток иодида калия (2.25 г, 13.6 ммоль, 5 экв.). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение суток при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 20 мл CH_2Cl_2 , промывали насыщенным раствором NaCl (3×15 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением светло-коричневого осадка циануриодида, который сушили до постоянного веса ($m = 0.4$ г, выход = 32 %).

К раствору очищенного циануриодида (0.4 г, 0.87 ммоль, 1 экв.) в 20 мл ацетона добавляли небольшой избыток азидата натрия (0.06 г, 0.96 ммоль, 1.1 экв.). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 90 минут при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 25 мл CH_2Cl_2 , промывали насыщенным раствором NaCl (3×15 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением светло-коричневого осадка 2-азидо-4,6-дииодо-1,3,5-триазина, который сушили до постоянного веса ($m = 0.27$ г, выход = 82 %). $R_f = 0.71$ (система $\text{TCX} = 10\%$ раствор этилацетата в гексане). ИК (KBr , ω , cm^{-1}): 2175 (N_3). ^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 171.26, 172.46.

Синтез 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина

К раствору гидроксида натрия (0.65 г, 16.2 ммоль, 2 экв.) в 15 мл метанола добавляли 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазин (1.54 г, 8.1 ммоль, 1 экв.) при 0 °C, после чего температуру постепенно поднимали до комнатной. Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 2 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь отделяли от осадка NaCl на стеклянном фильтре при промывке ацетонитрилом. Фильтрат упаривали с образованием белого осадка 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина, который сушили до постоянного веса ($m = 0.93$ г, выход = 63%). $R_f = 0.28$ (система $\text{TCX} = 10\%$ раствор этилацетата в гексане). ^1H ЯМР (80 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 4.02 (s, 6 H, $-\text{OCH}_3$).

3.3. Синтез олигонуклеотидов

Все олигонуклеотиды были синтезированы на автоматических ДНК-синтезаторах ASM-800 или ASM-800E (Биоссет, Новосибирск) по протоколам твердофазного амидофосфитного синтеза с применением коммерчески доступных 2-цианоэтильных дезоксирибонуклеозидных мономеров и твердофазных носителей CPG (Glen Research, США).

Для введения триазириламидофосфатной группы использовали специальный протокол с измененным этапом окисления. Фосфит-триэфирную группу, образовавшуюся после протекания очередной конденсации мономера, без проведения дальнейших этапов кэпирования и окисления обрабатывали растворами необходимых 2-азидо-1,3,5-триазинов. Полные условия реакции Штаудингера и дальнейших обработок олигонуклеотидов серии (N) и других олигонуклеотидов представлены ниже.

Олигонуклеотиды серии (N)

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина проводили в следующих условиях: 0.1М раствор азида, 15 минут, 25°C (PШ1);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4,6-диметиламино-1,3,5-триазина в первом варианте проводили в следующих условиях: 0.1М раствор азида, 15 минут, 25°C (PШ2);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4,6-диметиламино-1,3,5-триазина во втором варианте проводили в следующих условиях: 0.5М раствор азида, 1 час, 65°C (PШ3);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина проводили в следующих условиях: 0.1М раствор азида, 15 минут, 25°C (PШ4);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4,6-дииодо-1,3,5-триазина проводили в следующих условиях: 0.1М раствор азида, 15 минут, 25°C (PШ5);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина в первом варианте проводили в следующих условиях: 0.1М раствор азида, 15 минут, 25°C (PШ6);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина во втором варианте проводили в следующих условиях: 0.25М раствор азида, 1 час, 55°C (PШ7);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4-додециламино-6-хлоро-1,3,5-триазина проводили в следующих условиях: 0.1М раствор азида, 2 часа, 25°C (PШ8);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4-олеиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина проводили в следующих условиях: 0.1М раствор азида, 2 часа, 25°C (PШ9);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4-(N-метил-N-октадецил)амино-6-хлоро-1,3,5-триазина проводили в следующих условиях: 0.1М раствор азида, 2 часа, 25°C (PШ10);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4,6-дибутиламино-1,3,5-триазина проводили в следующих условиях: 0.5М раствор азида, 1 час, 65°C (PШ11);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4-бутиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина в автоматическом режиме проводили в следующих условиях: 0.25М раствор азида, этап окисления – 2 часа (РШ12);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4-морфолино-6-хлоро-1,3,5-триазина в автоматическом режиме проводили в следующих условиях: 0.25М раствор азида, этап окисления – 2 часа (РШ13);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина в автоматическом режиме проводили в следующих условиях: 0.25М раствор азида, этап окисления – 2 часа (РШ14);

Элиминирование 2-цианоэтильных групп проводили в следующих условиях: 10% об. раствор DIPEA в ацетонитриле, 30 минут, 40°C (β-элиминирование);

Обработку олигонуклеотида деионизованной водой проводили в следующих условиях: 12 часов, 55°C (гидролиз);

Обработку олигонуклеотида аминами и другими реагентами проводили в условиях, указанных в списке ниже.

Последовательности обработок фосфит-триэфира (кроме производных N-50, N-51) для получения олигонуклеотидов серии (N):

- N-1: РШ1 → β-элиминирование;
- N-2: РШ2 → β-элиминирование;
- N-3: РШ3 → β-элиминирование;
- N-4: РШ4 → β-элиминирование;
- N-5: РШ5 → β-элиминирование;
- N-6: РШ6 → β-элиминирование;
- N-7: РШ7 → β-элиминирование;
- N-8: РШ1;
- N-9: РШ5;
- N-10: РШ1 → гидролиз;
- N-11: РШ1 → β-элиминирование → гидролиз;
- N-12: РШ1 → обработка кэпирующей смесью олигонуклеотидного синтеза;
- N-13: РШ1 → β-элиминирование → обработка пиперидином (10% об. раствор в ацетонитриле, 1 час, 25°C);
- N-14: РШ1 → β-элиминирование → обработка (N-метил)бутиламином (50% об. раствор в ацетонитриле, 30 минут, 25°C);

- N-15: PШ1 → β -элиминирование → обработка диметиламином (40% масс водный раствор, 15 минут, 55°C; одновременно происходит деблокирование с твердофазного носителя);
- N-16: PШ1 → β -элиминирование → обработка дигексиламином (10% об. раствор в ацетонитриле, 1 час, 25°C);
- N-17: PШ1 → β -элиминирование → обработка (N-метил-N-октадецил)амином (2M раствор в пиридине, 30 минут, 55°C);
- N-18: PШ1 → β -элиминирование → обработка олеиламином (2M раствор в пиридине, 30 минут, 55°C);
- N-19: PШ1 → β -элиминирование → обработка 6-аминогексанолам-1 (1.5M раствор в ацетонитриле, 1 час, 55°C);
- N-20: PШ1 → β -элиминирование → обработка диэтанолламином (10% об. раствор в смеси ацетон/ацетонитрил 1:1, 1 час, 55°C);
- N-21: PШ1 → β -элиминирование → обработка 2-(2-аминоэтокси)этанолом (62.5% об. раствор в ацетонитриле, 1 час, 25°C);
- N-22: PШ1 → β -элиминирование → обработка 3-аминопропанолом-1 (1.5M раствор в ацетонитриле, 1 час, 55°C);
- N-23: PШ1 → β -элиминирование → обработка 2-(N-метил)аминоэтанолом (10% об. раствор в ацетонитриле, 1 час, 25°C);
- N-24: PШ1 → β -элиминирование → обработка 3,3'-иминобис(N,N-диметилпропил)амином (10% об. раствор в ацетонитриле, 1 час, 25°C);
- N-25: PШ1 → β -элиминирование → обработка трис-(2-аминоэтил)амином (10% об. раствор в ацетонитриле, 1 час, 25°C);
- N-26: PШ1 → β -элиминирование → обработка (N,N-диметиламино)пропиламином (10% об. раствор в ацетонитриле, 1 час, 25°C);
- N-27: PШ1 → β -элиминирование → обработка 1,4-диаминобутаном (10% об. раствор в ацетонитриле, 1 час, 55°C);
- N-28: PШ1 → β -элиминирование → обработка 1,6-диаминогексаном (1.5M раствор в ацетонитриле, 1 час, 55°C);
- N-29: PШ1 → β -элиминирование → обработка пиперазином (2M раствор в хлороформе, 2 часа, 25°C);
- N-30: PШ1 → β -элиминирование → обработка анилином (10% об. раствор в ацетонитриле, 1 час, 55°C);

- N-31: PШ1 → β -элиминирование → обработка пиперазином → обработка *n*-толуолсульфонилхлоридом (2М раствор в ацетонитриле с добавлением 2М раствора DIPEA, 1 часа, 25°C);
- N-32: PШ1 → β -элиминирование → обработка пиперазином → обработка цианурхлоридом (1.5М раствор в ацетонитриле с добавлением 1.5М раствора DIPEA, 15 минут, 25°C);
- N-33: PШ1 → β -элиминирование → обработка пиперазином → обработка цианурхлоридом → обработка бутиламином (10% об. раствор в ацетонитриле, 1 час, 55°C);
- N-34: PШ1 → β -элиминирование → обработка пиперазином → обработка цианурхлоридом → обработка пиперазином → обработка *n*-толуолсульфонилхлоридом;
- N-35: PШ1 → β -элиминирование → обработка трис-(2-аминоэтил)амином → обработка *O*-метилизомочевинной (10 мг в 100 мкл ацетонитрила и 50 мкл 25мМ NaHCO₃, 1 день, 55°C);
- N-36: PШ1 → β -элиминирование → обработка трис-(2-аминоэтил)амином → обработка (2-хлоро-1,3-диметил)имидазолидиния гексафторфосфатом (10 мг в 200 мкл ацетонитрила и 7 мкл DIPEA, 30 минут, 55°C);
- N-37: PШ1 → β -элиминирование → обработка трис-(2-аминоэтил)амином → ацетилирование (обработка кэпирующей смесью олигонуклеотидного синтеза);
- N-38: PШ1 → β -элиминирование → обработка 1,6-диаминогексаном → обработка *n*-толуолсульфонилхлоридом;
- N-39: PШ1 → β -элиминирование → обработка 3-аминопропанолом-1 → обработка *n*-толуолсульфонилхлоридом → обработка пиперидином (10% об. раствор в ацетонитриле, 1 день, 40°C);
- N-40: PШ1 → β -элиминирование → обработка 3-аминопропанолом-1 → присоединение тимидилатного звена (стандартный цикл амидофосфитного синтеза);
- N-41: PШ1 → β -элиминирование → обработка 6-аминогексанолам-1 → присоединение тимидилатного звена;
- N-42: PШ1 → β -элиминирование → обработка 2-(2-аминоэтокси)этанолом → присоединение тимидилатного звена (дважды);
- N-43: PШ8 → β -элиминирование;

- N-44: PШ9 → β-элиминирование;
- N-45: PШ10 → β-элиминирование;
- N-46: PШ8 → β-элиминирование → обработка (N,N-диметиламино)пропиламином;
- N-47: PШ11 → β-элиминирование;
- N-48: PШ1 → β-элиминирование;
- N-49: PШ1 → β-элиминирование;
- N-50: обработка нативного олигонуклеотида цианурхлоридом (0.1M раствор в ацетонитриле, 1 час, 55°C);
- N-51: обработка нативного олигонуклеотида 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином (0.1M раствор в ацетонитриле, 1 час, 55°C);
- N-52: PШ12;
- N-53: PШ13;
- N-54: PШ14;
- N-55: PШ14 (две модификации);
- N-56: PШ14 (три модификации);
- N-57: PШ14 (четыре модификации);

Другие триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина проводили в следующих условиях: 0.1M раствор азида, 15 минут, 25°C (PШ1);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина в автоматическом режиме проводили в следующих условиях: 0.25M раствор азида, этап окисления – 2 часа (PШ2);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4-амино-6-хлоро-1,3,5-триазина в автоматическом режиме проводили в следующих условиях: 0.25M раствор азида, этап окисления – 2 часа (PШ3);

Элиминирование 2-цианоэтильных групп проводили в следующих условиях: 10% об. раствор DIPEA в ацетонитриле, 30 минут, 40°C (β-элиминирование);

Обработку олигонуклеотида аминами и другими реагентами проводили в условиях, указанных в списке ниже.

Последовательности обработок фосфит-триэфира для введения триазиниламидофосфатной группы:

- М-В, М-В1: РШ1 → β-элиминирование → обработка бутиламином (10% об. раствор в ацетонитриле, 30 минут, 40°C);
- М-А1, М-А2, М-А3, М-А4, М-А5: РШ3 нужное число раз;
- М-М1, М-М2, М-М3, М-М4, М-М5: РШ2 нужное число раз;
- М-D1, TD2, А, АХ, АХ2, АХ3, АХ4, АХ5, В, ВХ, ВХ', ВХ'', ВУ, ВМ, ВS: РШ1 → β-элиминирование → обработка додециламином (2М раствор в пиридине, 30 минут, 55°C);
- TOD2: РШ1 → β-элиминирование → обработка 3-аминопропанолом-1 (1.5М раствор в ацетонитриле, 1 час, 55°C) → обработка (N,N-диизопропил)2-цианоэтил-додециламидофосфитом (0.1М, 45 минут, автоматический режим).

Для введения в состав олигонуклеотидов других модификаций, используемых в данной работе, применяли нижеописанные методики.

Введение бензиламидофосфатной модификации в состав олигонуклеотида Вz осуществляли по ранее опубликованной методике [166]. Фосфит-триэфирную группу, образовавшуюся после протекания очередной конденсации мономера, обрабатывали 2М раствором бензиламина в пиридине в присутствии 15% раствора (об.) (N,O-бистриметилсилил)ацетамида (BSA) с добавлением 0.04М раствора молекулярного иода в сухом пиридине в течение 15 минут при комнатной температуре.

Введение додецильных групп в состав олигонуклеотидов OD1, OD2, OD3 осуществляли с использованием 5'-додецильного модификатора в виде (N,N-диизопропил)2-цианоэтил-додециламидофосфита (время конденсации – 45 минут, 0.1М раствор, автоматический режим) и коммерчески доступных разветвляющих агентов в виде амидофосфитов («doubler phosphoramidite» и «trebler phosphoramidite», Glen Research, США; конденсация проводилась согласно протоколу производителя).

Введение додецильных остатков в состав олигонуклеотида MonD3 осуществляли по ранее опубликованной методике [177]. Ненуклеотидный амидофосфитный мономер с оксаламидным остовом, несущий остатки додециламина, вводили в состав олигонуклеотида в автоматическом режиме (0.1М раствор мономера, время конденсации – 10 минут).

Введение додециламидофосфатной модификации в состав олигонуклеотида ND2 осуществляли по ранее опубликованной методике [177]. Фосфит-триэфирную группу, образовавшуюся после протекания очередной конденсации мономера, обрабатывали 2.5М раствором додециламина в смеси DMF/BSA 7:4 (об.) с добавлением 0.04М раствора молекулярного иода в сухом пиридине в течение 12 минут в автоматическом режиме.

Введение додецильных остатков в состав олигонуклеотида GD2 осуществляли по ранее опубликованной методике [170]. Фосфит-триэфирную группу, образовавшуюся после протекания очередной конденсации мономера, обрабатывали 1М раствором азидоди(N-метил-N-додециламино)карбения гексафторфосфата в течение 6 часов при 50°C.

Введение 1,3-диметилимидазолидиниевых групп в состав олигонуклеотидов AX, AX2, AX3, AX4, AX5, BX, BX', BX'', NX осуществляли по ранее опубликованной методике [199]. Фосфит-триэфирную группу, образовавшуюся после протекания очередной конденсации мономера, обрабатывали 0.5М раствором 2-азидо-1,3-диметилимидазолидиния гексафторфосфата в сухом ацетонитриле в течение 30 минут в автоматическом режиме.

Введение пирролидиновых фосфорилгуанидиновых групп в состав олигонуклеотида ВУ осуществляли по реакции Штаудингера. Фосфит-триэфирную группу, образовавшуюся после протекания очередной конденсации мономера, обрабатывали 0.25М раствором азидодипирролидинкарбения гексафторфосфата в течение 1 в автоматическом режиме.

Введение тиофосфатной группы в состав олигонуклеотида BS осуществляли с применением сульфлирующего реагента (Sulfurizing Reagent II, Glen Research, США) согласно протоколу производителя.

Введение метансульфониламидофосфатной группы в состав олигонуклеотида BM осуществляли по реакции Штаудингера. Фосфит-триэфирную группу, образовавшуюся после протекания очередной конденсации мономера, обрабатывали 0.25М раствором метансульфонилазида в течение 1 часа в автоматическом режиме.

Введение остатка холестерина в состав олигонуклеотидов Н, НХ осуществляли путем проведения амидофосфитного синтеза на холестерин-содержащем твердофазном носителе (Primetech, Беларусь) согласно протоколу производителя.

Введение остатка флуоресцеина (FAM) в 3'-конец олигонуклеотидов осуществляли путем проведения амидофосфитного синтеза на FAM-содержащем твердофазном носителе (FAM CPG 500, 6-изомер, Lumiprobe, Россия) согласно протоколу производителя. Введение остатка FAM в 5'-конец олигонуклеотидов осуществляли с применением соответствующего амидофосфита (FAM фосфорамидит, 6-изомер, Lumiprobe, Россия) (время конденсации – 30 минут, 0.1М раствор в ацетонитриле, автоматический режим).

Синтезированные олигонуклеотиды деблокировали в водном растворе метиламина в течение 30 минут при 55°C. Олигонуклеотиды, содержащие остаток флуоресцеина, деблокировали сначала в водном растворе аммиака в течение 15 минут при 55°C, затем

добавляли равный объем метиламина и продолжали деблокирование еще 15 минут при 55°C.

После проведения деблокирования, растворы олигонуклеотидов упаривали на установке Savant DNA 120 SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific, США), разбавляли в 100 мкл деионизированной воды и хранили при температуре -20°C. Холестерин-содержащие олигонуклеотиды Н, НХ после упаривания разбавляли в смеси вода/этанол 1:1.

3.4. Характеризация и очистка олигонуклеотидов

ОФ ВЭЖХ реакционных смесей модифицированных олигонуклеотидов проводили на хроматографе «Милихром А02» с использованием колонки (2 x 75 мм, «ProntoSIL-120-5-C18»; «Эконова», Россия). Разделение продуктов реакции проводили в градиентах ацетонитрила (0-90% или 0-45% за 15 минут) в 0.02 М водном растворе ТЕА*АсОН (рН = 7) (скорость потока 200 мкл/мин, температура термостата 35°C). Детекцию осуществляли на четырех длинах волн: 260, 280, 300 и 360 нм.

Хроматографическое выделение олигонуклеотидов проводили на хроматографе Agilent 1200 (США) с колонкой Zorbax SB-C18 (5 мкм) 4.6 × 150 мм в градиенте ацетонитрила в 20 mM ацетате триэтиламмония, рН 7, от 0 до 90%, в течение 30 мин при скорости потока 1.5 мл/мин. Фракции, содержащие целевой продукт, упаривали со смесью H₂O/EtOH 1:1 в вакууме на установке SpeedVac. Затем олигонуклеотиды высаживали добавлением 1 мл раствора 1 М LiClO₄ в ацетоне, осадок промывали ацетоном и сушили на воздухе 20 минут. Преципитаты олигонуклеотидов разбавляли в 100 мкл деионизированной воды и хранили при температуре -20°C.

Спектры MALDI-TOF реакционных смесей синтеза модифицированных олигонуклеотидов регистрировали на приборе Bruker Reflex III Autoflex Speed (Германия) в варианте положительных ионов с использованием 3-гидроксипиколиновой кислоты в качестве матрицы. Спектры ESI-MS реакционных смесей синтеза модифицированных олигонуклеотидов регистрировали на приборе Agilent G6410A (США). Спектры были зарегистрированы сотрудником ОЦКП ЦМСА при ИХБФМ СО РАН Олейник Г.А.

Электрофорез в денатурирующих условиях проводили в 20% или 15% ПААГ с соотношением акриламида к бисакриlamиду 19:1 и 7 М мочевиной в однократном ТВЕ-буфере (ТВЕ × 20: 1 М трис, рН=8.3, 1 М Н₃ВО₃, 0.0265 М ЭДТА). Для полимеризации геля добавляли 16 мкл персульфата аммония (10% масс. водный раствор) и 0,3 мкл ТЕМЕД на 1 мл объема. В качестве электродного буфера использовали однократный ТВЕ-буфер.

3.5. Методы исследования олигонуклеотидов

3.5.1. Формирование ДНК-дуплексов и определение температур их плавления

Для получения ДНК-дуплексов соответствующие олигонуклеотиды в концентрации 5 мкМ каждого смешивали в эквимольном соотношении в какодильном буфере (1М NaCl, 10мМ (CH₃)₂AsO₂Na (какодилат натрия)), смеси постепенно нагревали от 5°C до 95°C.

Термическую денатурацию осуществляли на установке Cary 300 BioMelt (Varian, Австралия). Температуры плавления (Тпл) комплексов определяли, анализируя профили денатурации и ренатурации дуплексов, зарегистрированные на длинах волн 260 и 270 нм. Скорость нагрева/охлаждения образцов не превышала 0.5°C/мин. Точность определения величин Тпл составила 0.1°C. Кривые плавления были построены в программе Microsoft Excel, температуры плавления были определены методом нелинейной аппроксимации с помощью функции «Поиск решения».

Термическая денатурация с оптической регистрацией сигнала дуплексов олигонуклеотидов была проведена сотрудником ЛСТБ ИХБФМ СО РАН, к.ф.-м.н. Голышевым В.М.

3.5.2. Исследование олигонуклеотидов методом динамического светорассеяния

Распределение по размеру супрамолекулярных комплексов модифицированных олигонуклеотидов, несущих гидрофобные группы, определяли методом динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano-ZS (Malvern Panalytical Ltd., Великобритания). Олигонуклеотиды были растворены в культуральной среде DMEM (Sigma Aldrich, США) до концентрации 5 мкМ; измерения проводили в течение 2 часов с 10 минутным интервалом.

3.5.3. Исследование химической устойчивости олигонуклеотидов

Для определения устойчивости модификаций олигонуклеотидов в кислой среде отбирали аликвоты раствора олигонуклеотида и обрабатывали избытком 0.1М соляной кислоты. Олигонуклеотиды выдерживали в кислоте в течение 30, 90, 180 и 780 минут, после чего заливали концентрированным раствором аммиака до нейтрализации среды. Олигонуклеотиды осаждали 2% масс. раствором перхлората лития в ацетоне, преципитаты олигонуклеотидов сушили на воздухе в течение 20 минут, после чего разбавляли в 100 мкл деионизированной воды. Полученные растворы анализировали методом ОФ ВЭЖХ.

3.5.4. Исследование устойчивости олигонуклеотидов к нуклеазам цельноклеточных экстрактов

Реакционные смеси содержали 1 мг/мл белков клеточного экстракта (T98G или HEK293T), 0.1 мкМ ДНК и буферные компоненты: 10 мМ $MgCl_2$, 50 мМ Трис-НCl (pH = 8.0), 50 мМ NaCl. Реакцию проводили в течение 7.5 и 15 мин для каждого экстракта при 37°C. Реакцию останавливали введением ЭДТА до конечной концентрации 20 мМ. После этого аликвоты анализировали с помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях.

Эксперименты по определению ферментативной устойчивости олигонуклеотидов проведены сотрудником ЛБХФ ИХБФМ СО РАН, к.х.н. Ильиной Е.С.

3.5.5. Исследование цитотоксичности олигонуклеотидов

Цитотоксичность олигонуклеотидов изучали на клеточных культурах HEK293T и T98G в режиме реального времени с помощью прибора xCELLigence (ACEA Biosciences, США) в течение 24–36 ч. Клетки высевали на 16-луночные E-планшеты в плотности 105 кл./лунку в 150 мкл полной среды IMDM и инкубировали в стандартных условиях в течение 7–24 ч для прикрепления клеток ко дну планшета. После этого среду заменяли на 150 мкл среды IMDM, содержащей 10% FBS и 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 50 мкМ олигонуклеотидов. Клетки инкубировали в течение 24–36 ч в стандартных условиях. Значения клеточных индексов измеряли каждые 30 мин. Дозозависимые кривые выживаемости клеток строили с помощью программного обеспечения MS Excel для временной точки 24 ч после добавления олигонуклеотида к клеткам. Значения IC50 рассчитывали как концентрацию олигонуклеотида, необходимого для снижения клеточного индекса на 50% по сравнению с контрольными клетками, инкубированными в отсутствие олигонуклеотида.

Эксперименты по определению цитотоксичности олигонуклеотидов проведены сотрудником ЛБХФ ИХБФМ СО РАН, к.х.н. Ильиной Е.С.

3.5.6. Исследование эффективности внутриклеточного проникновения олигонуклеотидов методом проточной цитофлуориметрии

Клетки HEK293T с плотностью посадки 75,000–150,000 клеток на лунку высаживали в 24-луночный планшет в среде DMEM (Sigma-Aldrich, США), содержащей 10% FBS (HyClone, США) и 1% антибиотиков (MP Biomedicals, США) (здесь и далее – полная среда). Далее клетки инкубировали в течение 18 часов при 37°C в атмосфере 5% CO_2 (здесь и далее – стандартные условия) для прикрепления клеток. После этого заменяли культурную среду на среду DMEM без сыворотки и антибиотиков, содержащую липофильные

олигонуклеотиды в концентрации 5 мкМ. Клетки трансфецировали в течение 4 часов при стандартных условиях. Далее клетки промывали PBS, открепляли от культурального пластика 2%-ным раствором трипсина (MP Biomedicals, США), промывали полной средой DMEM, осаждали, промывали PBS и фиксировали в 2%-ном растворе формальдегида в PBS. Внутриклеточное проникновение олигонуклеотидов оценивали с использованием цитофлуориметр NovoCyte 3000 (ACEA Biosciences, США). Данные проточной цитофлуориметрии анализировали с помощью программы NovoExpress v. 1.1.0 (ACEA Biosciences, США). Эксперименты были проведены в трех повторах для статистического анализа.

В кинетических экспериментах клетки HEK293T трансфецировали олионуклеотидами в концентрации 5 мкМ в культуральной среде без сыворотки. Эффективность внутриклеточного проникновения определяли после 1, 2, 4, 8 и 24 часов после начала трансфекции. В случае отмывки от олигонуклеотидов, клетки промывали полной средой DMEM после 4 часов трансфекции и далее инкубировали в стандартных условиях до проведения анализа.

Статистический анализ результатов был проведен с использованием программы GraphPad Prism v. 8.0.1 (Graph-Pad Software Inc., США). Разница между средними значениями была определена с использованием post hoc теста после дисперсионного анализа ANOVA (значения $p < 0.05$ были выбраны в качестве статистически значимых).

Эксперименты по определению эффективности проникновения олигонуклеотидов проведены сотрудником ЛБНК ИХБФМ СО РАН, к.б.н. Марковым О.В.

3.5.7. Исследование внутриклеточной локализации олигонуклеотидов методом конфокальной микроскопии

Клетки HEK293T с плотностью посадки 150,000 клеток на лунку высаживали на покровные стекла (Marienfeld, Германия) в 24-луночный планшет в полной среде DMEM и инкубировали в течение 18 часов в стандартных условиях для прикрепления клеток. Клетки, прикрепленные к покровным стеклам, инкубировали в среде DMEM без сыворотки и антибиотиков, содержащей липофильные олигонуклеотиды в концентрации 5 мкМ в течение 4 часов в стандартных условиях. После трансфекции покровные стекла с клетками дважды промывали PBS. Далее клетки фиксировали в 4%-ном растворе формальдегида в PBS в течение 15 минут при 37°C и дважды промывали PBS. Клетки окрашивали раствором DAPI (1:100 в PBS, Thermo Fisher Scientific, США) при комнатной температуре в течение 10 минут без доступа света. После окрашивания ядер клетки дважды промывали PBS и помещали их на предметное стекло в каплю среды Fluoromount-G® (SouthernBiotech,

США). Закрепленные образцы были оставлены при комнатной температуре на 24 часа в отсутствие света для затвердевания. Внутриклеточная локализация липофильных олигонуклеотидов была определена с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM710 (Zeiss, Германия), оснащенного объективом Plan-Apochromat 63×/1.40 Oil DIC M27. Изображения конфокальной микроскопии были получены с использованием программы ZEN Black Edition v. 8.1 (Zeiss, Германия).

Эксперименты по определению внутриклеточной локализации олигонуклеотидов проведены сотрудником ЛБНК ИХБФМ СО РАН, к.б.н. Марковым О.В.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

4.1. Выбор подхода к модификации олигонуклеотидов и общей структуры реагентов-модификаторов

Одним из удобных положений для введения модификаций в состав олигонуклеотида с точки зрения возможности его гибкой функционализации можно назвать межнуклеотидную фосфатную группу. В отличие от других положений, модификации в составе межнуклеотидной фосфатной группы могут быть введены посредством изменения всего одной стадии синтетического цикла – реакции окисления фосфит-триэфирной группы. Таким образом, для изменения вводимых функциональных групп необходимо варьировать лишь окисляющие реагенты без проведения ресурсозатратного синтеза альтернативных мономеров, что в значительной мере обуславливает эффективность такого подхода. Среди всех типов фосфат-модифицированных олигонуклеотидов, амидофосфатные производные представлены самым широким набором классов и их представителей, несущих различные функциональные заместители. Это связано с особенностями подходов к их получению, подразумевающих использование окисляющих реагентов, уже содержащих желаемые функциональные группы или же промежуточные группы с возможностью переменного введения функциональных групп. Выделяют два основных подхода к получению амидофосфатных производных – окислительное аминирование и реакцию Штаудингера [165–170]. В ходе проведения окислительного аминирования образуются крайне нестабильные иод-содержащие интермедиаты [166], что препятствует эффективному применению такого подхода. С другой стороны, интермедиаты реакции Штаудингера в виде фосфазенов более устойчивы по сравнению с иод-содержащими интермедиатами, и, кроме того, могут быть селективно переведены в стабильную амидофосфатную форму [170, 173]. Таким образом, в данной работе в качестве типа модифицированных олигонуклеотидов были выбраны амидофосфатные производные, а в качестве основного подхода к их получению – реакция Штаудингера.

В последнее время разрабатывается все больше подходов к модификации нуклеиновых кислот с применением реакции Штаудингера [169, 170, 186]. Подобные подходы основаны на взаимодействии интермедиата олигонуклеотидного синтеза в виде фосфит-триэфира и органического азида. Среди известных структур азидов для эффективного получения фосфат-модифицированных олигонуклеотидов можно выделить даминарбенидазиды и сульфонидазиды, используемые при синтезе фосфорилгуанидинов и сульфонидамидофосфатов соответственно [169, 170]. Следует отметить, что оба представленных варианта азидов обладают сильно выраженным акцепторным характером.

Выбор азидов акцепторной природы для модификации по реакции Штаудингера не случаен и учитывает кинетические особенности протекания реакции. Известно, что при использовании азидов акцепторного характера, например, диаминокарбенидазидов, реакция Штаудингера может протекать количественно в течение нескольких минут в мягких условиях [173]. В то же время, при использовании донорных азидов, например, алкилазидов, для достижения такой же эффективности модификации реакцию Штаудингера необходимо проводить в течение нескольких часов при нагревании [176].

В соответствии с выбранным подходом к модификации олигонуклеотидов, вышеперечисленными особенностями протекания реакции Штаудингера, и поставленной целью работы, были сформулированы следующие критерии выбора общей структуры реагента-модификатора:

- Реагент должен содержать азидо-группу для возможности встраивания в структуру олигонуклеотида по реакции Штаудингера;
- Реагент должен обладать акцепторным характером для обеспечения высокой эффективности протекания реакции Штаудингера;
- Структура реагента должна подразумевать возможность варьирования вводимых функциональных групп.

В данной работе в качестве реагентов-модификаторов были выбраны различные 2-азидо-1,3,5-триазины (Рис. 46а). Симметричный триазиновый гетероцикл является плоской молекулой с выраженными электрон акцепторными свойствами, что позволяет применять его, например, при синтезе сложных молекулярных каркасов с протяженными π -системами в качестве акцепторной компоненты [200–202]. Структура 1,3,5-триазина подразумевает возможность введения сразу двух функциональных групп в рамках одного межнуклеотидного фосфата. Кроме того, при рациональном дизайне конкретных 2-азидо-1,3,5-триазинов возможно обеспечение варьирования вводимых функциональных групп, что указывает на потенциальную гибкость разрабатываемого подхода. Таким образом, реагенты-модификаторы на основе 2-азидо-1,3,5-триазинов полностью удовлетворяют представленным критериям.

После проведения реакции Штаудингера и введения необходимых функциональных групп образуется триазиниламидофосфатная группа. Функциональные группы вводятся в состав триазинового остова модификации в виде остатков различных алкиламинов. Данный выбор обусловлен коммерческой доступностью широкого круга аминов, что позволяет получать целый набор различных представителей нового класса олигонуклеотидов –

триазиниламидофосфатных производных. Структура итогового триазиниламидофосфатного звена в составе олигонуклеотида представлена на Рис. 46б.

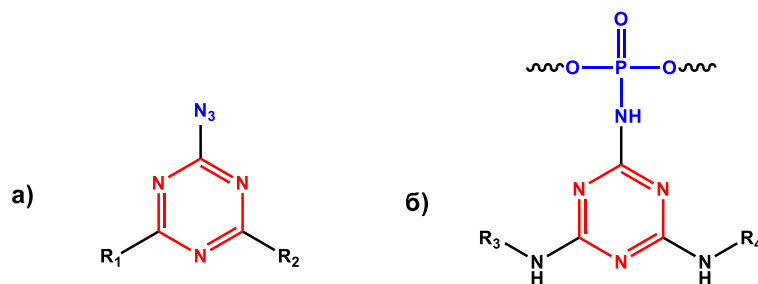


Рис. 46. Общее строение реагентов-модификаторов в виде 2-азидо-1,3,5-триазинов (а) и триазиниламидофосфатного звена в составе олигонуклеотида (б). $-R_1$, $-R_2$ – промежуточные заместители или $-NHR_3$, $-NHR_4$; $-R_3$, $-R_4$ – функциональные заместители.

В данной работе было предложено и синтезировано несколько вариантов структур 4,6-замещенных 2-азидо-1,3,5-триазинов в качестве реагентов-модификаторов. Далее будут детально рассмотрены оптимизированные способы их получения с учетом особенностей нуклеофильного замещения в триазиновом остове. Кроме того, будут указаны общие предполагаемые схемы получения триазиниламидофосфатных групп в составе олигонуклеотида с применением описанных реагентов.

4.2. Пути получения азидо-триазинов и триазиниламидофосфатных групп

4.2.1 Структура и способы получения различных 2-азидо-1,3,5-триазинов в качестве реагентов-модификаторов

В данной работе в качестве исходного соединения для получения всех азидо-триазинов был использован 2,4,6-трихлоро-1,3,5-триазин (цианурхлорид, Рис. 47, соединение I). Самым простым вариантом азидо-триазина, который может быть получен из цианурхлорида всего в одну стадию путем взаимодействия с азидом натрия, является 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазин (Рис. 47, путь 1, соединение II). Несмотря на простоту синтетической схемы, при получении данного реагента необходимо соблюдать строгие условия реакции, что связано с некоторыми кинетическими закономерностями нуклеофильного замещения в триазиновом остове. Известно, что замещение атомов хлора в цианурхлориде на донорные остатки в виде, например, алкиламинов происходит с разной эффективностью: первое замещение протекает при 0°C , второе – при комнатной температуре, а третье – при сильном нагревании свыше 60°C [203]. В то же время, азидо-группа является лишь незначительно менее акцепторной по сравнению с атомом хлора, в связи с чем при ее введении в состав цианурхлорида высокая реакционная способность получаемого соединения сохраняется. В результате, даже при охлаждении реакционной

смеси возможно образование ди- и тризамещенных азидо-триазинов, и, как следствие, необходимо проводить дополнительный этап очистки от побочных продуктов, что приводит к падению выхода целевого продукта. Тем не менее, путем разделения продуктов реакционной смеси методом колоночной градиентной хроматографии, 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазин был получен в чистом виде.

Альтернативным вариантом структуры азидо-триазинов, рассмотренным в данной работе, являются различные 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазины (Рис. 47, соединение III). В соответствии с особенностями замещения в триазиновом остове, первоначально был выбран вариант получения таких соединений, основанный на исходном замещении двух атомов хлора в составе цианурхлорида на целевые остатки аминов, и последующем замещении последнего атома хлора на азидо-группу. Однако, при попытке синтеза по предложенной схеме 2-азидо-4,6-дибутиламино-1,3,5-триазина, этап присоединения азидо-группы протекал с низкой эффективностью даже при жестких условиях (данные не приведены). В связи с этим, последовательность реакций была изменена – изначально был получен 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазин, атомы хлора которого далее были замещены на целевые остатки аминов (Рис. 47, путь 2). По предложенной схеме были получены азидо-триазины, содержащие остатки метиламина и бутиламина.

Третьим вариантом структур азидо-триазинов являются 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазины (Рис. 47, соединение IV). В отличие от предыдущих типов реагентов, при получении 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов схема контролируемого введения заместителей была реализована успешно. На первом этапе один атом хлора в цианурхлориде был селективно замещен на целевой остаток амина, после чего азидо-группа при замещении второго атома хлора была введена количественно (Рис. 47, путь 3). По предложенной схеме был получен целый ряд реагентов-модификаторов, содержащих в своем составе остатки аммиака, метиламина, бутиламина, морфолина, додециламина, олеиламина и (N-метил-N-октадецил)амин.

Вышеперечисленные варианты структур азидо-триазинов выступали в качестве основных реагентов-модификаторов в данной работе, с применением которых было получено большинство триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов. Комбинаторика заместителей в составе азидо-триазинов именно в виде атомов хлора и алкиламиногрупп основана как на выборе коммерчески доступного цианурхлорида в качестве исходного соединения, так и на необходимости введения остатков аминов в финальную структуру триазиниламидофосфатной группы. В качестве дополнительных вариантов азидо-триазинов с другими типами заместителей были получены 2-азидо-4,6-диiodo-1,3,5-

триазин (Рис. 47, соединение V) и 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазин (Рис. 47, соединение VI). Синтез иод-содержащего азида-триазина был осуществлен в две стадии – первоначально из цианурхлорида при обработке избыточным количеством иодида калия был получен циануриодид, в котором далее один атом иода селективно замещался на азидо-группу (Рис. 47, путь 4). В ароматических соединениях атомы иода являются плохими уходящими группами, однако могут быть замещены различными нуклеофилами в более жестких условиях по сравнению с атомами хлора, в том числе в составе 1,3,5-триазинов [204]. В связи с этим, одна азидо-группа может быть введена в состав циануриодида селективно. При получении 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина была использована схема, аналогичная синтезу азида-триазинов, содержащих две алкиламиногруппы – в состав 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина были введены метокси-группы при обработке соединения избытком метанола (Рис. 47, путь 5).

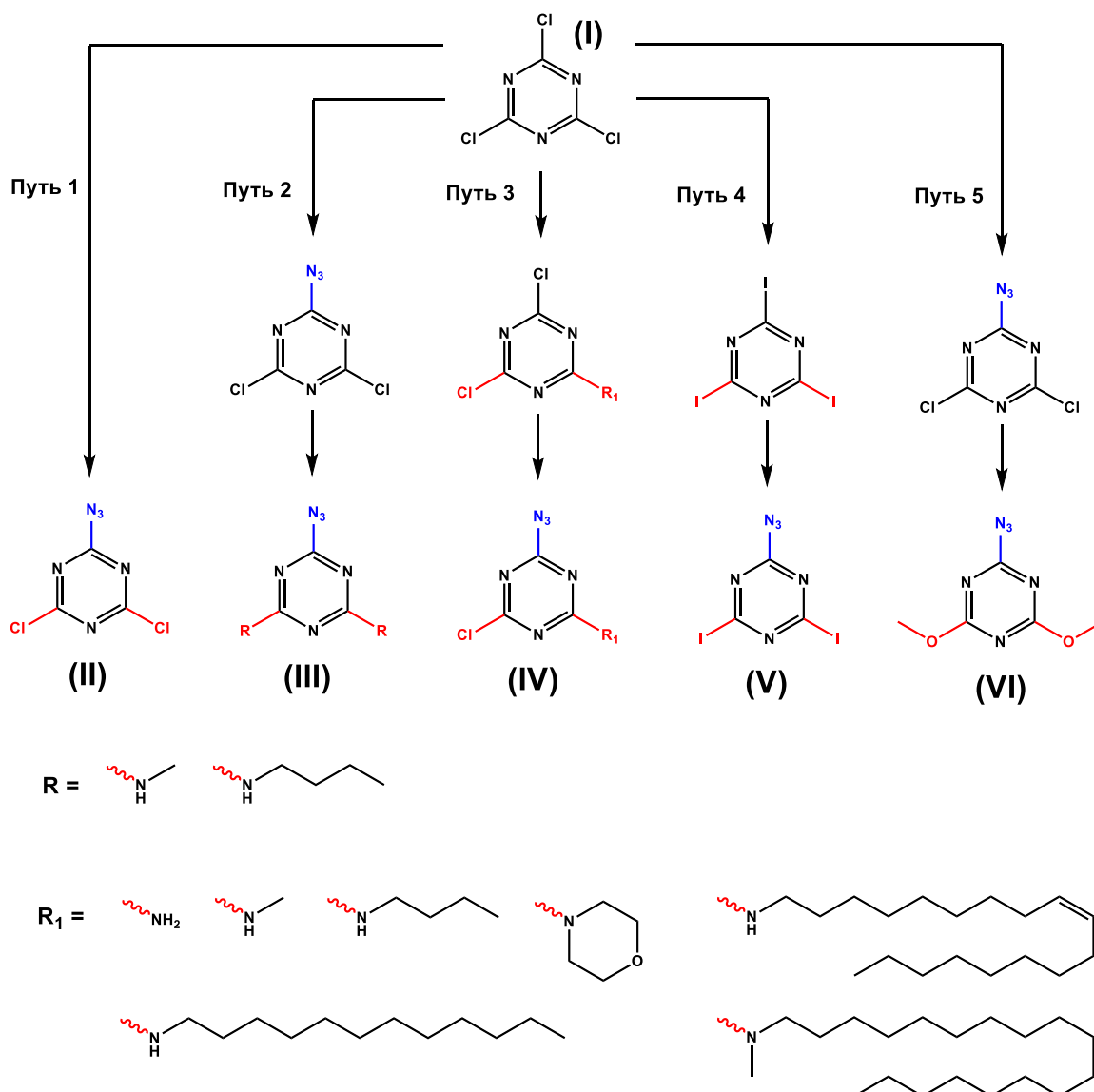


Рис. 47. Структура исходного соединения для получения азидо-триазинов в виде цианурхлорида (I), а также пути получения и структуры реагентов-модификаторов в виде 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (путь 1, соединение II), 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазина (путь 2, соединение III), 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина (путь 3, соединение IV), 2-азидо-4,6-дииодо-1,3,5-триазина (путь 4, соединение V), 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина (путь 5, соединение VI). Снизу указаны заместители в составе конкретных реагентов-модификаторов типа 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазинов (R) и 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов (R₁).

Все из указанных выше азидов были очищены и охарактеризованы методами ¹H ЯМР, ¹³C ЯМР и ИК-спектроскопии или их совокупностью, что позволило четко установить структуру получаемых соединений (см. раздел 3.2.2). Стоит отметить, что наибольшие выходы были достигнуты при синтезе азидов типа 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов. Данный факт можно объяснить возможностью строго температурного контроля всех стадий синтеза, что снижает возможность образования побочных продуктов избыточного замещения в триазиновом осто́ве.

4.2.2 Общие структуры триазиниламидофосфатных групп, полученных с применением различных 2-азидо-1,3,5-триазинов

Как уже было отмечено выше, итоговая структура триазиниламидофосфатной группы в составе олигонуклеотида содержит два заместителя в виде остатков алкиламинов, присоединенных к триазиновому остову (см. Рис. 46б). При использовании азидо-триазинов разных типов, пути получения такой структуры будут несколько отличаться. Так, например, при получении триазиниламидофосфатной группы с использованием 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина на первом этапе после проведения реакции Штаудингера образуется хлор-содержащий интермедиат, в состав которого далее вводят остатки алкиламинов (Рис. 48, путь 1). Возможность замещения атомов хлора в составе интермедиата обусловлена их высокой реакционной способностью, что согласуется с литературными данными [203]. Реагенты типа 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазинов уже содержат в своем составе необходимые заместители, поэтому получение триазиниламидофосфатной группы с использованием таких реагентов протекает всего в одну стадию (Рис. 48, путь 2). Введение в состав олигонуклеотида реагентов в виде 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов подразумевает замещение второго атома хлора в триазиновом остове с получением в том числе и несимметрично замещенных триазиниламидофосфатных групп, несущих две разные функциональные группы (Рис. 48, путь 3). Использование 2-азидо-4,6-дииодо-1,3,5-триазина и 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина для получения триазиниламидофосфатов по аналогии с хлор-содержащими реагентами подразумевает замещение атомов иода и метокси-групп в триазиновом остове на алкиламиногруппы, что также ранее было описано в литературе [204, 205] (Рис. 48, путь 4 и 5).

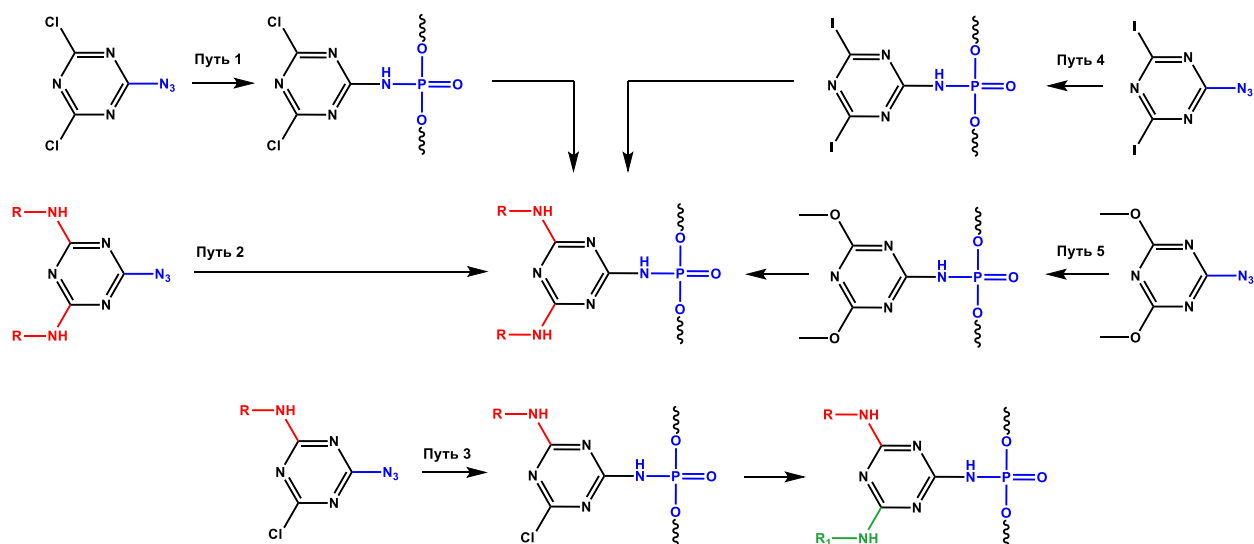


Рис. 48. Пути получения триазиниламидофосфатных групп в составе олигонуклеотидов, несущих два остатка алкиламина, с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (путь 1), 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазина (путь 2), 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина (путь 3), 2-азидо-4,6-диiodo-1,3,5-триазина (путь 4), 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина (путь 5).

Таким образом, в рамках данной работы были синтезированы и охарактеризованы 12 различных азидо-триазинов пяти структурных типов (см. Рис. 47), и были предложены схемы их введения в состав олигонуклеотидов с получением триазиниламидофосфатных групп (см. Рис. 48). Для валидации предложенных схем далее были проведены модельные эксперименты с получением простейших представителей триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов, что также позволило оценить реакционную способность используемых модификаторов.

4.3. Оценка эффективности получения модельных триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов с применением различных 2-азидо-1,3,5-триазинов

В качестве модели для оценки реакционной способности азидо-триазинов была выбрана система на основе олиготимидилата, при этом модификация вводилась по ближайшему к 5'-концу межнуклеотидному фосфату. Выбор такой системы обусловлен несколькими факторами. Во-первых, при введении модификации по указанному положению минимизируется возможность какой-либо ее деградации под действием реагентов, используемых в амидофосфитном синтезе. В данном варианте модификация в составе олигонуклеотида претерпевает только обработку трихлоруксусной кислотой на этапе удаления диметокситритильной (DMTr-) защитной группы, и обработку концентрированным водным раствором метиламина на стадии деблокирования с

твердофазного носителя. Во-вторых, тимидилатные звенья не содержат экзоциклических аминогрупп, по которым может происходить присоединение триазинового остова [206], что минимизирует количество побочных продуктов. И в-третьих, отщепление олиготимидилатов от твердофазного носителя происходит достаточно быстро (водный раствор метиламина, 55°C, 15 минут), что позволяет ускорить исследование. В качестве модификации в итоговой структуре олигонуклеотида была выбрана простейшая триазиниламидофосфатная группа, содержащая остатки метиламина.

С использованием данной модельной системы была оценена реакционная способность различных типов азидо-триазинов, а также стабильность ядра модификации в составе олигонуклеотида.

4.3.1 Реакционная способность 2-азидо-1,3,5-триазинов

Методология получения триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов заключалась в следующем. Олиготимидилат синтезировали в автоматическом режиме до места введения модификации. В ходе присоединения последнего тимидилатного звена, синтез останавливали перед проведением стадии окисления для получения фосфит-триэфирного интермедиата (рис. 49, структура 1). Далее твердофазный носитель, содержащий олигонуклеотид с фосфит-триэфирной группой, переносили из реактора синтезатора в пробирку и проводили реакцию Штаудингера с применением соответствующего азидо-триазина вручную. Триазинилфосфазен, первоначально образующийся после протекания реакции Штаудингера (Рис. 49, структура 2), также в ручном режиме отмывали от избытка реагента-модификатора, после чего последовательно обрабатывали растворами (N,N-диизопропил-N-этил)амин (DIPEA) и различных алкиламинов с получением промежуточной триазиниламидофосфатной группы (Рис. 49, структура 3). После каждого из указанных этапов твердофазный носитель отмывали от избытка амина, затем переносили обратно в реактор и проводили процесс деблокирования DMTr-защитной группы. На финальном этапе олигонуклеотид отщепляли от твердофазного носителя путем обработки водным раствором метиламина с получением целевых триазиниламидофосфатов (рис. 49, структура 4).

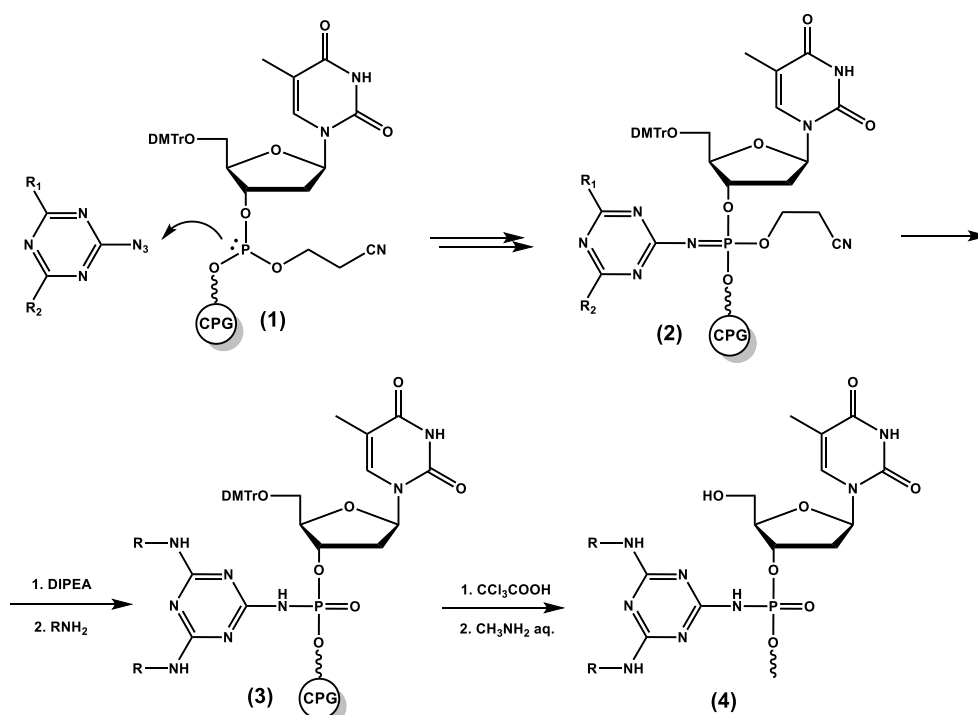


Рис. 49. Схема получения триазириламинофосфатных олиготимидилатов, содержащих модификацию по ближайшему к 5'-концу межнуклеотидному фосфату. R₁, R₂ – промежуточные заместители или алкиламиногруппы; R – функциональные заместители; CPG – твердофазный носитель (controlled pore glass); DMTr – 4,4'-диметокситритильная группа.

Обработка раствором DIPEA проводится для селективного перевода лабильного фосфазенового соединения в более стабильную амидофосфатную форму посредством β-элиминирования цианоэтильной группы, что является популярным приемом при получении модифицированных олигонуклеотидов по реакции Штаудингера [170, 173]. Стоит отметить, что отсутствие стадии β-элиминирования может привести к значительному падению выходов целевых олигонуклеотидов за счет гидролиза фосфазена. Например, при получении модифицированных олигонуклеотидов с применением 2-азидо-4,6-дииодо-1,3,5-триазина исключение этапа β-элиминирования снижает выход с 85% до 40% (см. Рис. 56б, раздел 4.3.2). По этой причине, данный этап был включен в синтетическую схему во всех случаях при оценке реакционной способности азидо-триазинов для получения наиболее достоверных результатов. Более подробно вопрос гидролитической стабильности фосфазенового звена рассмотрен в разделе 4.3.2.

Первоначально была изучена реакционная способность 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина. Для этого были синтезированы олигонуклеотиды состава 5'-Т*ТТТТ-3', где * – место введения модификации, а также контрольный немодифицированный пентатимидилат 5'-ТТТТТ-3' (олигонуклеотиды N-1, К). Учитывая акцепторный характер реагента-

модификатора за счет наличия в его составе атомов хлора, были выбраны достаточно мягкие условия реакции Штаудингера (0.1М концентрация азидо, 15 минут, 25°C). В данном случае остатки метиламина были введены в состав триазинового остова модификации в процессе деблокирования с твердофазного носителя водным раствором метиламина. После деблокирования, реакционные смеси олигонуклеотидов были проанализированы методом ОФ ВЭЖХ (Рис. 50). Как можно видеть, на хроматограмме олигонуклеотида N-1 присутствует один основной пик, отличающийся по подвижности от контроля К. С применением MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа было доказано, что основным продуктом реакционной смеси является целевой триазиламидофосфатный олигонуклеотид с двумя остатками метиламина в триазиновом остове (Рис. 50). Таким образом, по результатам проведенных анализов можно сделать вывод, что в выбранных условиях реакции Штаудингера 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазин практически количественно встраивается в состав олигонуклеотида с последующим замещением атомов хлора на метиламиногруппы, конверсия в целевой продукт превышает 90%.

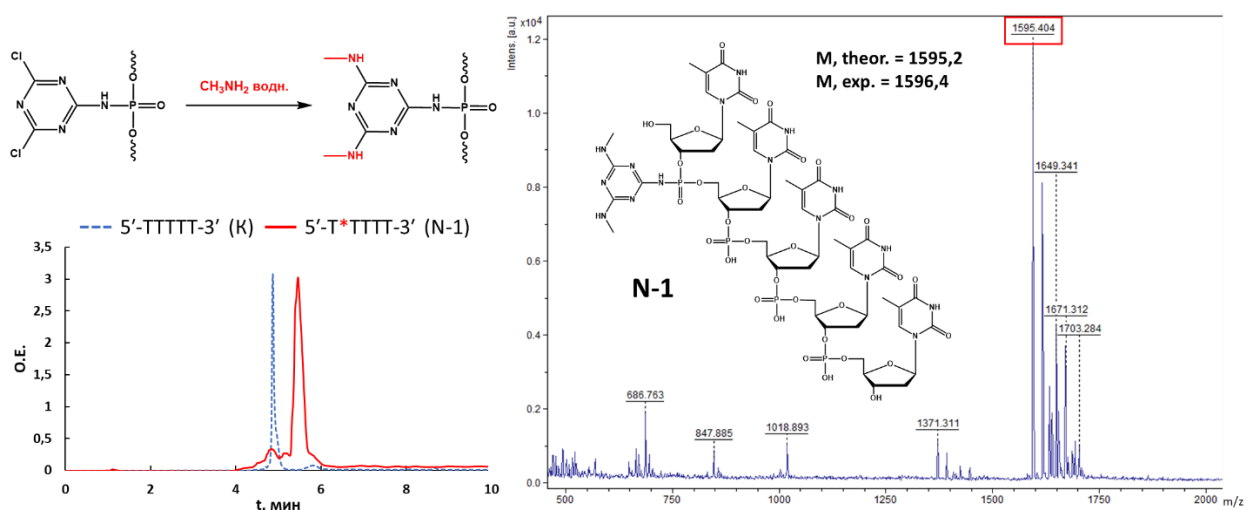


Рис. 50. Профили ОФ ВЭЖХ реакционной смеси пентатимидилата после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином (0.1М, 15 минут, 25°C) и введения остатков метиламина (N-1), и контрольного пентатимидилата (К) (слева) и фрагмент MALDI-TOF масс-спектра олигонуклеотида N-1 (справа). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-90% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе TEA*АсОН, $\lambda = 260$ нм.

Стоит также отметить характерное для триазиламидофосфатных олигонуклеотидов изменение времени выхода с колонки по сравнению с немодифицированным олигонуклеотидом. Введение модификации приводит к нейтрализации заряда одной из фосфатных групп олигонуклеотида, что повышает его гидрофобность и усиливает эффективность взаимодействия с неподвижной фазой колонки. Как следствие, время

удерживания триазириламидофосфатного олигонуклеотида увеличивается и достоверно отличается от времени удерживания контрольного олигонуклеотида, что позволяет оценивать конверсию по профилю ОФ ВЭЖХ с высокой точностью.

Реакционная способность реагентов типа 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазина была изучена на примере азида, содержащего два остатка метиламина; модификация была введена в олиготимидилат последовательности 5'-Т*ТТТТТТТ-3' (октатимидилат). Для прямого сравнения данного реагента с 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином с точки зрения реакционной способности, условия реакции были выбраны идентичными (0.1М, 15 минут, 25°C; олигонуклеотид N-2). Анализ ОФ ВЭЖХ реакционной смеси показал, что в данном случае конверсия в целевой продукт не превышает 15% (Рис. 51, N-2). Такое падение выходов целевого продукта может быть объяснено донорной природой остатков метиламина, входящих в состав азидо-триазина, что в значительной мере замедляет протекание реакции Штаудингера. Для оценки возможности увеличения выхода олигонуклеотида, параметры реакции Штаудингера постепенно повышали. После некоторой оптимизации было обнаружено, что 2-азидо-4,6-диметиламино-1,3,5-триазин может быть введен в состав олигонуклеотида с высокой эффективностью (90%), но только в достаточно жестких условиях (0.5М, 1 час, 65°C; олигонуклеотид N-3, Рис. 51).

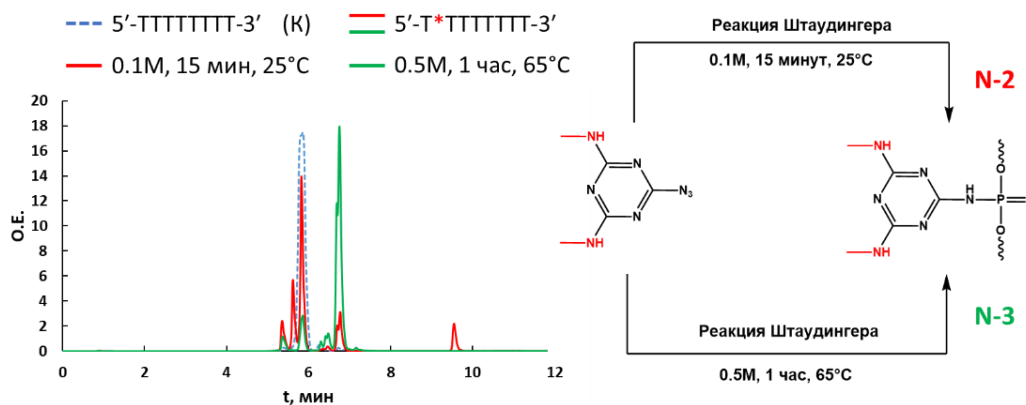


Рис. 51. Профили ОФ ВЭЖХ реакционной смеси октатимидилата после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-диметиламино-1,3,5-триазином в мягких (0.1М, 15 минут, 25°C; олигонуклеотид N-2) и жестких (0.5М, 1 час, 65°C; олигонуклеотид N-3), и контрольного октатимидилата (К). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-45% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе TEA*AcOH, $\lambda = 260$ нм

Далее была проведена оценка реакционной способности третьего типа реагентов-модификаторов на примере 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина. В данном случае второй остаток метиламина был введен в состав модификации на этапе финального деблокирования; модификация вводилась в октатимидилат. На основании уже имеющихся данных о реакционной способности азидо-триазинов, содержащих донорные и

акцепторные группы, было высказано предположение, что 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазин будет обладать промежуточной реакционной способностью по сравнению с уже изученными реагентами. Действительно, при проведении реакции Штаудингера с указанным реагентом в мягких условиях (0.1M, 15 минут, 25°C; олигонуклеотид N-4), конверсия в целевой продукт составила порядка 50% (Рис. 52).

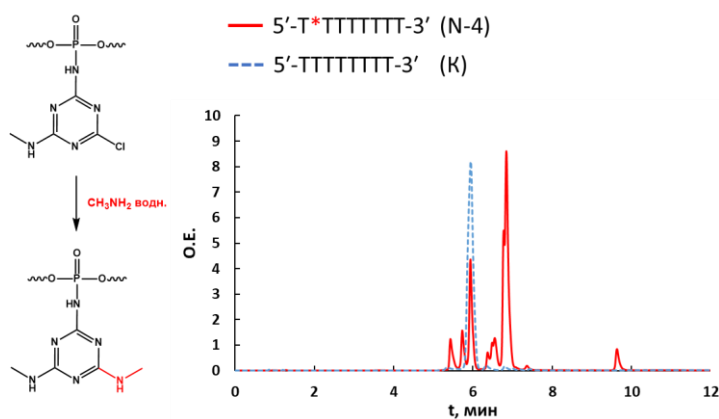


Рис. 52. Профили ОФ ВЭЖХ реакционной смеси октатимидилата после реакции Штаудингера с 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазином (0.1M, 15 минут, 25°C) и введения остатков метиламина (N-4), и контрольного октатимидилата (K). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-45% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02M водном растворе TEA*AcOH, $\lambda = 260$ нм.

На следующем этапе была оценена реакционная способность 2-азидо-4,6-дииодо-1,3,5-триазина; модификация также вводилась в состав октатимидилата, остатки метиламина, по аналогии с хлор-содержащими реагентами, были введены на этапе финального деблокирования (олигонуклеотид N-5). Атомы иода являются более донорными группами по сравнению с атомами хлора, в связи с чем ожидалось падение выходов целевого олигонуклеотида. Тем не менее, при использовании иод-содержащего реагента в стандартных мягких условиях (0.1M, 15 минут, 25°C) конверсия в целевой продукт снизилась незначительно и составила около 85% (Рис. 53). Замещение атомов иода на метиламиногруппы было подтверждено методом электрофореза в ПААГ (Рис. 53). Основной олигонуклеотид из реакционной смеси N-5 и контрольный олигонуклеотид, полученный с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (K-Tr), обладают одинаковой подвижностью, и при этом достоверно отличаются от немодифицированного октатимидилата ($\mu = 0,85$ для N-5 и K-Tr против $\mu = 0,95$ для K).

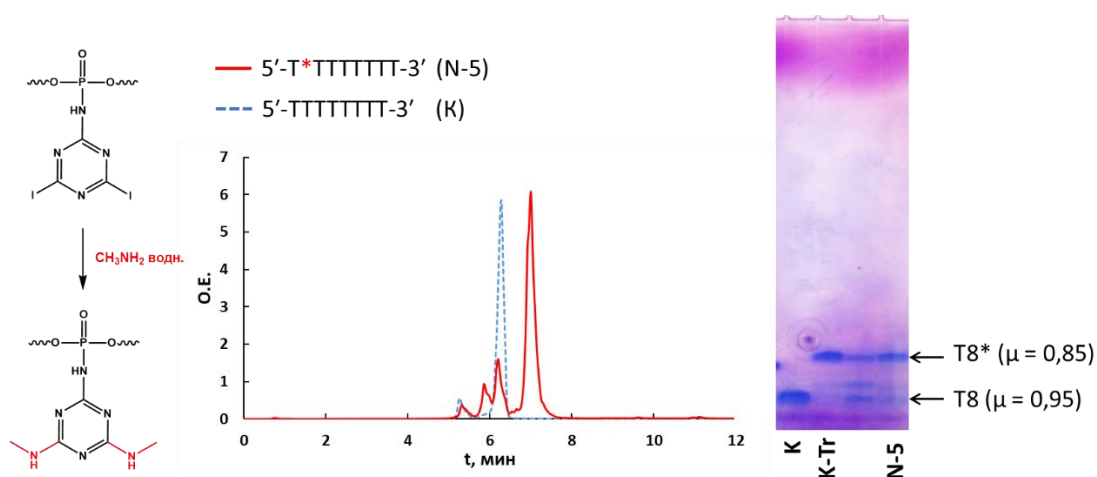


Рис. 53. Профили ОФ ВЭЖХ реакционной смеси октатимидилата после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-диiodо-1,3,5-триазином (0.1М, 15 минут, 25°C) и введения остатков метиламина (N-5), и контрольного октатимидилата (К) (слева) и фрагмент электрофоретического профиля для олигонуклеотидов К, К-Tr (контроль, полученный с использованием 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина) и N-5 (справа).

Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-45% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе TEA*AcOH, $\lambda = 260$ нм.

Наконец, была определена реакционная способность 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина. При введении модификации в состав октатимидилата в мягких условиях (0.1М, 15 минут, 25°C), выход модифицированного олигонуклеотида составил 15% (Рис. 54а, олигонуклеотид N-6); при этом в жестких условиях (0.25М, 1 час, 55°C) выход удалось повысить до 60% (Рис. 54а, олигонуклеотид N-7). Полученные данные согласуются с предыдущими – введение донорных остатков метанола в состав азидо-триазина в значительной мере снижает его реакционную способность. При проведении дополнительного анализа по подтверждению замещения метоксигрупп были получены неожиданные результаты. Согласно масс-спектру олигонуклеотида N-7, основным продуктом реакционной смеси является триазиниламидофосфатное производное с остатками метанола (Рис. 54б). Полученные результаты указывают на то, что в условиях деблокирования с твердофазного носителя замещения метоксигрупп в триазиновом остове не происходит, что противоречит литературным данным [205]. Кроме того, было установлено, что основным побочным продуктом в реакционной смеси является семизвенный гептатимидилат, что указывает на специфический характер деградации модифицированного звена в случае использования 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина в качестве реагента-модификатора (подробнее см. в разделе 4.3.2). В связи с указанными факторами, ограничивающими функционализацию триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов, данный реагент не был использован в дальнейшей работе.

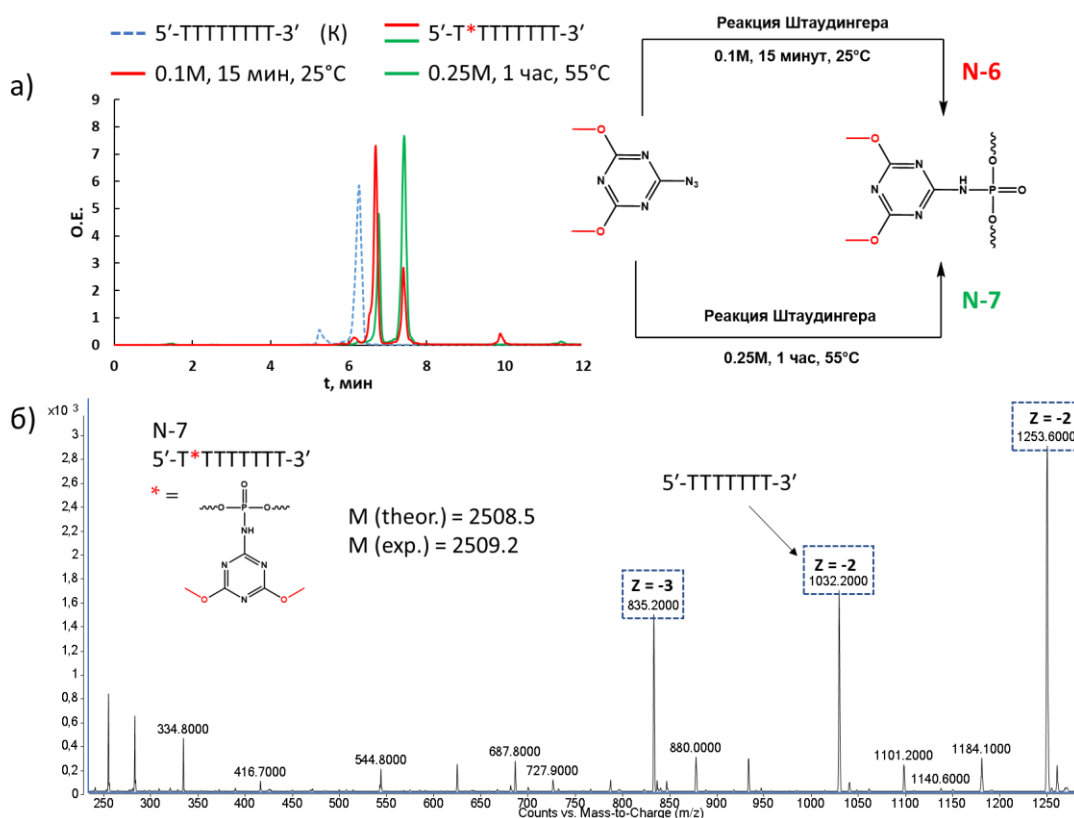


Рис. 54. Профили ОФ ВЭЖХ реакционной смеси октатимидилата после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазином в мягких (0.1M, 15 минут, 25°C; олигонуклеотид N-6) и жестких (0.25M, 1 час, 55°C; олигонуклеотид N-7) условиях, и контрольного октатимидилата (K) (а) и фрагмент ESI-MS масс-спектра олигонуклеотида N-7 (б). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-45% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02M водном растворе TEA*AcOH, $\lambda = 260$ нм.

Исходя из полученных данных, для реагентов-модификаторов, содержащих в составе триазинового остова атомы хлора и остатки алкиламинов, можно провести корреляцию между реакционной способностью, обуславливающей эффективность модификации, и относительными донорно-акцепторными свойствами. Так, в одинаковых мягких условиях реакции Штаудингера, эффективность введения модификации уменьшалась в ряду реагентов, содержащих следующие группы: $2 \times -\text{Cl} > 1 \times -\text{Cl}$, $1 \times -\text{NHCH}_3 > 2 \times -\text{NHCH}_3$. Таким образом, в большинстве дальнейших экспериментов, подразумевающих введение и варьирование двух функциональных групп в составе триазириламинофосфатной модификации, был использован максимально реакционноспособный 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазин. Стоит отметить, что азидо-триазин, содержащий атомы иода в триазиновом остова, обладающий схожей реакционной способностью, не был использован в дальнейшей работе в связи с его более затруднительным синтезом.

4.3.2. Стабильность модифицированного звена олигонуклеотида

4.3.2.1. Влияние этапа β -элиминирования на эффективность получения триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов

Как уже было отмечено выше, методология синтеза триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов включает отдельный этап β -элиминирования защитной цианоэтильной группы в составе триазинилфосфазенового звена с применением раствора DIPEA. В результате данной стадии, лабильный фосфазен, способный гидролизоваться в водных щелочных условиях до фосфатной группы и амина [170, 172, 207], переходит в более стабильную амидофосфатную форму. В случае исключения отдельного этапа β -элиминирования, удаление цианоэтильной защитной группы при модифицированном звене происходит в процессе отщепления олигонуклеотида от твердофазного носителя при обработке водным раствором метиламина, которая также может привести и к гидролизу фосфазена (Рис. 55).

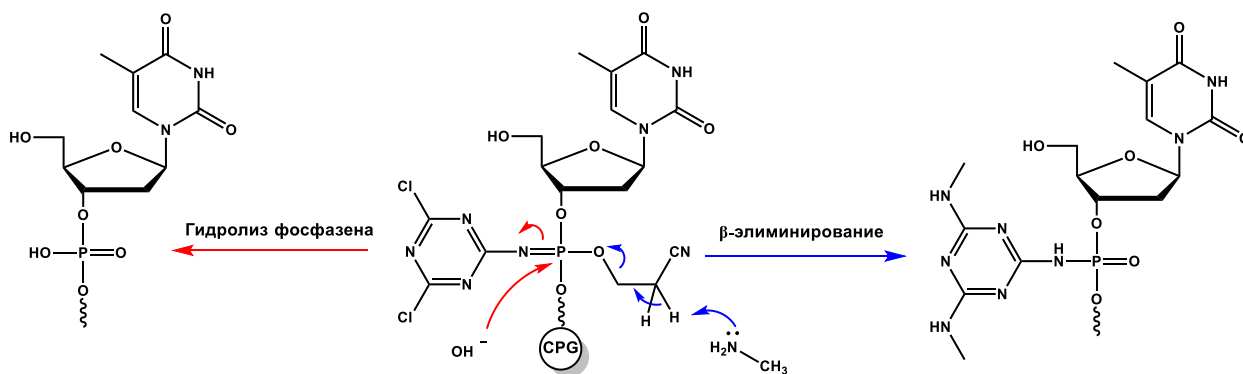


Рис. 55. Пути преобразования фосфазенового звена в ходе отщепления с твердофазного носителя при обработке водным раствором метиламина на примере олиготимидилата, модифицированного 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином по ближайшему к 5'-концу межнуклеотидному фосфату. Красными стрелками показан процесс гидролиза фосфазеновой связи, синими стрелками – процесс β -элиминирования. CPG – твердофазный носитель (controlled pore glass).

Для оценки степени подверженности триазинилфосфазенов к гидролизу был синтезирован ряд олиготимидилатов с использованием реакционноспособных 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина и 2-азидо-4,6-дииодо-1,3,5-триазина в качестве реагентов-модификаторов. С применением каждого из реагентов было синтезировано два варианта олигонуклеотидов. В первом варианте после получения триазинилфосфазена проводили отдельный этап β -элиминирования, после чего деблокировали с CPG водным раствором метиламина. Во втором варианте триазинилфосфазеновый олигонуклеотид деблокировали сразу после получения. По результатам анализа методом ОФ ВЭЖХ можно утверждать, что в случае каждого из реагентов исключение отдельного этапа β -элиминирования приводит к

падению выходов целевого продукта (Рис. 56). При этом, хлор-содержащий триазирилфосфазен гидролизуется с меньшей эффективностью по сравнению с иод-содержащим аналогом – в первом случае наблюдается уменьшение количества целевого олигонуклеотида в реакционной смеси с 90% до 75% (Рис. 56а; олигонуклеотиды N-1, N-8), а во втором – с 85% до 40% (Рис. 56б; олигонуклеотиды N-5, N-9). Такие различия в гидролитической стабильности триазирилфосфазенов могут быть связаны с различным акцепторным характером галогенов в триазиновом остоле – при протекании β -элиминирования триазирилфосфазен, содержащий атомы хлора, является более хорошей уходящей группой в сравнении с иод-содержащим аналогом. Как следствие, в ходе обработки фосфазена, полученного с использованием 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, водным раствором метиламина, образование амидофосфата происходит с большей вероятностью, чем гидролиз фосфазена, а в случае олигонуклеотида, полученного с применением 2-азидо-4,6-диiodо-1,3,5-триазина – наоборот.

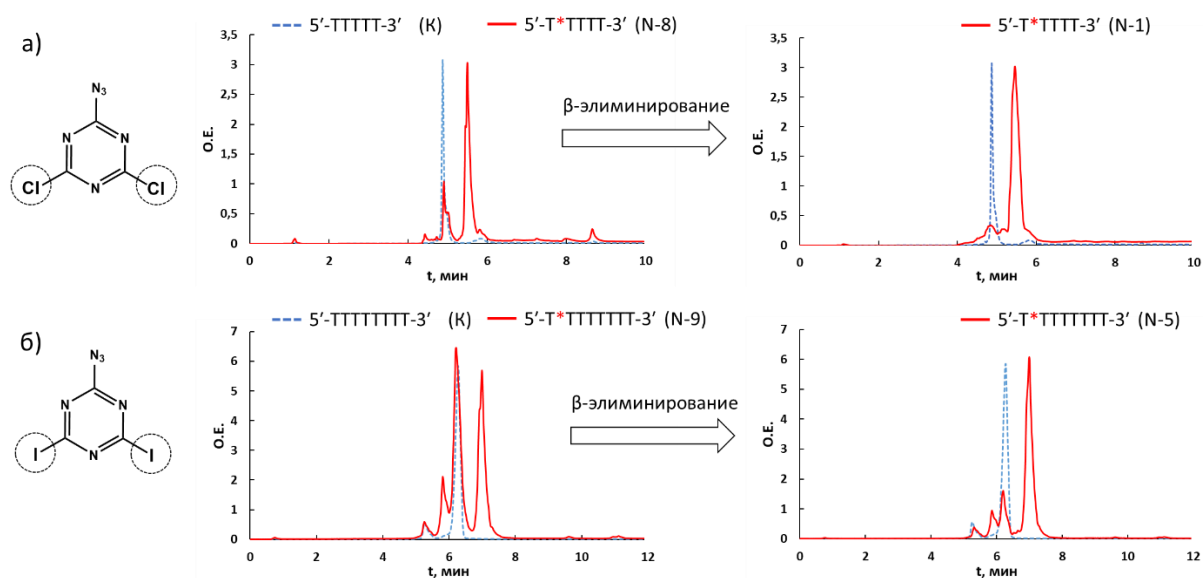


Рис. 56. Влияние этапа β -элиминирования на эффективность получения триазириламидофосфатных олигонуклеотидов с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (а) (олигонуклеотиды N-1 против N-8) и 2-азидо-4,6-диiodо-1,3,5-триазина (б) (олигонуклеотиды N-5 против N-9). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-90% (а) и 0-45% (б) ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм.

Таким образом, по результатам экспериментов была определена значимая роль предварительного элиминирования 2-цианоэтильной группы в повышении выходов триазириламидофосфатных олигонуклеотидов. В дальнейшем все функционализированные олигонуклеотиды, получаемые с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, были синтезированы с включением этапа β -элиминирования в синтетическую схему. При этом, значительная подверженность иод-содержащего

триазирилфосфазена к гидролизу послужила дополнительной причиной для исключения 2-азидо-4,6-диiodo-1,3,5-триазина в качестве реагента-модификатора из дальнейшей работы.

4.3.2.2. Варианты деградации триазирилфосфазеновой группы и заместителей в ее составе

Для более детального исследования гидролитической стабильности триазирилфосфазенового звена был проведен ряд дополнительных экспериментов с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина в качестве реагента-модификатора на пентатимидилатной системе. В частности, была показана возможность полного гидролиза фосфазеновой связи при обработке олигонуклеотида водой в жестких условиях (12 часов, 55°C). При анализе электрофоретической подвижности олигонуклеотида было обнаружено, что единственным продуктом в реакционной смеси является немодифицированный пентатимидилат (Рис. 57а, олигонуклеотиды К и N-10, подвижность $\mu = 0,78$). Примечательно, что для полного гидролиза фосфазена, реакцию необходимо проводить достаточно длительное время – при менее жестких условиях (30 минут, 55°C) гидролизуется менее 10% фосфазена (данные не приведены).

Помимо стабильности фосфазеновой связи, дополнительно была оценена стабильность амидофосфатной связи, образуемой после элиминирования 2-цианоэтильной группы, до отщепления олигонуклеотида от твердофазного носителя. Было показано, что при обработке такого интермедиата водой в идентичных жестких условиях (12 часов, 55°C) амидофосфатная связь не подвергается гидролизу, однако атомы хлора в триазиновом остоле замещаются на гидроксильные группы (Рис. 57а, олигонуклеотид N-11), что было подтверждено масс-спектрометрическим анализом (Рис. 57б). Электрофоретический анализ выявил в реакционной смеси наличие одного олигонуклеотидного продукта, обладающего промежуточной подвижностью по сравнению с триазириламидофосфатным олигонуклеотидом с двумя остатками метиламина и немодифицированным пентатимидилатом, при этом подвижность смещена к последнему (Рис. 57а, олигонуклеотиды К ($\mu = 0,78$), N-1 ($\mu = 0,56$), N-11 ($\mu = 0,72$)). Исходя из полученных данных было предположено, что в буферных условиях электрофореза (pH = 8,3) олигонуклеотид N-11 обладает отрицательным зарядом в связи с депротонированием одной из гидроксильных групп.

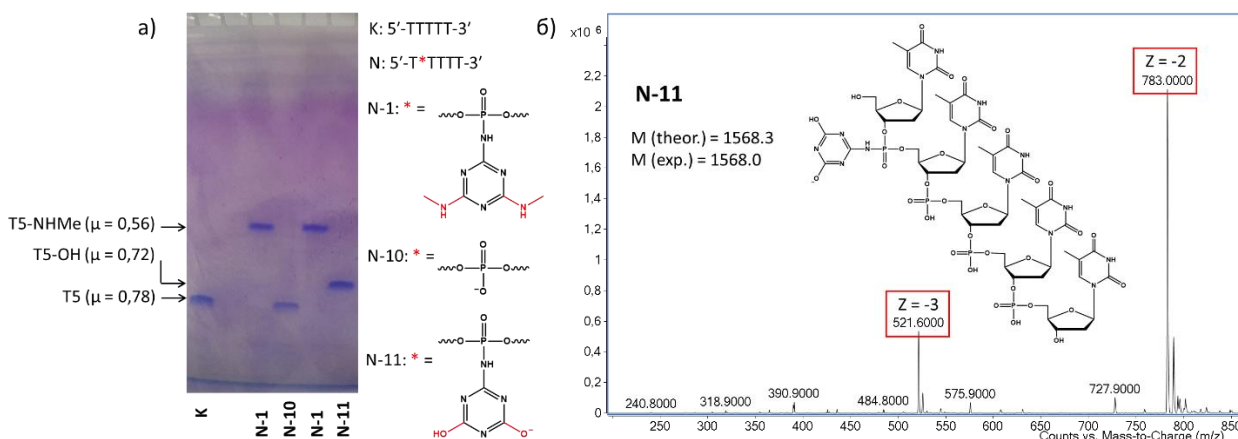
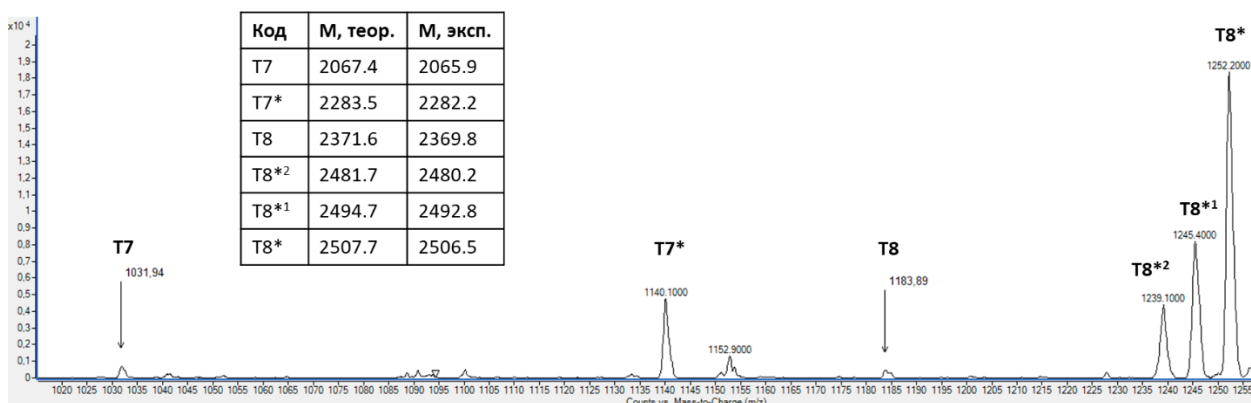


Рис. 57. Электрофоретический профиль олигонуклеотида К (контрольный пентатимидилат) и пентатимидилатов, модифицированных 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином, несущим остатки метиламина (N-1), гидроксильные группы (N-11), а также пентатимидилата, полученного после гидролиза триазирилфосфазена (N-10) (а), и фрагмент ESI-MS масс-спектра олигонуклеотида N-11.

В ходе экспериментов по изучению стабильности фосфазеновой связи было также обнаружено, что все эфирные связи в составе триазирилфосфазеновой группы могут быть подвержены гидролизу. В случае предварительной обработки хлор-содержащего фосфазенового звена в составе октатимидилата нуклеофильными компонентами кэпирующего раствора амидофосфитного синтеза (смесь пиридина и N-метилимидазола в ТГФ) и последующем деблокировании с твердофазного носителя образуется широкий набор продуктов (олигонуклеотид N-12). Масс-спектрометрический анализ показал наличие в реакционной смеси целевого олигонуклеотида (T8*), немодифицированного октатимидилата (T8), укороченного гептатимидилата (T7), укороченного гептатимидилата с концевой модифицированной фосфатной группой (T7*), а также триазириламидофосфатных олигонуклеотидов, несущих одну (T8*¹) или две (T8*²) гидроксильных группы в триазиновом остова (Рис. 58а). Образование стандартных продуктов в виде целевого триазириламидофосфата (T8*) и немодифицированного олигонуклеотида (T8) происходит под действием β -элиминирования и гидролиза фосфазеновой связи соответственно. В то же время, наблюдение укороченных олигонуклеотидов (T7* и T7) может быть объяснено только разрывом эфирных связей, соединяющих фосфазеновую группу с нуклеозидами (Рис. 58б). Вероятно, наличие таких продуктов обусловлено усилением акцепторного характера триазинового остова за счет замещения атомов хлора на положительно заряженные остатки пиридина или N-метилимидазола, что в целом увеличивает электрофильность системы. Формирование такого интермедиата также может обуславливать наличие гидроксил-содержащих продуктов (T8*¹, T8*²), получающихся за счет гидролиза активных групп (Рис. 58б).

a)



б)

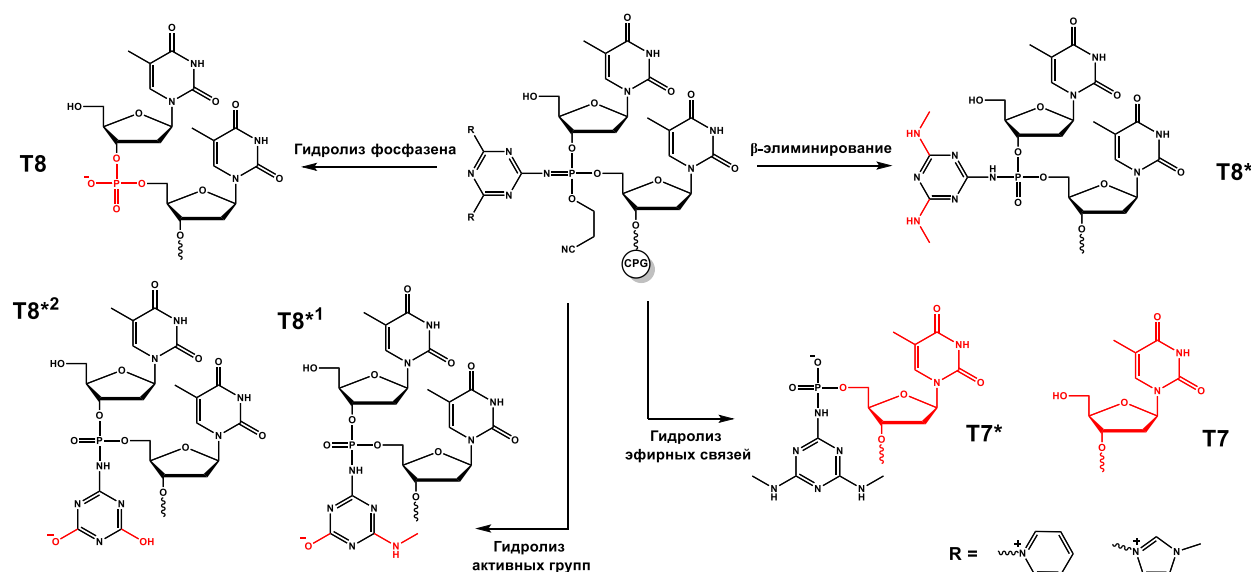


Рис. 58. Фрагмент ESI-MS масс-спектра в виде области двухзарядных ионов для реакционной смеси октатимидилата после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином (0.1M, 15 минут, 25°C) и обработки кэпирующим раствором в рамках амидофосфитного синтеза (олигонуклеотид N-12) (а) и предполагаемые пути гидролиза активированного триазирилфосфазена (б).

По результатам проведенных экспериментов можно заключить, что фосфазеновое ядро модификации в значительной степени подвержено гидролизу с различными вариантами деградации. В то же время, амидофосфатная форма модификации гораздо более стабильна, и при обработке соответствующего олигонуклеотида водой или водным раствором метиламина разрывов связей при фосфатной группе модификации не происходит. Однако, в тех же условиях атомы хлора в триазиновом остоле могут быть замещены на гидроксильные остатки, что может препятствовать введению целевых алкиламиногрупп в состав модификации. Как следствие, при получении функционализированных олигонуклеотидов в дальнейшей работе были использованы растворы аминов с минимальным присутствием воды.

4.4. Разнообразие функциональных групп в составе триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов

4.4.1. Получение функционализированных олигонуклеотидов с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина

Возможность получения широкого разнообразия представителей класса триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина основана на использовании так называемой прекурсорной стратегии. После проведения реакции Штаудингера и дальнейшего β -элиминирования образуется промежуточное соединение в форме амидофосфата, содержащее атомы хлора в триазиновом остове. Данный интермедиат является прекурсором для всех триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов – путем замены раствора амина на последующей стадии замещения атомов хлора возможно гибкое варьирование вводимых функциональных остатков. Упрощенная синтетическая схема варьирования функциональных групп с обозначением прекурсора представлена на Рис. 59.

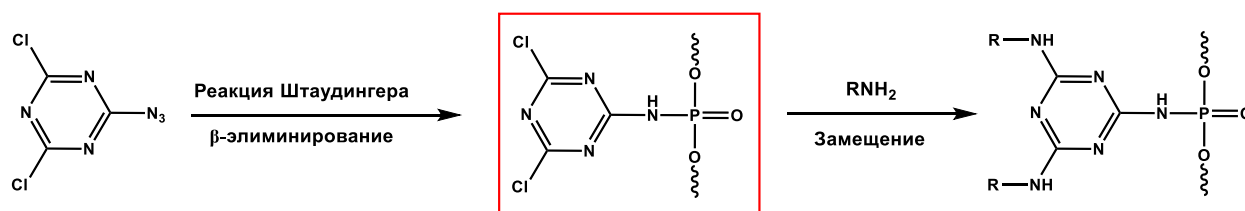


Рис. 59. Упрощенная синтетическая схема получения функционализированных триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов с использованием 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина.

Красной рамкой обозначен общий хлор-содержащий триазиниламидофосфатный прекурсор. R – функциональный заместитель.

С применением указанной синтетической схемы был получен широкий набор триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов, несущих функциональные заместители различной природы. Основной упор в данной работе был сделан на введении гидрофобных и катионных заместителей, поскольку наличие таких групп в составе олигонуклеотида позволяет увеличить эффективность его проникновения в клетки, что является важным аспектом, определяющим терапевтический потенциал НК-производного [7, 208, 209]. Кроме того, с применением предложенной стратегии была исследована возможность введения дополнительных гидроксильных групп, часто используемых в качестве точек ветвления олигонуклеотидов [210, 211].

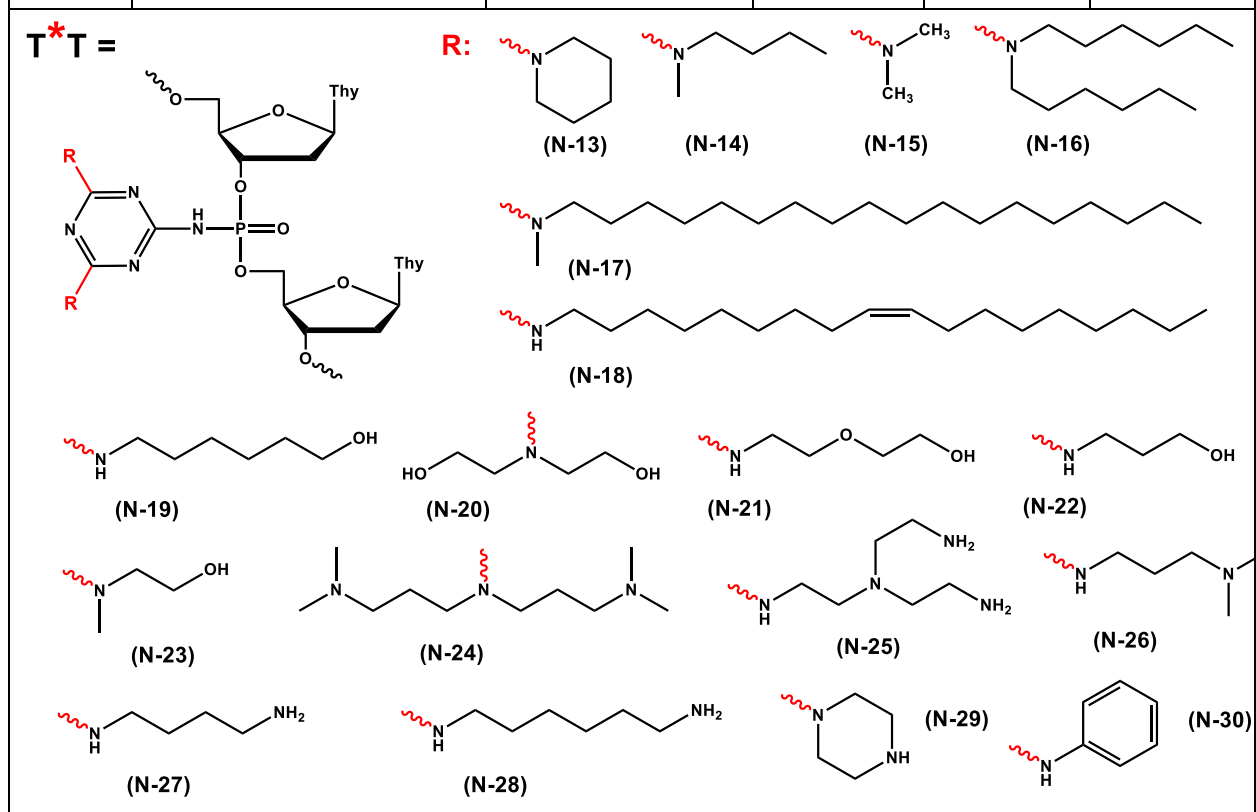
4.4.1.1. Одностадийное введение заместителей в триазиновый остов

Для оценки эффективности введения различных алкиламиногрупп в состав триазинового остова модификации, были синтезированы модифицированные олиготимидилаты. В самом простом варианте реализации предложенной синтетической схемы было проведено одностадийное введение целевых алкиламиногрупп в состав прекурсора с последующим остаточным синтезом олигонуклеотида. Вводимые группы отличались по таким параметрам, как длина алифатического остатка (например, (N-метил-N-бутил)амин и (N-метил-N-октадецил)амин), присутствие или отсутствие ненасыщенных углеводородных групп (например, (N-метил-N-октадецил)амин и олеиламин), а также по типу амина (первичный или вторичный, например, 3-аминопропанол-1 и 2-(N-метил)этаноламин; алифатический или ароматический, например, пиперидин и анилин). Полный перечень полученных олигонуклеотидов с указанием степени конверсии в целевой продукт и условий введения заместителей приведены в Табл. 1. Стоит отметить, что для всех производных был проведен масс-спектрометрический анализ, который подтвердил наличие в реакционной смеси олигонуклеотидов соответствующей структуры.

Табл. 1. Структуры полученных триазиламидофосфатных олигонуклеотидов, содержащих различные функциональные остатки, выходы целевых производных и условия введения остатков аминов. Условия 1 = 10% об. Раствор в сухом ацетонитриле, 1 час, 25°C; Условия 2 = 50% об. раствор в сухом ацетонитриле, 30 минут, 25°C; Условия 3 = 40% масс. водный раствор, 15 минут, 55°C; Условия 4 = 2 М раствор в сухом пиридине, 30 минут, 55°C; Условия 5 = 1.5 М раствор в сухом ацетонитриле, 1 час, 55°C; Условия 6 = 5% об. раствор в смеси ацетон/ацетонитрил 1:1, 1 час, 55°C; Условия 7 = 62.5% об. раствор в сухом ацетонитриле, 1 час, 25°C; Условия 8 = 2 М раствор в сухом хлороформе, 2 часа, 25°C.

Код	Последовательность (5'→3')	Условия обработки амином	Выход, %	М (теор.)	М (эксп.)
N-13	T*TTTT*T	Условия 1	~80	2250.7	2250.8
N-14	T*TTTTT	Условия 2	~50	2010.5	2010.6
N-15	T*TTTTT	Условия 3	~40	1926.4	1926.6
N-16	T*TTTT	Условия 1	~70	1902.7	1902.6
N-17	T*TTTT	Условия 4	~90	2098.9	2098.8
N-18	T*TTTT	Условия 4	~80	2066.9	2066.6
N-19	T*TTTTTTTTT	Условия 5	>95	3286.7	3287.7
N-20	T*TTTTTTTTT	Условия 6	>95	3262.7	3262.8
N-21	T*TTTTT	Условия 7	~90	2046.5	2046.4

N-22	T*TTTTTTTT	Условия 5	>95	3202.6	3203.6
N-23	T*TTTTT	Условия 1	~90	1986.5	1986.6
N-24	TTTT*T	Условия 1	~90	1906.7	1906.6
N-25	T*TTTTTTTTT	Условия 1	~90	3344.8	3345.0
N-26	T*TTTTT	Условия 1	>95	2040.5	2040.6
N-27	T*TTTTTTTTT	Условия 5	~90	3228.7	3229.6
N-28	T*TTTTTTTTT	Условия 5	~90	3284.8	3285.8
N-29	T*TTTTTTTTT	Условия 8	>95	3224.7	3225.6
N-30	T*TTTTTTT	Условия 5	~70	2630.5	2631.0



При анализе результатов эффективности введения заместителей в триазиновый остов можно заметить, что степень конверсии в целевые олигонуклеотиды практически во всех случаях превышает 70%, что указывает на высокую реакционную способность хлорсодержащего прекурсора. В то же время, в связи со значительно варьируемыми условиями реакции замещения, затруднительно провести надежную корреляцию между эффективностью введения остатка амина и его структурой. Так, например, два остатка протяженного дигексиламина могут быть введены с эффективностью 70% в достаточно мягких условиях (10% об. раствор амина в ацетонитриле, 1 час, 25°C; Табл. 1, олигонуклеотид N-16), в то время как более компактный диметиламин встраивается в триазиновый остов с меньшей эффективностью (40%) в более жестких условиях (40% масс.

раствор амина в воде, 15 минут, 55°C; Табл. 1, олигонуклеотид N-15). Тем не менее, для большинства производных были подобраны оптимальные условия введения остатков аминов, в том числе и протяженных алифатических, для обеспечения приемлемых выходов. Стоит отметить, в частности, олигонуклеотид, содержащий в триазиновом остове ароматические остатки анилина (Табл. 1, олигонуклеотид N-30), который был получен с хорошими выходами несмотря на крайне низкую нуклеофильность аминогруппы.

4.4.1.2. Поэтапная сборка заместителей в триазиновом остове

Помимо одностадийного введения алкиламиногрупп в триазиновый остов модификации, была показана возможность получения более сложных структур заместителей. Для этого была реализована стратегия поэтапной сборки на твердофазном носителе – после введения в триазиновый остатков алкиламинов, несущих определенные функциональные группы, иммобилизованный олигонуклеотид последовательно обрабатывали различными растворами с постепенным наращиванием цепи заместителя. Подобная стратегия модификации олигонуклеотидов применяется достаточно широко в связи с высокой эффективностью реакций, протекающих на твердофазном носителе [212–214]. В данной работе была показана возможность поэтапной сборки на примере наращивания цепи заместителей, содержащих первичные или вторичные аминогруппы, и гидроксильные группы; некоторые характерные примеры сборки приведены на Рис. 60. Так, например, к остаткам пиперазина в составе триазиниламидофосфатной группы, (Рис. 60, соединение I) были присоединены *n*-толуолсульфонильная (тозильная) группа через соответствующий сульфонилхлорид (N-31), а также остаток цианурхлорида с дальнейшим замещением атомов хлора на остатки метиламина или бутиламина (N-32, N-33). Первичные аминогруппы в составе остатков трис-(2-аминоэтил)амин, присоединенных к триазиновому остову (Рис. 60, соединение II) были модифицированы *O*-метилизомочевинной с получением гуанидиновых групп (N-35), а также уксусным ангидридом с получением ацетамида (N-37). К спиртовым гидроксильным группам 3-аминопропанола-1 (Рис. 60, соединение III) были присоединены тимидилатные звенья после проведения одного цикла автоматического синтеза (N-40). Кроме того, гидроксильная группа в составе 3-аминопропанола-1 была конвертирована в остаток алкиламина по механизму нуклеофильного замещения типа S_N2 путем последовательной активации гидроксильной группы тозилхлоридом и обработки промежуточного соединения пиперидином (N-39).

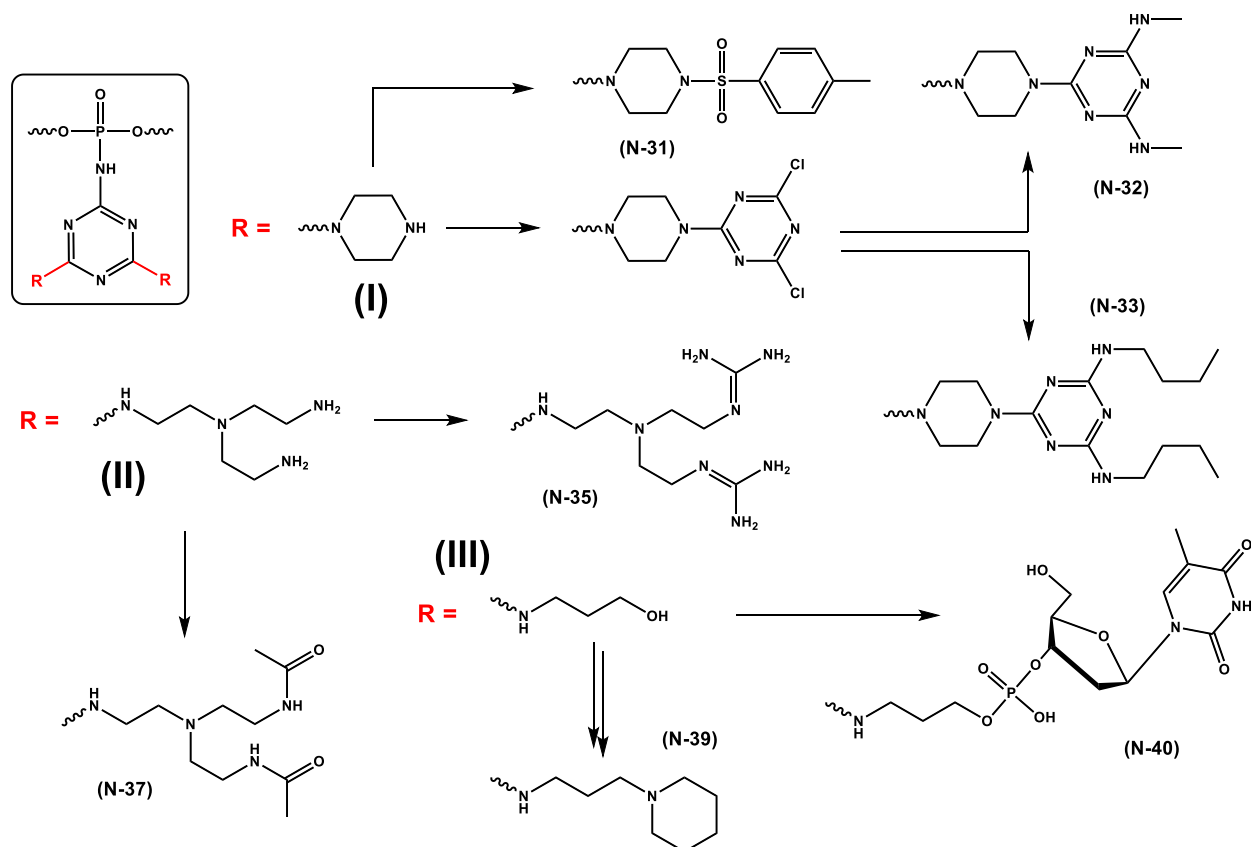


Рис. 60. Примеры поэтапной сборки сложных заместителей в составе триазинового остова из исходных остатков пиперазина (структура I), трис-(2-аминоэтил)амин (структура II) и 3-аминопропанола-1 (структура III).

Представленные схемы являются лишь некоторыми примерами поэтапной сборки. Полный список олигонуклеотидов с указанием последовательности обработок триазилиламидафосфатного прекурсора представлен в Табл. 2. Все полученные производные были проанализированы методом ESI-MS масс-спектрометрии, по данным которого можно утверждать, что все реакционные смеси олигонуклеотидов содержат целевые структуры. Стоит, однако, отметить, что в некоторых случаях при получении подобных олигонуклеотидов образуется множество побочных продуктов неполного протекания реакций при сборке заместителей. При этом, количество побочных продуктовкратно увеличивается при увеличении стадий сборки даже на один этап. Например, эффективность модификации остатка пиперазина тозилхлоридом (производное N-31) составляет порядка 90%, в то время как при введении в остаток пиперазина остатка цианурхлорида с последующим замещением атомов хлора на остатки алкиламинов (производные N-32, N-33) – около 50% (данные не приведены). Тем не менее, с учетом возможности широкого варьирования условий реакции обработки иммобилизованного олигонуклеотида, возможно проведение оптимизации сборки заместителей с увеличением выходов целевых продуктов.

Табл. 2. Список триазириламидофосфатных олигонуклеотидов, содержащих сложные заместители и этапы сборки заместителей. TsCl – *n*-толуолсульфонилхлорид, MeNH₂ – метиламин, BuNH₂ – бутиламин, трис-амин – трис-(2-аминоэтил)амин, DMI-Cl – (2-хлоро-1,3-диметил)имидазолидиния гексафторфосфат, CAP – кэпирующая смесь амидофосфитного синтеза (15% уксусного ангидрида в ТГФ), тимидилат – цикл присоединения тимидилатного звена, дитимидилат – два цикла присоединения тимидилатного звена.

Код	Последовательность	Этапы обработки	М (теор.)	М (эксп.)
N-31	5'-T*TTTTTTTTT-3'	Пиперазин → TsCl	3532.7	3533.4
N-32	5'-T*TTTTTTTTT-3'	Пиперазин → цианурхлорид → MeNH ₂	3498.8	3498.9
N-33	5'-T*TTTTTTTTT-3'	Пиперазин → цианурхлорид → BuNH ₂	3667.0	3667.8
N-34	5'-T*TTTTTTTTT-3'	Пиперазин → цианурхлорид → Пиперазин → TsCl	4335.0	4335.9
N-35	5'-T*TTTTT-3'	Трис-амин → О- метилизомочевина	2297.9	2297.6
N-36	5'-T*T-3'	Трис-амин → DMI-Cl	1296.7	1296.0
N-37	5'-T*TTTT-3'	Трис-амин → CAP	1992.6	1992.4
N-38	5'-T*TTTTTTTTT-3'	1,6-диаминогексан → TsCl	3592.8	3593.4
N-39	5'-T*T-3'	3-аминопропанол-1 → TsCl → пиперидин	904.4	905.4
N-40	5'-TT(T) ₂ *TTTTTT-3'	3-аминопропанол-1 → тимидилат	3202.6	3203.6
N-41	5'-TT(T) ₂ *TTTTTT-3'	6-аминогексанол-1 → тимидилат	3286.7	3287.6
N-42	5'-TTT(T) ₂ *TTTTT-3'	2-(2-аминоэтокси)этанол → дитимидилат	3870.8	3871.2

4.4.2. Получение функционализированных олигонуклеотидов с применением других 2-азидо-1,3,5-триазинов

Получение функционализированных олигонуклеотидов возможно и с применением других азидо-триазинов, в частности реагентов типа 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина. В данном случае возможно два варианта введения функциональных групп в

состав олигонуклеотида. В первом варианте желаемая функциональная группа находится в составе исходного реагента-модификатора. В данной работе такой вариант был реализован на примере получения триазириламидофосфатных пентатимидилатов с применением в качестве реагентов-модификаторов 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов, содержащих гидрофобные остатки додециламина, олеиламина и (N-метил-N-октадецил)амин. В соответствии с обнаруженными закономерностями по реакционной способности азидо-триазинов, для проведения реакции Штаудингера с указанными реагентами были выбраны несколько более жесткие условия по сравнению с таковыми 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином (0.1М концентрация азид, 2 часа, 25°C). По результатам ОФ ВЭЖХ анализа конверсия в целевой продукт в данных условиях составляет порядка 80% для додецил-содержащего олигонуклеотида (N-43) и порядка 60% для олигонуклеотидов с остатками олеиламина и (N-метил-N-октадецил)амин (N-44, N-45) (Рис. 61). Такая разница в выходах при переходе к более протяженным алифатическим остаткам может быть объяснена как усилением донорного характера соответствующих азидо-триазинов, так и стерическими затруднениями. Оба этих фактора снижают эффективность реакции Штаудингера. Как следствие, при работе с азидо-триазинами, содержащими объемные заместители, целесообразно повышать параметры реакции модификации.

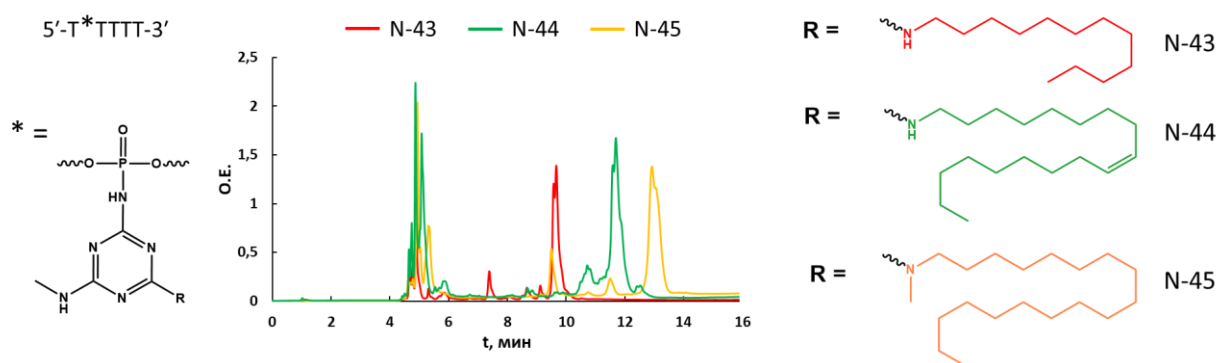


Рис. 61. Профили ОФ ВЭЖХ реакционных смесей пентатимидатов после реакции Штаудингера с 2-азидо-4-алкиламино-1,3,5-триазинами, содержащими остатки додециламина (N-43), олеиламина (N-44), (N-метил-N-октадецил)амин (N-45), в выбранных условиях (0.1М, 2 часа, 25°C). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-90% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм.

Второй вариант функционализации олигонуклеотидов по данному подходу подразумевает введение остатков алкиламинов в состав амидофосфатного прекурсора, полученного с применением подобных реагентов. Стоит отметить, что при использовании азидо-триазинов, содержащих в своем составе одну функциональную группу, и

последующем введении в состав прекурсора другой функциональной группы, возможно получение несимметрично замещенных триазиламидофосфатных производных. Данное обстоятельство является главным преимуществом указанного подхода к функционализации, позволяющим еще более тонко настраивать свойства олигонуклеотидов. В настоящей работе эффективность такого подхода была показана на примере получения олигонуклеотида, содержащий в одном триазиновом остове остатки гидрофобного додециламина и положительно заряженного (N,N-диметиламинопропил)амин (DMAPA) (N-46). По результатам ОФ ВЭЖХ реакционной смеси можно оценить эффективность встраивания остатка DMAPA в триазиновый остов додецил-содержащего прекурсора (Рис. 62). В выбранных условиях ВЭЖХ введение положительно заряженного остатка DMAPA уменьшает время удерживания додецил-содержащего олигонуклеотида (N-43) примерно на полминуты, что достоверно отличает оба производных по хроматографической подвижности. На профиле ВЭЖХ реакционной смеси олигонуклеотида N-46 практически отсутствует пик, соответствующий производному N-43, что свидетельствует о количественном встраивании остатка DMAPA в триазиновый остов модификации.

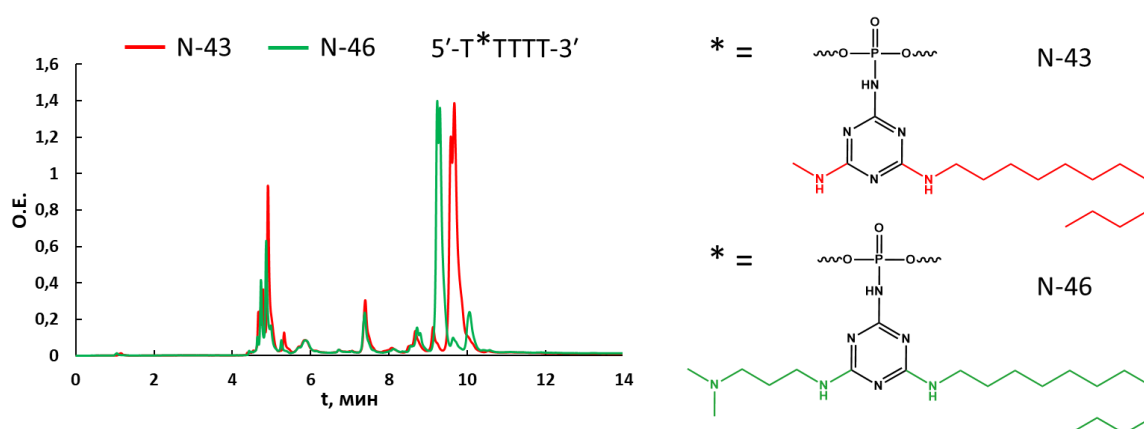


Рис. 62. Профили ОФ ВЭЖХ реакционных смесей пентатимидилатов после реакции Штаудингера с 2-азидо-4-додециламино-1,3,5-триазином, содержащими остатки додециламина и метиламина (N-43), додециламина и (N,N-диметиламинопропил)амин (N-46). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-90% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе TEA*AcOH, $\lambda = 260$ нм.

С применением азидо-триазинов типа 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазинов также возможно введение различных функциональных групп в состав олигонуклеотида. Такой подход гораздо менее предпочтителен в связи с необходимостью синтеза отдельного модификатора для каждой функциональной группы, а также низкой эффективностью реакции Штаудингера в данном варианте. Тем не менее в рамках данного подхода был

синтезирован один модификатор, несущий в своем составе остатки бутиламина, который далее был введен в состав пентатимидилата (олигонуклеотид N-47). По результатам ВЭЖХ анализа видно, что конверсия в целевой продукт не превышает 15% при очень жестких условиях реакции Штаудингера (0.5М раствор, 1 час, 65°C) (Рис. 63). При этом, как было показано выше, олигонуклеотид, содержащий в триазиновом остове менее протяженные остатки метиламина, в тех же условиях может быть получен с эффективностью более 90% (олигонуклеотид N-3, Рис. 63). Исходя из полученных результатов можно предположить, что при усложнении структуры заместителей, входящих в состав подобных реагентов-модификаторов, реакция Штаудингера будет протекать с еще более низкой эффективностью. Данное ограничение фактически исключает возможность широкого варьирования функциональных групп с применением указанного подхода.

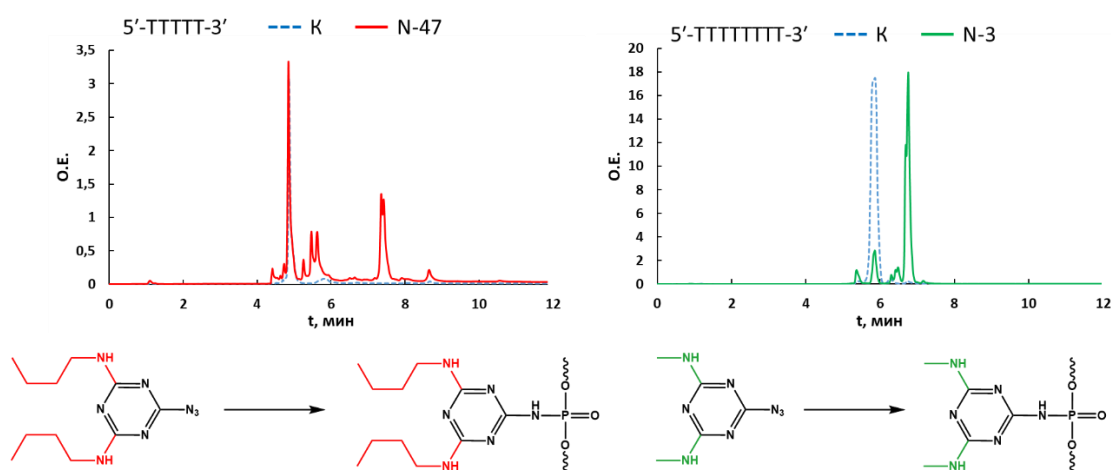


Рис. 63. Профили ОФ ВЭЖХ реакционных смесей пентатимидилата после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-дибутиламино-1,3,5-триазином и контрольного пентатимидилата (К и N-47, слева), и октатимидилата после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-диметиламино-1,3,5-триазином и контрольного октатимидилата (К и N-3, справа). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-90% (для К и N-47) или 0-45% (для К и N-3) ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм.

В рамках данного исследования с применением трех типов реагентов, содержащих в триазиновом остове различные комбинации атомов хлора и остатков алкиламинов, был получен широкий набор функционализированных триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов. Первый подход, основанный на применении 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, позволяет введение функциональных заместителей в состав активного амидофосфатного прекурсора, что во многом определяет его эффективность. Также применением данного подхода была реализована стратегия поэтапной сборки заместителей на твердофазном носителе с возможностью оптимизации реакций, что позволяет создавать НК-конструкции со сложными функциональными группами. Основным ограничением

данного подхода можно назвать невозможность введения двух различных функциональных групп в один триазиновый остов, что несколько снижает его гибкость. С другой стороны, при использовании подходящих 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов в рамках второго подхода возможно создание производных с несимметрично замещенным триазиновым остовом, несущим желаемую комбинацию функциональных групп. Наиболее прямолинейным, т.е. позволяющим введение двух функциональных групп в состав олигонуклеотида после проведения только реакции Штаудингера, можно назвать третий подход, основанный на использовании 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазинов. Данный подход, однако, в значительной мере ограничен в применении в связи с низкой реакционной способностью реагентов, падающей с усложнением структур заместителей.

Таким образом можно заключить, что разработанный химический инструментарий для функционализации олигонуклеотидов обладает высокой степенью универсальности.

4.5. Возможности и ограничения различных подходов к получению триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов

4.5.1. Получение гетероолигонуклеотидов с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина

Как уже было сказано ранее (раздел 4.3), одна из причин выбора олиготимидилатов как модельных систем при оценке реакционной способности азидо-триазинов и получении библиотеки триазиниламидофосфатов заключается в отсутствии экзоциклических аминогрупп в составе тимина, по которым могут протекать побочные реакции присоединения хлор-содержащих производных 1,3,5-триазина [206]. В рамках более детального исследования границ применимости разработанного подхода к модификации олигонуклеотидов 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином была рассмотрена возможность получения модифицированных гетероолигонуклеотидов. По стандартной методике (0.1M концентрация азиды, 15 минут, 25°C с последующим β -элиминированием) было получено два олигонуклеотида последовательностей 5'-T*ACGT-3' (N-48) и 5'-G*CGCCAAACAT-3' (N-49), содержащих простейшую триазиниламидофосфатную группу по ближайшему к 5'-концу межнуклеотидному фосфату. По результату ОФ ВЭЖХ (Рис. 64) было установлено, что в выбранных условиях реакции Штаудингера не происходит специфических побочных реакций вне зависимости от последовательностей олигонуклеотидов; пики побочных продуктов соответствуют стандартной частичной деградации фосфит-триэфирного звена.

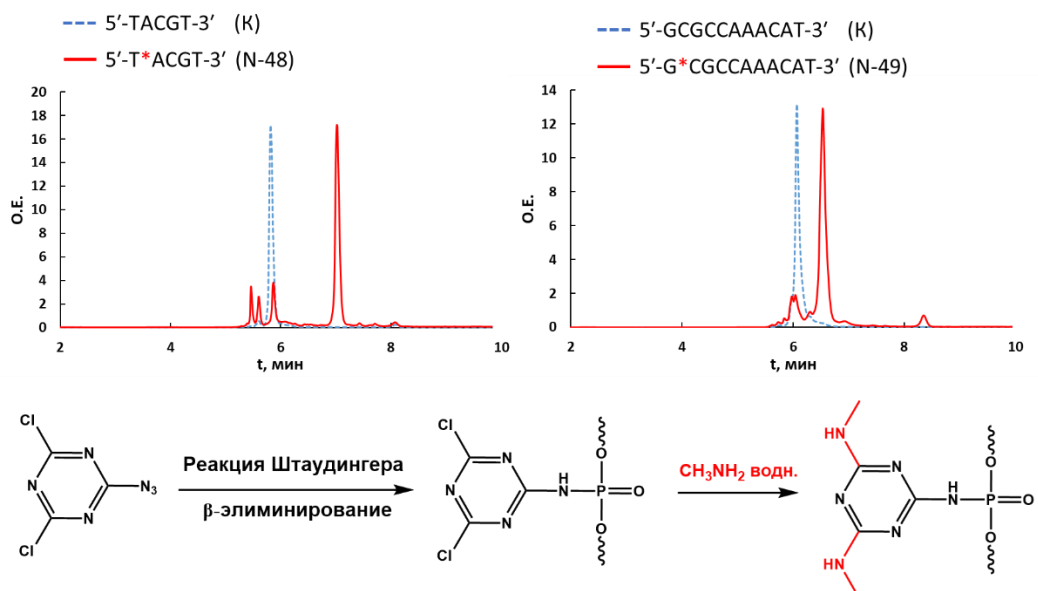


Рис. 64. Профили ОФ ВЭЖХ реакционных смесей гетероолигонуклеотидов последовательностей 5'-T*ACGT-3' (N-48) и 5'-G*CGCCAAACAT-3' (N-49) после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином. Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-45% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе TEA*AcOH, $\lambda = 260$ нм.

В данной работе дополнительно была определена потенциальная возможность присоединения триазинового ядра к экзоциклическим аминогруппам оснований, в том числе для установления верхних границ условий реакции Штаудингера при модификации гетероолигонуклеотидов. Для этого был проведен контрольный эксперимент по обработке нативного олигонуклеотида 5'-TACGT-3' цианурхлоридом (N-50) и 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином (N-51) в жестких условиях (0.1М раствор, 1 час, 55°C). В случае присоединения любого ароматического остатка к азотистым основаниям максимум оптического поглощения должен отличаться от такового для нативного олигонуклеотида (260 нм). Действительно, при сравнении оптических спектров нативного олигонуклеотида и олигонуклеотидов N-50, N-51 видно, что максимум поглощения последних смещен ближе к 270 нм (Рис. 65а). Также заметно наличие небольшого плеча спектра в области около 230 нм, соответствующей максимуму поглощения триазинового ядра. Косвенно присоединение триазинового ядра к азотистым основаниям было также доказано методом электрофореза в ПААГ. На электрофоретическом профиле видно, что олигонуклеотиды N-50, N-51 значительно хуже окрашены красителем StainsAll по сравнению с немодифицированным контролем (Рис. 65б). Вероятно, после включения триазинового ядра в состав азотистых оснований интеркаляция красителя в цепь олигонуклеотида происходит с меньшей эффективностью вследствие каких-либо электростатических взаимодействий или стерических затруднений.

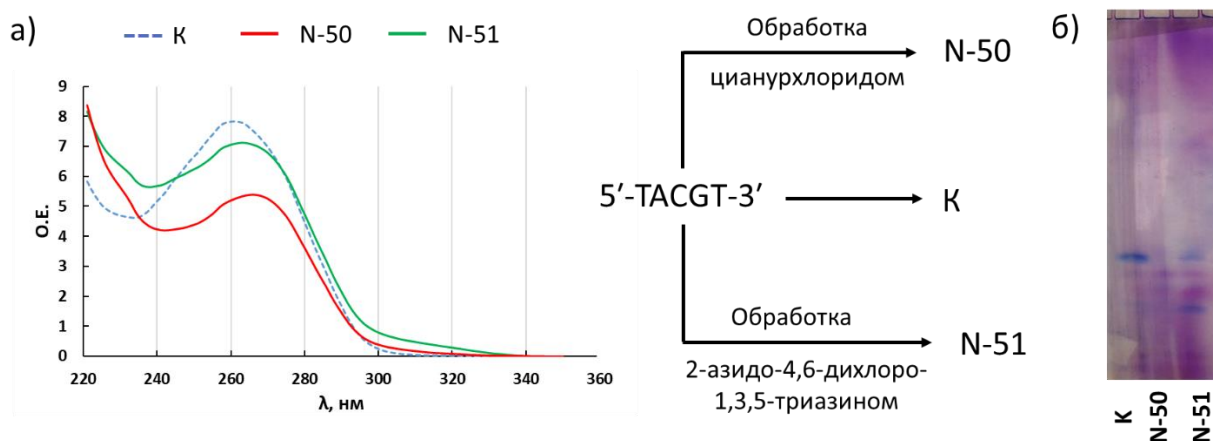


Рис. 65. Оптические спектры олигонуклеотидов последовательности 5'-TACGT-3' после обработки цианурхлоридом (N-50) и 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином (N-51) в жестких условиях (0.1М, 1 час, 55°C), а также контрольного олигонуклеотида (К) (а), и электрофоретический профиль олигонуклеотидов К, N-50, N-51 (б).

Таким образом было показано, что разработанный подход к получению триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина может быть использован для получения гетероолигонуклеотидов, но только со строгим соблюдением условий реакции Штаудингера.

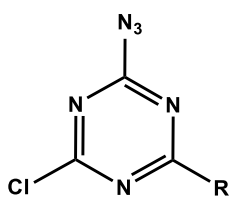
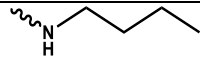
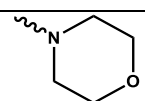
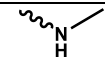
4.5.2. Получение триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов в автоматическом режиме

Одними из основных особенностей фосфат-модифицированных олигонуклеотидов, определяющих эффективность их применения в различных областях, является полная совместимость схем их получения с протоколами твердофазного амидофосфитного синтеза, а также возможность введения модификаций в автоматическом режиме. В данной работе, наравне с уже продемонстрированной совместимостью триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов с твердофазным синтезом, была исследована возможность их получения в полностью автоматическом режиме. При попытках введения модификации с использованием наиболее реакционноспособного 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина были получены такие же результаты, как и в случае обработки триазирилфосфазенового звена кэпирующей смесью и дальнейшего деблокирования (олигонуклеотид N-12, раздел 4.3.2.2). В данном случае происходит множество побочных реакций деградации модифицированного звена. Кроме того, в ходе окисления фосфит-триэфира азидо-триазином в насосах синтезатора образуется нерастворимый белый осадок. В совокупности

данные факторы исключают возможность автоматического введения 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина в состав олигонуклеотида.

Возможность эффективного автоматического синтеза триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов была продемонстрирована только после перехода к менее реакционноспособным модификаторам в виде 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов, несущих компактные остатки алкиламинов. Более донорный характер триазинового остова в подобных реагентах понижает вероятность замещения атома хлора в ходе твердофазного синтеза на различные нуклеофильные компоненты, в то время как компактные остатки алкиламинов нивелируют возможные стерические затруднения при протекании реакции Штаудингера. В качестве реагентов-модификаторов для автоматического встраивания в олигонуклеотид были выбраны азидо-триазины, несущие остатки бутиламина, морфолина и метиламина. Модификации были введены в октатимидилат по ближайшему к 3'-концу межнауклеотидному фосфату (5'-TTTTTTT*T-3') в выбранных условиях реакции Штаудингера (0.25М раствор азиды, этап окисления – 2 часа). Такое расположение модификации позволит оценить не только эффективность ее введения, но и стабильность триазинового остова, несущего один атом хлора, в условиях автоматического синтеза. Анализ ОФ ВЭЖХ олигонуклеотидов, модифицированных соответствующими азидо-триазинами (N-52, N-53, N-54), ожидаемо показал прямую зависимость конверсии в целевой продукт от размера заместителей (данные суммированы в Табл. 3).

Табл. 3. Структуры реагентов-модификаторов, вводимых в состав олигонуклеотидов 5'-TTTTTTT*T-3' в автоматическом режиме, и оценка эффективности их введения по конверсии в целевой продукт, определенной по ОФ ВЭЖХ.

Код	Структура азидо-триазина	Заместитель в триазиновом остова	Конверсия по ОФ ВЭЖХ
N-52		R = 	85%
N-53		R = 	90%
N-54		R = 	>95%

Наиболее удовлетворительных результатов удалось достичь при использовании 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина в качестве реагента-модификатора – в выбранных условиях введения модификации конверсия в целевой продукт по результатам

ВЭЖХ составила более 95% (олигонуклеотид N-54, Рис. 66). С использованием данного реагента-модификатора также была показана возможность множественного введения триазиниламидофосфатных модификаций в автоматическом режиме в состав олигонуклеотидов. Так, были получены октатимидилаты, содержащие от 2 до 4 последовательно введенных модификаций со стороны 3'-конца (олигонуклеотиды N-55, N-56, N-57). Анализ ВЭЖХ реакционных смесей показал, что введение двух модификаций подряд протекает практически количественно, однако с последующим увеличением количества модификаций выходы целевых продуктов падают до 80% для трех, и до 60% для четырех модификаций соответственно (Рис. 66, N-56, N-57). Вероятно, такое падение выходов связано со стерическими эффектами объемных триазиновых групп, препятствующих протеканию последующих реакций модификации. Электрофоретический анализ очищенных олигонуклеотидов N-54 – N-57 показал характерное уменьшение подвижности производных равными интервалами при увеличении числа электронейтральных модификаций [189], что дополнительно подтверждает получение целевых продуктов (Рис. 66). Интересно отметить, что окраска олигонуклеотидов красителем StainsAll ослабевает при увеличении числа модификаций, что связано с уменьшением электростатических взаимодействий между отрицательно заряженными фосфатными группами и положительно заряженным красителем.

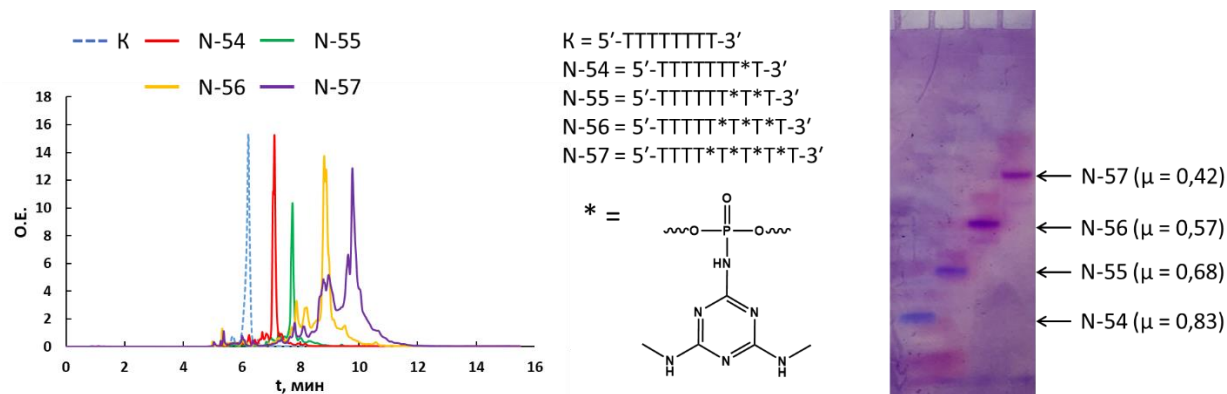


Рис. 66. Профили ОФ ВЭЖХ реакционных смесей контрольного олигонуклеотида К (немодифицированный октатимидилат) и октатимидилатов, содержащих одну (N-51), две (N-52), три (N-53), и четыре (N-54) модификации, введенные в автоматическом режиме с использованием 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина (слева) и электрофоретический профиль олигонуклеотидов N-51 – N-54 (справа). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-45% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе TEA*AcOH, $\lambda = 260$ нм.

Таким образом, были выявлены некоторые особенности различных подходов к получению триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов, определяющих границы их

применимости. Возможность получения гетероолигонуклеотидов, модифицированных триазиновой группой, а также синтеза триазиниламидофосфатных производных в автоматическом режиме, позволяет использовать их, например, в качестве ПЦР-праймеров и других молекулярно-биологических инструментов, что расширяет потенциал прикладного применения разрабатываемых олигонуклеотидов.

4.6. Свойства некоторых представителей класса триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов

В предыдущей части работы была продемонстрирована гибкость разработанного подхода к получению триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов на примере синтеза большого количества представителей класса. Некоторые из них далее были использованы для изучения ряда фундаментальных физико-химических и молекулярно-биологических свойств триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов. По совокупности изученных свойств можно будет сделать вывод о потенциале применения исследуемого класса олигонуклеотидов, в том числе терапевтического.

4.6.1. Физико-химические свойства олигонуклеотидов

4.6.1.1. Химическая устойчивость триазиниламидофосфатной модификации

Одним из важных параметров олигонуклеотидных производных, определяющих границы их применимости, является химическая устойчивость вводимых модификаций. В данной работе была определена стабильность триазиниламидофосфатной группы в щелочных и кислых условиях.

Процесс отщепления синтезированного олигонуклеотида от твердофазного носителя протекает в сильнощелочных концентрированных водных растворах аммиака и метиламина в достаточно жестких условиях (15–30 минут, 55°C). На примере ВЭЖХ анализа некоторых триазиниламидофосфатных производных (например, N-54) было показано полное отсутствие в реакционной смеси немодифицированного олигонуклеотида после отщепления от твердофазного носителя. Данный факт свидетельствует об устойчивости триазиниламидофосфатной группы в щелочной среде. Стоит отметить, что присутствие некоторого количества нативного олигонуклеотида в реакционных смесях триазиниламидофосфатов связано с неполным протеканием реакции Штаудингера или с гидролизом триазирилфосфазена, и не указывает на деградацию триазиниламидофосфатной связи в щелочных условиях.

Для определения стабильности триазиниламидофосфатов в кислой среде был проведен отдельный эксперимент. Синтезированные декатимидилаты, содержащие триазиниламидофосфатную группу с остатками бутиламина (М-В) или бензиламидофосфатную модификацию (Bz) по ближайшему к 5'-концу межнуклеотидному фосфату (5'-Т*ТТТТТТТТ-3') были обработаны 0.1М соляной кислотой в течение разных промежутков времени (от 30 минут до 13 часов). Для каждой временной точки был проведен анализ ВЭЖХ с оценкой количества оставшегося модифицированного олигонуклеотида, на основании чего был построен график времязависимой деградации (Рис. 67). Бензиламидофосфатный олигонуклеотид, ожидаемо, начал гидролизироваться уже в первой временной точке (30 минут), а в конечной точке эксперимента (780 минут) в реакционной смеси присутствовало всего около 15% целевого производного. Полученные данные о крайней неустойчивости алкиламидофосфатных модификаций согласуются с литературными [178, 179]. В свою очередь, триазиниламидофосфатная модификация оставалась стабильной на протяжении всего эксперимента. Вероятно, стабильность амидофосфатной связи в данном случае обусловлена сопряжением неподеленной пары азота с ароматической системой триазина, что препятствует электрофильной атаке протона по атому азота и, соответственно, кислотному гидролизу.

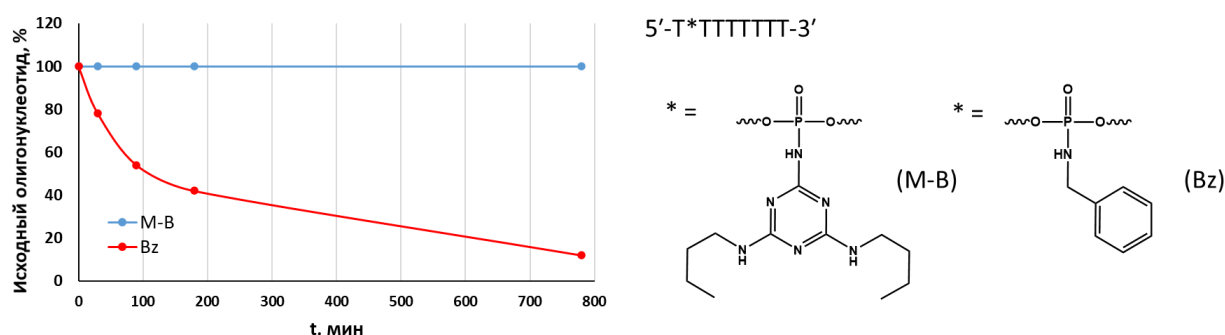


Рис. 67. Устойчивость триазиниламидофосфатной и бензиламидофосфатной модификаций в кислой среде. Процентное содержание исходного олигонуклеотида было определено методом ОФ ВЭЖХ.

Исходя из полученных данных можно заключить, что триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды обладают значительной химической устойчивостью в водных растворах с широким диапазоном pH.

4.6.1.2. Гибридизационные свойства триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов

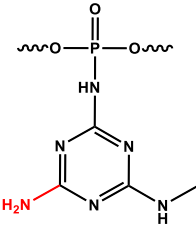
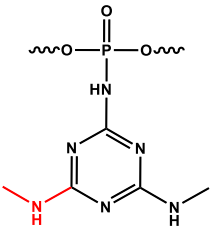
Способность нуклеиновых кислот образовывать комплементарные комплексы (дуплексов) является основополагающим свойством для их применения в качестве специфических диагностических инструментов и терапевтических препаратов. В

подавляющем большинстве случаев химические модификации в составе олигонуклеотидов тем или иным образом влияют на термодинамические параметры образования таких комплексов (см., например, [72, 76, 189]), что определяет область их прикладного использования. В связи с этим, изучение общего характера дуплексообразования для исследуемых триазиниламидофосфатных производных является одной из основных задач в рамках характеристики класса.

В данной работе влияние триазиниламидофосфатной группы на эффективность образования дуплекса было исследовано на системе 11-звенного гетероолигонуклеотида последовательности 5'-GCGCCAAACAT-3'. В качестве модификаций были выбраны триазиниламидофосфаты, содержащие максимально компактные заместители для корректной оценки вклада триазинового остова модификации в термодинамические параметры дуплексообразования. Для введения таких модификаций были использованы азидо-триазины, содержащие остатки метиламина или аммиака, а именно 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазин и 2-азидо-4-амино-6-хлоро-1,3,5-триазин. Для полученного набора модифицированных олигонуклеотидов, содержащих разное количество модификаций в разных положениях НК-цепи, были определены температуры плавления дуплексов (T_m), а также разница между T_m дуплекса модифицированного олигонуклеотида и T_m немодифицированного комплементарного комплекса (ΔT_m); полученные данные суммированы в Табл. 4.

Табл. 4. Значения температур плавления (T_m) и разницы температур плавления по сравнению с немодифицированным комплексом (ΔT_m) для дуплексов модифицированных олигонуклеотидов состава 5'-GCGCCAAACAT-3'. Буфер – 1 М NaCl и 10 мМ $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}$ (какодилат натрия), концентрация каждой из цепей дуплекса – $1 \cdot 10^{-5}$ М.

Код	Олигонуклеотид	T_m , °C	ΔT_m , °C
К	5'-GCG-CCA-AA-CA-T-3'	66,0	0,0
М-А1	5'-GCG-CCA-AA-CA* ¹ T-3'	65,1	-0,9
М-М1	5'-GCG-CCA-AA-CA* ² T-3'	64,6	-1,4
М-А2	5'-GCG-CCA* ¹ AA-CA* ¹ T-3'	63,2	-2,8
М-М2	5'-GCG-CCA* ² AA-CA* ² T-3'	63,1	-2,9
М-А3	5'-G* ¹ CG-CCA* ¹ AA-CA-T-3'	58,1	-7,9
М-М3	5'-G* ² CG-CCA* ² AA-CA-T-3'	59,0	-7,0
М-А4	5'-G* ¹ CG-CCA-AA-CA* ¹ T-3'	63,1	-2,9
М-М4	5'-G* ² CG-CCA-AA-CA* ² T-3'	62,8	-3,2
М-А5	5'-G* ¹ C* ¹ G-CCA-AA-C* ¹ A* ¹ T-3'	58,7	-7,3

M-M5	5'-G* ² C* ² G-CCA-AA-C* ² A* ² T-3'	57,2	-8,8
*1 =  *2 = 			

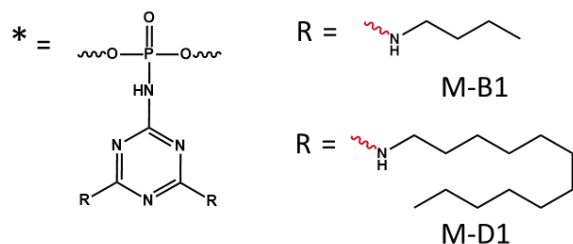
Как видно из приведенных данных, триазиламидофосфатная модификация в составе олигонуклеотида незначительно понижает температуру плавления дуплекса, причем дестабилизирующий эффект практически не зависит от типа заместителей в триазиновом остове (олигонуклеотиды М-А1 и М-М1, Табл. 4). Вероятно, снижение стабильности модифицированного дуплекса по сравнению с нативным связано с искажением сольватной оболочки комплекса в растворах с повышенной ионной силой, что характерно для электронейтральных фосфатных модификаций, в частности фосфорилгуанидиновых [215]. Введение нескольких модификаций закономерно еще больше снижает температуру плавления (например, олигонуклеотиды М-А1 и М-А2, Табл. 4). При этом, локальное нуклеотидное окружение и положение модификаций в значительной мере влияет на стабильность комплементарного комплекса. Например, расположение в данной олигонуклеотидной системе модификаций со стороны 5'-конца (G*С) и в середине цепи (А*А) понижает T_m дуплекса больше, чем на 7°C, но в то же время при расположении модификаций в концевых участках дуплекса (G*С и А*Т) T_m дуплекса снижается всего на 3°C (например, олигонуклеотиды М-А3 и М-А4, Табл. 4). Стоит дополнительно отметить, что увеличение объема заместителей в составе триазиламидофосфатной модификации также незначительно влияет на дестабилизацию дуплекса. Так, например, наличие остатков додециламина в триазиновом остове модификации, расположенной со стороны 3'-конца в составе различных гетероолигонуклеотидов, используемых для изучения эффективности проникновения в клетки (см. разд. 4.6.3), снижает температуру плавления всего на несколько градусов в зависимости от солевых условий.

Таким образом можно заключить, что при единичном включении триазиламидофосфатные модификации проявляют незначительный дестабилизирующий эффект в ходе образования дуплексов. В то же время при множественном введении модификаций стабильность дуплекса может снижаться в большей степени в зависимости от нуклеотидного окружения и места расположения модификации, что следует учитывать при конструировании олигонуклеотидов для конкретных приложений.

4.6.2. Ферментативная устойчивость и цитотоксичность олигонуклеотидов

Важнейшими базовыми свойствами модифицированных олигонуклеотидов, определяющих возможность проведения *in vivo* исследований, являются устойчивость НК-производных к нуклеазному расщеплению, а также их цитотоксичность. В данной работе для триазиниламидофосфатов были исследованы оба этих свойства.

Ферментативная устойчивость триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов была определена при их обработке нуклеазами цельноклеточных экстрактов клеточных линий НЕК293Т и Т98G. В качестве исследуемых олигонуклеотидов были выбраны немодифицированный контрольный гетероолигонуклеотид, содержащий флуоресцеиновую метку на 5'-конце (5'-[FAM]-CTGACSTATGAAGTATT-3'), а также его аналоги, содержащие со стороны 3'-конца триазиниламидофосфатную модификацию, несущую остатки бутиламина или додециламина (олигонуклеотиды К, М-В1, М-Д1). Введение указанных групп в триазиновый остов позволит оценить влияние не только самой триазиниламидофосфатной модификации (К против М-В1), но и объема заместителей (М-В1 против М-Д1) на стабильность олигонуклеотидов к нуклеазной деградации. Также ферментативная устойчивость была определена для дуплексных форм олигонуклеотидов К, М-В1, М-Д1 (К/Comp, М-В1/Comp, М-Д1/Comp соответственно). После обработки каждого из исследуемых олигонуклеотидов или их дуплексов цельноклеточными экстрактами НЕК293Т и Т98G в течение 7.5 и 15 минут реакционные смеси были проанализированы методом электрофореза в ПААГ (Рис. 68).



127

полной деградации, в то время как для клеток T98G дополнительно наблюдаются продукты пошагового расщепления в направлении 3'→5' (дорожка 7 против дорожки 9). Это связано с различным содержанием в клетках Ку-антигена, препятствующего расщеплению – T98G значительно обеднены этим белком, в то время как в клетках НЕК293Т содержание Ку-антигена высоко.

Во-вторых, наличие триазиниламидофосфатной модификации понижает эффективность деградации. Так, например, дуплекс M-B1/Comp при обработке экстрактом T98G в течение 7.5 минут практически не деградирует (дорожка 19), при этом нативный дуплекс K/Comp в этих же условиях расщепляется более чем наполовину (дорожка 9). Примечательно, что модифицированные олигонуклеотиды и их дуплексы гораздо более устойчивы в экстрактах T98G, несмотря на меньшее количество Ку-антигена в этих клетках (например, дорожка 19 против дорожки 17). Вероятно, это связано с особенностями взаимодействия триазиниламидофосфатной группы модифицированных олигонуклеотидов и Ку-антигена, что снижает его защитный эффект и способствует расщеплению.

Наконец, в-третьих, додецил-содержащие триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды обладают наибольшей стабильностью к нуклеазной деградации. Дуплекс M-D1/Comp во всех случаях расщепляется менее, чем на 50% (дорожки 27-30). Кроме того, в отличие от олигонуклеотидов K и M-B1, практически полностью деградируемых в выбранных условиях, одноцепочечный олигонуклеотид M-D1 проявляет выраженную устойчивость, особенно на клеточной линии T98G. Полученные данные указывают на значимую роль заместителей в составе триазиниламидофосфатной модификации в нуклеазоустойчивости олигонуклеотидов.

На примере додецил-содержащего олигонуклеотида M-D1 и его дуплекса M-D1/Comp была исследована цитотоксичность триазиниламидофосфатных производных на линиях клеток НЕК293Т и T98G. Для этого культивированные клетки были проинкубированы с растворами олигонуклеотидов в разной концентрации в течение 24 (НЕК293Т) или 36 (T98G) часов с регистрацией значений клеточного индекса в реальном времени. На основании полученных данных были построены кривые зависимости выживания клеток от концентрации олигонуклеотида, из которых были определены значения концентраций полувыживания клеток (IC₅₀), отражающие токсичность НК-производных. Данные по цитотоксичности олигонуклеотидов M-D1 и M-D1/Comp приведены на Рис. 69.

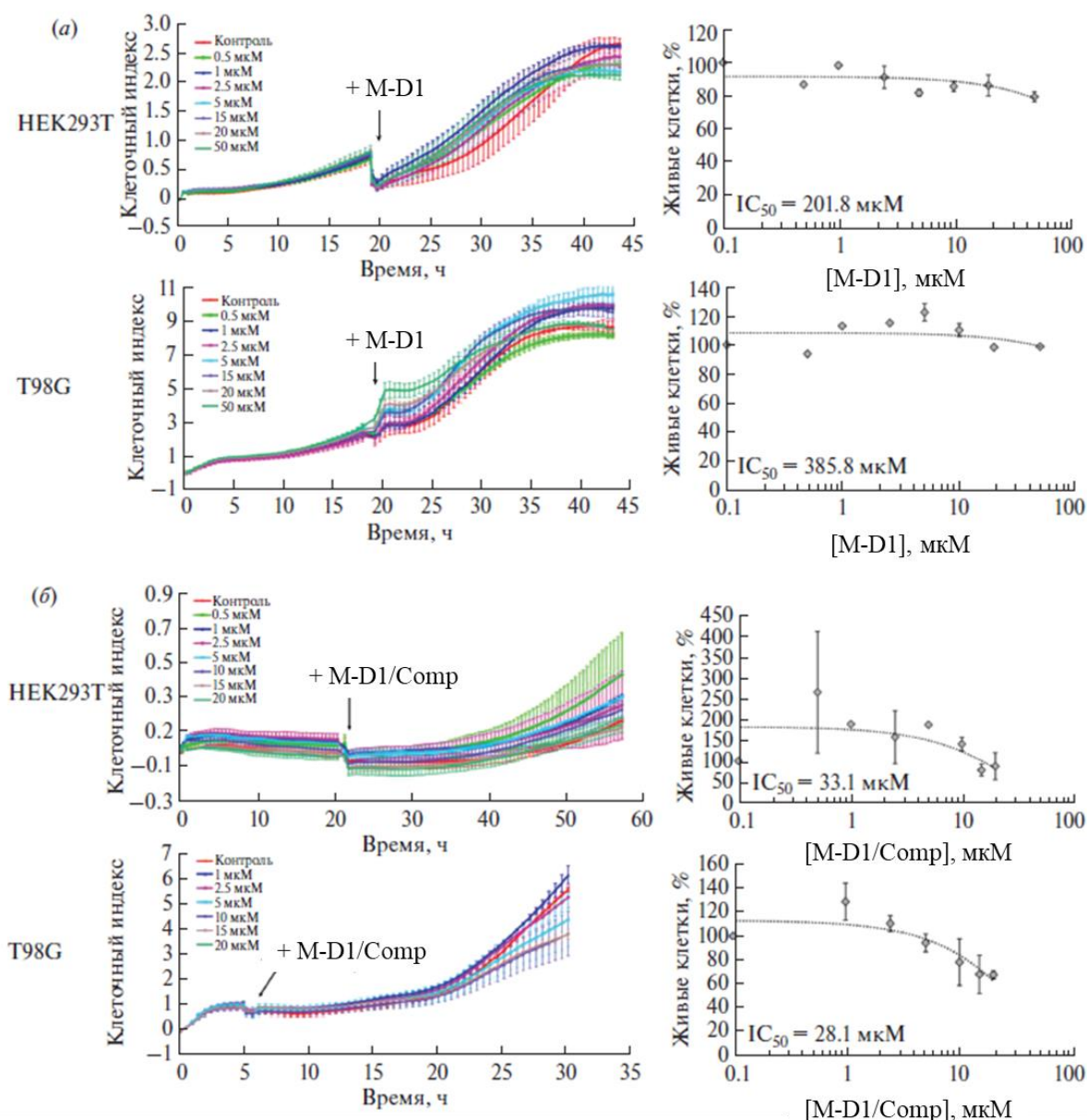


Рис. 69. Концентрационные кривые зависимости клеточного индекса от времени (левая панель) и кривые выживаемости клеток в зависимости от концентраций (правая панель) для модифицированного олигонуклеотида, содержащего триазиниламидофосфатную группу со стороны 3'-конца (5'-[FAM]-СТГАСТАТГААГТАТ*Т-3'), несущую остатки додециламина (М-D1) (а), и дуплекса этого олигонуклеотида (М-D1/Comp) (б), на клетках HEK293T и T98G.

Как видно из полученных данных, одноцепочечный олигонуклеотид М-D1 практически не проявляет токсичности на обеих линиях клеток в выбранных временных точках. В данном случае концентрации IC₅₀ были определены путем экстраполяции значений, и составили 201.8 мкМ и 385.8 мкМ для клеток HEK293T и T98G соответственно. В то же время токсичность дуплекса М-D1/Comp более чем на порядок выше токсичности олигонуклеотида М-D1, и составляет 33.1 мкМ и 28.1 мкМ для разных клеточных линий. Тем не менее, в обоих случаях концентрация полувыведения IC₅₀ значительно превышает

рабочие концентрации олигонуклеотидов, составляющих порядка 1–5 мкМ. Высокое значение IC_{50} для одноцепочечного М-D1 дополнительно указывает на отсутствие влияния триазинового остова на цитотоксичность олигонуклеотидов.

Таким образом, была показана значительная стабильность триазиниламидофосфатов к нуклеазному расщеплению, а также их низкая цитотоксичность. Такие свойства указывают на возможность дальнейшего изучения триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов на различных клеточных системах, а также определяют значительную часть их терапевтического потенциала.

4.6.3. Проникновение триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов в клетки

Одной из важнейших задач в области разработки терапевтических олигонуклеотидов является повышение эффективности их проникновения в клетки. Для решения этой задачи зачастую используют различные системы доставки НК в клетки, такие как, например, катионные липосомы и комплементарные гидрофобные олигонуклеотиды [177, 208, 209]. Реже гидрофобные или иные заместители, обеспечивающие проникновение в клетку (например, остатки (N-ацетил)галактозамина), вводят в состав самого доставляемого олигонуклеотида [4, 7, 198]. Несмотря на наличие большого числа способов доставки НК в клетки, разработка новых путей повышения эффективности проникновения олигонуклеотидов остается релевантной задачей. В данной работе были детально рассмотрены возможности и особенности внутриклеточного накопления триазиниламидофосфатных НК-производных.

Первоначально была определена эффективность внутриклеточного накопления уже изученных триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов М-B1 и М-D1, несущих в триазиновом остове остатки бутиламина и додециламина соответственно. В качестве отрицательного контроля в эксперименте был использован немодифицированный олигонуклеотид К, а в качестве положительного контроля – его комплекс с коммерчески доступным доставщиком «Lipofectamine2000» (LF/K). Трансфекция клеток линий НЕК293Т и Т98G олигонуклеотидами в концентрации 5 мкМ проводилась в течение 4 часов, после чего клетки были проанализированы на проточном цитофлуориметре с регистрацией флуоресцентного сигнала. По полученным данным были построены пары гистограмм, отражающих процент задетектированных флуоресцентных клеток и относительную интенсивность флуоресценции (Рис. 70).

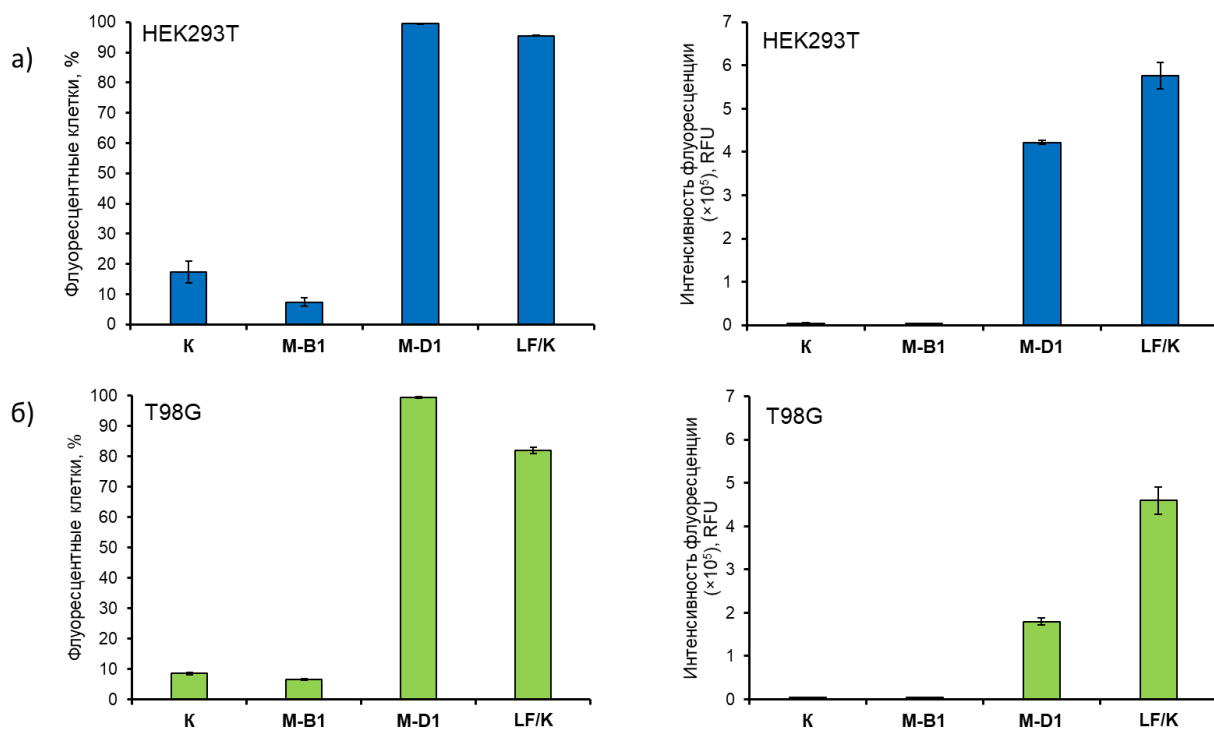


Рис. 70. Процент флуоресцентных клеток (левая панель) и интенсивность флуоресценции (правая панель) при трансфекции клеток линий HEK293T (а) и T98G (б) триазиниламидофосфатными олигонуклеотидами последовательности 5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTAT*T-3', содержащими остатки бутиламина (M-B1) или додециламина (M-D1), а также контрольным немодифицированным олигонуклеотидом (K) и его комплексом с трансфецирующим агентом (LF/K). Концентрация олигонуклеотидов – 5 мкМ. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

По полученным данным можно сделать несколько заключений. Во-первых, введение как такового триазинового остова в состав олигонуклеотида не повышает эффективность его проникновения. Так, процент обоих типов клеток, трансфецированных производным M-B1, составляет менее 10%, и с учетом погрешности находится на одном уровне с контрольным олигонуклеотидом K (Рис. 70, слева). При этом на фоне других олигонуклеотидов флуоресценция M-B1 обладает очень низкой интенсивностью и практически не детектируется (Рис. 70, справа). Во-вторых, додецил-содержащий олигонуклеотид M-D1 в свободном виде проникает в клетки с высокой эффективностью. В данном случае для 100% клеток детектируется флуоресцентный сигнал (Рис. 70, слева), а интенсивность флуоресценции составляет порядка $4,5 \cdot 10^5$ RFU (относительные единицы флуоресценции) для клеток HEK293T, и порядка $2,0 \cdot 10^5$ RFU для клеток T98G (Рис. 70, справа). При этом интенсивность флуоресценции положительного контрольного олигонуклеотида LF/K составляет порядка $6,0 \cdot 10^5$ RFU для клеток HEK293T, и порядка $5,0 \cdot 10^5$ RFU для клеток T98G. Следовательно, производное MD-1 накапливается в клетках T98G хуже, что может быть объяснено особенностями их метаболизма и морфологии. Тем

не менее, эффективность проникновения MD-1 в обоих случаях на несколько порядков выше проникновения контроля К и производного М-В1 (RFU порядка $0,05 \cdot 10^5$). Таким образом, полученные данные указывают на главенствующую роль додецильных остатков в составе триазинового остова модификации на степень внутриклеточного накопления олигонуклеотидов.

В дальнейшей работе были изучены дополнительные аспекты проникновения додецил-содержащих триазириламидофосфатных олигонуклеотидов.

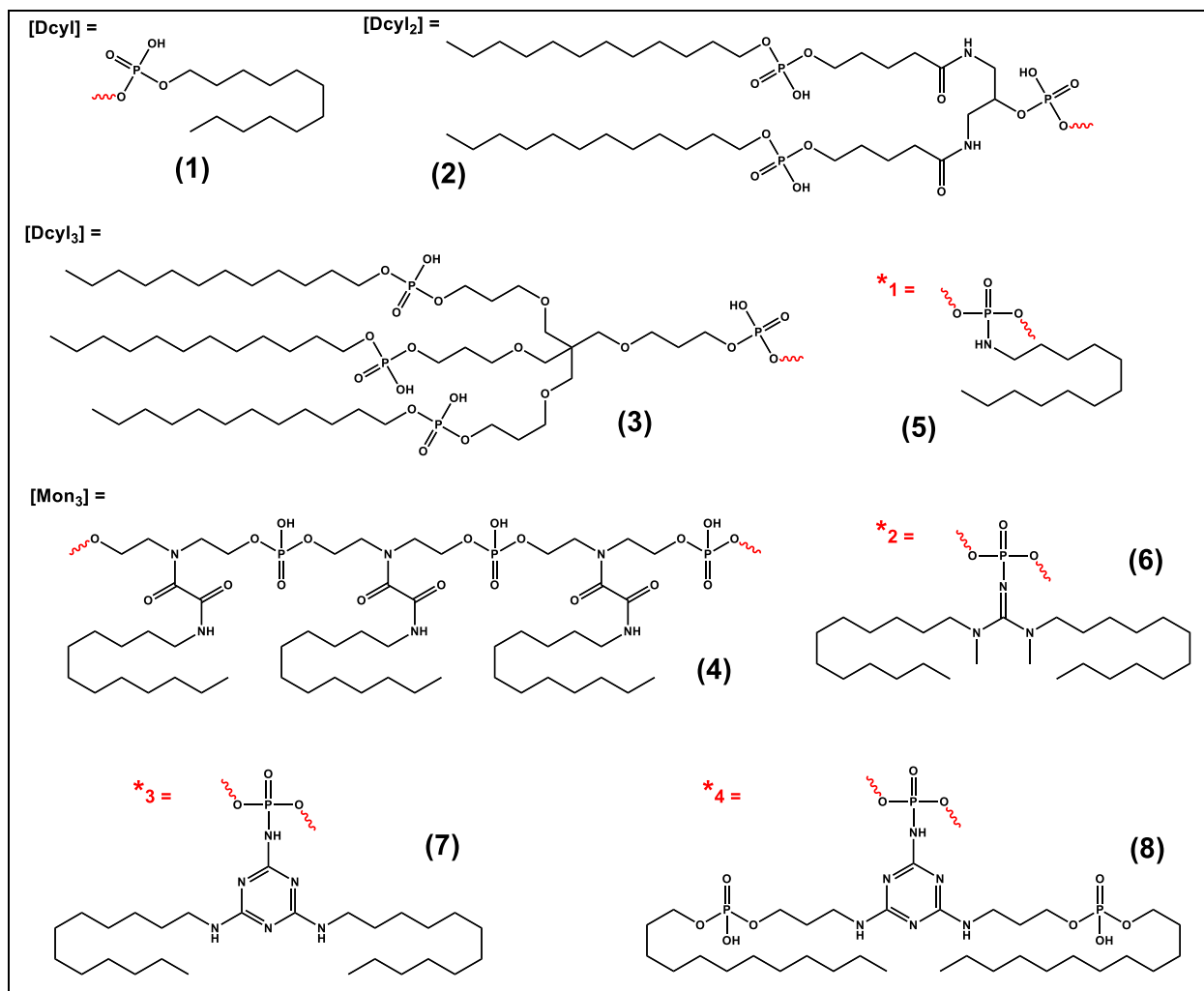
4.6.3.1. Сравнение эффективности проникновения с другими додецил-содержащими производными

Для определения вклада не только додецильных остатков, но и триазинового остова в эффективность проникновения триазириламидофосфатных олигонуклеотидов, был проведен сравнительный эксперимент с использованием других додецил-содержащих НК-производных. В качестве таких производных был использован целый набор олигонуклеотидов, содержащих от одного до трех додецильных остатков, введенных разными способами. Один вариант структур содержит остаток додецила на 5'-конце, введенный с применением (N,N-диизопропиламино)-2-цианоэтил-додециламидофосфита (Табл. 5, олигонуклеотид OD1, структура 1). Для введения двух и трех додецильных остатков с применением данного модификатора были использованы коммерчески доступные разветвляющие агенты, позволяющие ввести две (doubler phosphoramidite) или три (trebler phosphoramidite) дополнительные гидроксильные группы с 5'-конца (Табл. 5, олигонуклеотиды OD2 и OD3, структуры 2 и 3). Помимо 5'-концевого амидофосфитного модификатора, для введения додецильных остатков был использован ненуклеотидный мономер с оксаламидным остовом [216]; с применением данного модификатора было введено три остатка додецила подряд (Табл. 5, олигонуклеотид MonD3, структура 4). Все перечисленные варианты модификаций были введены в рамках стандартного цикла твердофазного синтеза с применением соответствующих амидофосфитных структур. Получение другой группы олигонуклеотидов основано на альтернативном окислении, и включает следующие варианты. Додецильные остатки в составе олигонуклеотида ND2 были введены путем проведения иодного окислительного аминирования в присутствии додециламина (Табл. 5, структура 5). В структуру остальных олигонуклеотидов додецильные остатки были введены по реакции Штаудингера с применением различных азидов. Так, олигонуклеотид GD2, содержащий два остатка додецила на гуанидиновом остове, был получен с применением соответствующего диаминакарбенидазида [170] (Табл. 5, структура 6). Триазириламидофосфатные додецил-содержащие олигонуклеотиды были

получены в двух вариантах. Первый вариант был получен по стандартной схеме, включающей реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина и последующим введением в триазиновый остатков додециламина (Табл. 5, олигонуклеотид TD2, структура 7). Для получения второго варианта структуры была использована несколько измененная схема – в триазиновый остов сначала были введены остатки 3-аминопропанола-1, после чего по гидроксильным группам были введены додецильные группы с применением разработанного 5'-концевого модификатора (Табл. 5, олигонуклеотид TOD2, структура 8). Все олигонуклеотиды были очищены хроматографией, после чего проанализированы методом ESI-MS масс-спектрометрии, что подтвердило предполагаемые структуры.

Табл. 5. Список додецил-содержащих олигонуклеотидов, несущих модификации различной структуры (обозначены как [Dcyl], [Dcyl₂], [Dcyl₃], [Mon₃], *¹, *², *³, *⁴; структуры расшифрованы в таблице), для изучения эффективности их проникновения. [FAM] – остаток флуоресцеина.

Код	Последовательность (5'→3')	М (теор.)	М (эксп.)
OD1	[Dcyl]-CTGACTATGAAGTATT-[FAM]	5794.1	5796.0
OD2	[Dcyl ₂]-CTGACTATGAAGTATT-[FAM]	6394.7	6392.4
OD3	[Dcyl ₃]-CTGACTATGAAGTATT-[FAM]	6721.1	6722.8
MonD3	[FAM]-CTGACTATGAAGTAT-[Mon ₃]-T	6706.0	6705.6
ND2	[FAM]-TTTCTGACTATGTA ^{*1} T ^{*1} T	5724.3	5731.8
GD2	[FAM]-CTGACTATGAAGTAT ^{*2} T	5838.4	5837.4
TD2	[FAM]-CTGACTATGAAGTAT ^{*3} T	5877.4	5877.4
TOD2	[FAM]-TTTTTTT ^{*4} T	3629.9	3628.8



Стоит отметить, что все указанные олигонуклеотиды можно условно разделить на две группы: в первой группе додецильные остатки введены последовательно (производные MonD3, ND2), а во второй – одновременно (все остальные производные). Порядок введения заместителей в совокупности с пространственной ориентацией остова модификации могут влиять на эффективность проникновения даже при одинаковом количестве гидрофобных групп [177, 217], что было учтено при интерпретации полученных данных.

Внутриклеточное накопление олигонуклеотидов было оценено на линии клеток HEK293T. Клетки были трансфицированы олигонуклеотидами в концентрации 5 мкМ в течение 4 часов, после чего в стандартном варианте проанализированы на проточном цитофлуориметре. Результаты анализа в виде процента флуоресцирующих клеток и интенсивности флуоресценции представлены на Рис. 71.

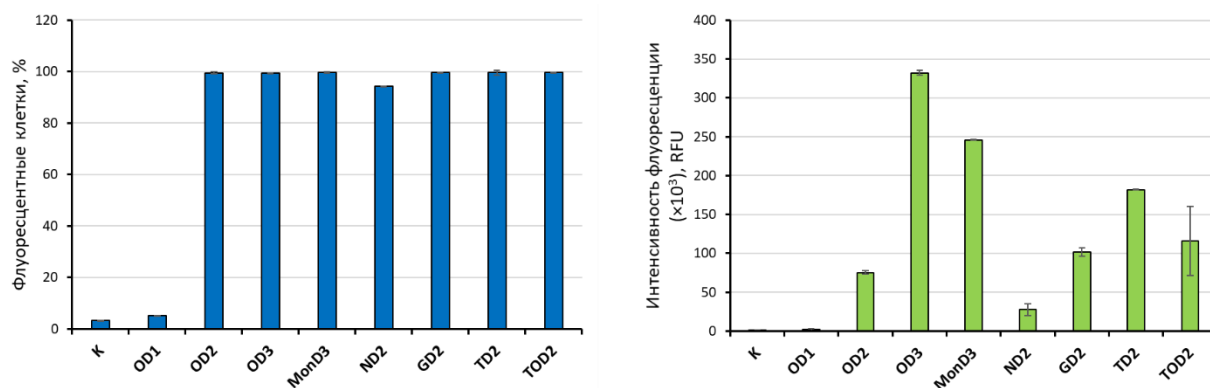


Рис. 71. Процент флуоресцентных клеток (слева) и интенсивность флуоресценции (справа) при трансфекции клеток HEK293T различными додецил-содержащими олигонуклеотидами, а также контрольным олигонуклеотидом последовательности 5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTATT-3' (K). Концентрация олигонуклеотидов – 5 мкМ. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

На основе полученных данных можно сделать несколько принципиальных выводов. Во-первых, увеличение количества додецильных остатков в составе олигонуклеотида ожидаемо повышает эффективность проникновения, при этом интенсивность флуоресценции возрастает экспоненциально (Рис. 71, производные OD1–OD3). При этом, введение одного гидрофобного остатка практически не повышает степень накопления соответствующего производного по сравнению с немодифицированным олигонуклеотидом.

Во-вторых, взаимное расположение додецильных остатков в структуре олигонуклеотида, как и предполагалось, значительно влияет на эффективность проникновения. Так, например, для производного OD3 с сонаправленными додецильными остатками интенсивность флуоресценции составляет порядка $3,3 \cdot 10^5$ RFU, в то время как для производного MonD3 с параллельно расположенными гидрофобными группами – $2,5 \cdot 10^5$ RFU. Вероятно, наличие гибкого линкера в составе OD3, соединяющий додецильные остатки с олигонуклеотидом, более предпочтительно для его эффективного взаимодействия с липидной мембраной клетки, в то время как жесткий неподвижный остов в составе MonD3 препятствует такому взаимодействию. Кроме того, додецильные остатки в составе OD3 более пространственно сближены к друг другу по сравнению с производным MonD3, что так же может влиять на эффективность проникновения.

Наконец, в-третьих, среди всех производных, содержащих два додецильных остатка, триазиламидофосфатный олигонуклеотид TD2 накапливается в клетках с наибольшей эффективностью. Ожидаемо, самая низкая интенсивность флуоресценции наблюдается для производного ND2 с параллельным расположением додецильных остатков (около $0,3 \cdot 10^5$ RFU). На удивление, среди остальных производных с сонаправленными додецильными

остатками хуже всего накапливается олигонуклеотид OD2, несмотря на довольно гибкий линкер в его составе (порядка $0,75 \cdot 10^5$ RFU против более чем $1,0 \cdot 10^5$ RFU у остальных производных). Напротив, олигонуклеотиды GD2, TD2, TOD2, несущие остатки додецила на жестком плоском гуанидиновом или триазиновом остоле, проникают в клетки с наибольшей эффективностью. При этом интенсивность флуоресценции олигонуклеотида TD2 превышает таковую для производных GD2 и TOD2 практически в два раза (порядка $1,0 \cdot 10^5$ RFU у GD2 и TOD2 против $1,8 \cdot 10^5$ RFU у TD2). Вероятно, расположение остатков додецила непосредственно вблизи триазинового остола наиболее предпочтительно при захвате клеткой соответствующего олигонуклеотида за счет какого-либо синергетического гидрофобного взаимодействия.

Таким образом, была показана значимая роль взаимного расположения додецильных остатков в составе олигонуклеотидов в эффективности их внутриклеточного накопления. При этом, пространственная структура додецил-содержащей триазиниламидофосфатной группы является наиболее оптимальной для проникновения олигонуклеотида в клетки, что является дополнительным преимуществом рассматриваемого класса модификаций.

4.6.3.2. Зависимость эффективности проникновения от параметров олигонуклеотидной системы

После демонстрации высокой эффективности проникновения додецил-содержащих триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов, было рассмотрено влияние ряда других параметров олигонуклеотидной системы на степень их внутриклеточного накопления.

Известно, что некоторые комбинации модификаций в составе олигонуклеотида способны обеспечивать эффективное проникновение в клетки. Например, введение в состав тиофосфатных олигонуклеотидов фосфорилгуанидиновых диметилимидазолидиниевых (ФГ) групп может значительно повысить степень их трансфекции [11]. В связи с доказанным положительным эффектом ФГ групп, было решено проверить их влияние на уровень внутриклеточного накопления додецил-содержащего триазиниламидофосфатного олигонуклеотида. Для этого в состав уже исследованного олигонуклеотида последовательности 5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTAT*T-3' были введены две дополнительные ФГ группы со стороны 5'-конца (Табл. 6, олигонуклеотиды А и АХ).

В предыдущей части работы были показаны различия в эффективности проникновения олигонуклеотидов в зависимости от конфигурации остовов модификаций, несущих додецильные остатки, среди которых наиболее предпочтительным оказался триазиновый остов. Для дополнительного определения эффективности проникновения додецил-содержащего триазиниламидофосфатного олигонуклеотида по сравнению с НК-

производными, несущими другие гидрофобные группы, были синтезированы холестеринный олигонуклеотид и его ФГ-содержащий аналог (Табл. 6, олигонуклеотиды Н и НХ).

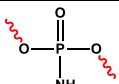
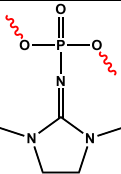
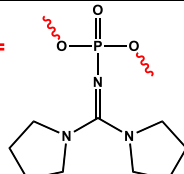
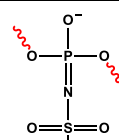
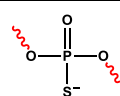
Для определения возможного влияния нуклеотидной последовательности на степень внутриклеточного накопления гидрофобных триазиламидофосфатных производных, был синтезирован олигонуклеотид состава 5'-[FAM]AGTCTCGACTTGCTAT*Т-3' и его ФГ-содержащий аналог (Табл. 6, олигонуклеотиды В и ВХ). Стоит отметить, что обе исследуемые нуклеотидные последовательности (А, В) являются рандомизированными для исключения сторонних эффектов взаимодействия олигонуклеотидов с мишенью при оценке степени внутриклеточного накопления.

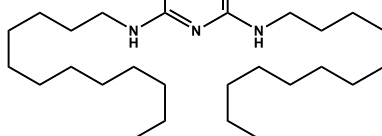
Помимо нуклеотидного состава и характера гидрофобной группы, для триазиламидофосфатных олигонуклеотидов, содержащих ФГ-группы, в качестве варьируемых параметров системы были выбраны положение ФГ-групп и их количество. В частности, для оценки влияния положения ФГ-групп на эффективность проникновения были синтезированы олигонуклеотиды с последовательностью (В), содержащие две ФГ-группы в середине цепи и в районе 3'-конца в соседнем положении с триазиламидофосфатной группой (Табл. 6, олигонуклеотиды ВХ' и ВХ''). При варьировании количества ФГ-групп в качестве исходной структуры был выбран олигонуклеотид АХ, в состав которого последовательно вводили модификации с получением производных, несущих 4, 6, 8 и 10 расположенных подряд ФГ-групп (Табл. 6, олигонуклеотиды АХ2, АХ3, АХ4, АХ5).

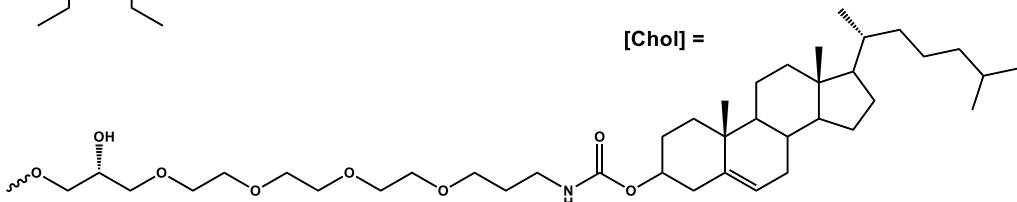
Наконец в качестве последнего варьируемого параметра олигонуклеотидной системы была выбрана природа дополнительных фосфатных модификаций. Например, в качестве альтернативной ФГ-группы была использована пирролидин-содержащая фосфорилгуанидиновая модификация (Табл. 6, олигонуклеотид ВУ) [170]. Такая группа является более объемной и гидрофобной по сравнению со стандартной ФГ-группой, что потенциально может увеличить эффективность проникновения. В качестве других фосфатных модификаций были выбраны метансульфониламидофосфатная (мезильная) [180, 183] и тиофосфатная группы (Табл. 6, олигонуклеотиды ВМ и ВS). Все синтезированные олигонуклеотиды были очищены методом ОФ ВЭЖХ и проанализированы методом ESI-MS масс-спектрометрии (Табл. 6), на основании чего был сделан вывод о чистоте олигонуклеотидов, а также подтверждена их предполагаемая структура.

Табл. 6. Список полученных олигонуклеотидов, несущих гидрофобные группы (обозначены как [Chol] и *) и различные фосфатные модификации (обозначены как ^X, ^Y, ^M, ^S), а также контрольного олигонуклеотида (K) для изучения эффективности их проникновения. [FAM] – остаток флуоресцеина.

Код	Последовательность (5'→3')	М (теор.)	М (эксп.)
A	[FAM]-CTGACTATGAAGTAT*T	5877.5	5876.5
AX	[FAM] ^X C ^X TGACTATGAAGTAT*T	6067.8	6067.6
AX2	[FAM] ^X C ^X T ^X G ^X ACTATGAAGTAT*T	6254.8	6253.8
AX3	[FAM] ^X C ^X T ^X G ^X A ^X C ^X TATGAAGTAT*T	6444.9	6446.0
AX4	[FAM] ^X C ^X T ^X G ^X A ^X C ^X T ^X A ^X TGAAGTAT*T	6635.1	6637.0
AX5	[FAM] ^X C ^X T ^X G ^X A ^X C ^X T ^X A ^X T ^X G ^X AAGTAT*T	6825.3	6827.0
H	[FAM]-CTGACTATGAAGTATT-[Chol]	6188.7	6189.0
HX	[FAM] ^X C ^X TGACTATGAAGTATT-[Chol]	6375.6	6376.5
B	[FAM]-AGTCTCGACTTGCTAT*T	6130.4	6132.0
BX	[FAM] ^X A ^X GTCTCGACTTGCTAT*T	6320.6	6321.6
BX'	[FAM]-AGTCTCG ^X A ^X CTTGCTAT*T	6320.6	6322.0
BX''	[FAM]-AGTCTCGACTTGCT ^X A ^X T*T	6320.6	6322.0
BY	[FAM] ^Y A ^Y GTCTCGACTTGCTAT*T	6428.7	6430.0
BM	[FAM] ^M A ^M GTCTCGACTTGCTAT*T	6284.4	6286.0
BS	[FAM] ^S A ^S GTCTCGACTTGCTAT*T	6162.4	6163.5
K	[FAM]-AGTCTCGACTTGCTATT	5686.0	-

^{*} = 
^X = 
^Y = 
^M = 
^S = 





Эксперименты по проникновению были проведены на линии клеток НЕК293Т, на которой уже была показана эффективность внутриклеточного накопления гидрофобных триазиламидофосфатных олигонуклеотидов (см. разд. 4.6.3.1). Транфекцию проводили в течение 4 часов в среде DMEM без сыворотки олигонуклеотидами в концентрации 5 мкМ, после чего клетки анализировали на проточном цитофлуориметре с регистрацией

флуоресцентного сигнала; данные представляли в виде процента флуоресцирующих клеток и относительной интенсивности флуоресценции.

Первоначально была оценена эффективность проникновения серии олигонуклеотидов последовательности (А), содержащих разное количество ФГ-групп со стороны 5'-конца (олигонуклеотиды А, АХ, АХ2, АХ3, АХ4, АХ5); результаты анализа представлены на Рис. 72. Как можно видеть, введение двух ФГ-групп в состав додецил-содержащего триазиниламидофосфатного олигонуклеотида в район 5'-конца кратно повышает степень его внутриклеточного накопления – интенсивность флуоресценции для производного А составляет порядка $2,0 \cdot 10^5$ RFU, в то время как для ФГ-содержащего аналога АХ этот показатель равен примерно $7,6 \cdot 10^5$ RFU (Рис. 72, справа). При этом, последовательное увеличение числа ФГ-групп приводит к постепенному падению интенсивности флуоресценции трансфицированных клеток, несмотря на увеличение общей гидрофобности олигонуклеотидов. Так, для производного с двумя ФГ-группами АХ интенсивность флуоресценции составляет примерно $7,6 \cdot 10^5$ RFU, а для олигонуклеотида АХ5, содержащего 10 ФГ-групп, интенсивность флуоресценции снижается практически в два раза, и составляет $4,0 \cdot 10^5$ RFU. Подобный эффект снижения степени внутриклеточного накопления при увеличении количества ФГ-групп в составе самопроникающих олигонуклеотидов или олигонуклеотидов в липосомных комплексах уже был ранее описан в литературе [187]. Предположительно, данный эффект может быть связан с особенностями взаимодействия ФГ-содержащих олигонуклеотидов с фосфолипидной мембраной клетки.

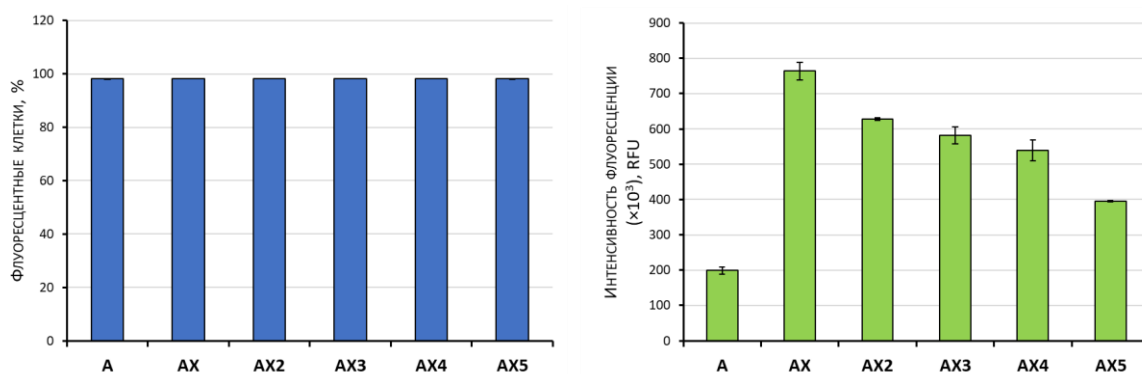


Рис. 72. Процент флуоресцентных клеток (слева) и интенсивность флуоресценции (справа) при трансфекции клеток НЕК293Т триазиниламидофосфатными олигонуклеотидами, содержащими различное количество дополнительных ФГ-групп. Концентрация олигонуклеотидов – 5 мкМ. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

Для более детального изучения характера накопления ФГ-содержащих триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов в клетках, были проведены кинетические эксперименты с использованием производных АХ и АХ5. Помимо стандартного времени

трансфекции (4 часа), клетки выдерживались в растворе олигонуклеотида в среде DMEM с концентрацией 5 мкМ в течение 1, 2, 8 и 24 часов. После определения флуоресцентного сигнала были построены кривые зависимости значений относительной интенсивности флуоресценции от времени трансфекции (Рис. 73а, сплошной красный квадрат (АХ), сплошной синий круг (АХ5)). Из результатов анализа видно, что в начальные моменты трансфекции (1, 2 и 4 часа) олигонуклеотид с двумя ФГ-группами АХ накапливается гораздо эффективнее аналога с 10 ФГ-группами, однако при увеличении времени трансфекции до 24 часов эффективность проникновения производных АХ и АХ5 выравнивается. Следовательно, олигонуклеотид АХ5 накапливается в клетках медленнее, чем олигонуклеотид АХ, но с сравнимой итоговой эффективностью (около $1,1 \cdot 10^6$ RFU). Дополнительно была изучена способность ФГ-содержащих триазиламидофосфатных олигонуклеотидов оставаться в клетках после накопления. Для этого после 4 часов трансфекции, клетки были отмыты от раствора олигонуклеотида и оставшееся время инкубация проводилась в стандартной среде DMEM. Интенсивность флуоресценции клеток после промывки ожидаемо снизилась, причем снижение флуоресценции для олигонуклеотида АХ проявлялось в большей степени, чем для олигонуклеотида АХ5 (Рис. 73а, пунктирный красный квадрат (АХ), пунктирный синий круг (АХ5)). Таким образом можно заключить, что увеличение числа ФГ-групп в составе олигонуклеотида увеличивает время его нахождения внутри клеток. Совокупность полученных результатов косвенно подтверждает предположение о влиянии взаимодействия ФГ-содержащих олигонуклеотидов с мембраной клеток на характер их внутриклеточного накопления, что в данной работе было продемонстрировано на примере триазиламидофосфатных олигонуклеотидов.

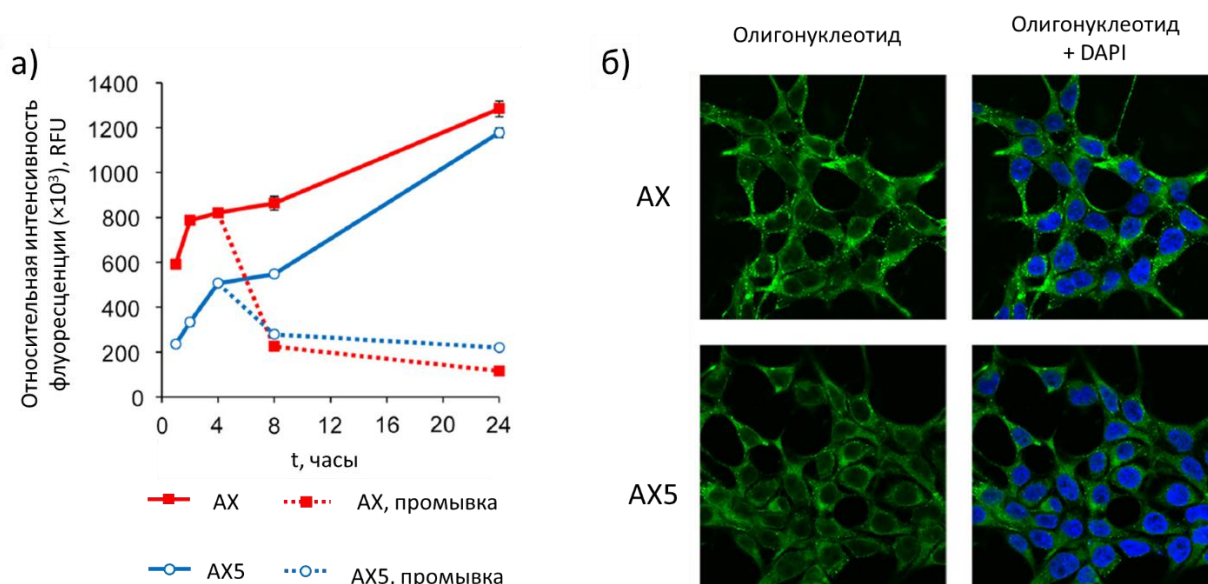


Рис. 73. Зависимость значений относительной интенсивности флуоресценции от времени для триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов с двумя (AX) и десятью (AX5) ФГ-группами при постоянной инкубации (сплошной красный квадрат (AX), сплошной синий круг (AX5)) и при смене среды после 4 часов трансфекции (пунктирный красный квадрат (AX), пунктирный синий круг (AX5)) (а); и снимки конфокальной микроскопии клеток после 4 часов трансфекции олигонуклеотидами AX и AX5 (б). Данные по интенсивности флуоресценции представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение; DAPI – краситель для ядер; концентрация олигонуклеотидов – 5 мкМ.

Помимо изучения кинетических особенностей накопления олигонуклеотидов AX и AX5, был определен характер их внутриклеточного распределения. Для этого клетки были проанализированы методом конфокальной микроскопии после 4 часов трансфекции. Как видно из результатов анализа, оба олигонуклеотида локализуются в цитоплазме и не проникают внутрь ядер (Рис. 73б). Также олигонуклеотид AX внутри клетки находится преимущественно в агрегированной форме, в то время как олигонуклеотид AX5 распределен более равномерно. Результаты анализа также подтверждают проникновение триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов внутрь клеток без прикрепления к внутренней стенке клеточной мембраны.

Для остальных производных, а именно холестеринных олигонуклеотидов (Н и НХ), триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов разной последовательности (А, АХ, В и ВХ), содержащих ФГ-группы в различных положениях цепи (ВХ, ВХ' и ВХ'') и содержащих различные фосфатные модификации (ВХ, ВУ, ВМ и ВS) (Табл. 6) также была определена эффективность внутриклеточного проникновения; результаты эксперимента представлены на Рис. 74.

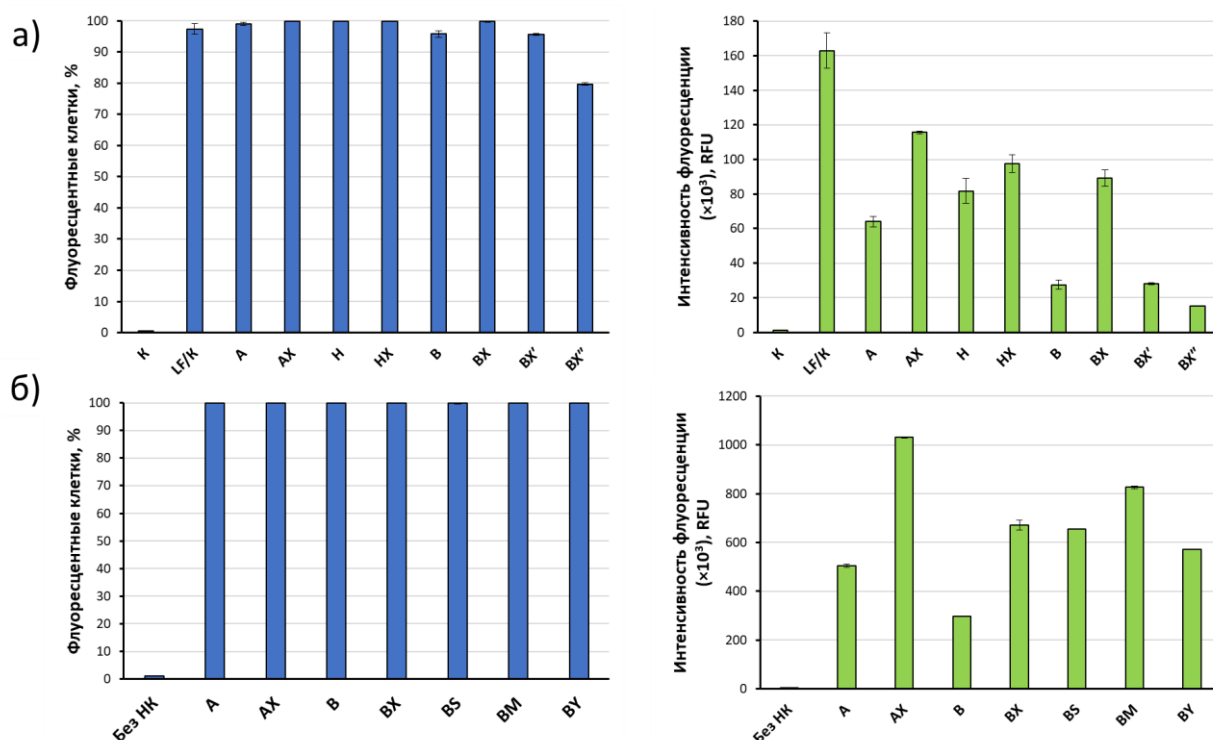


Рис. 74. Процент флуоресцентных клеток (слева) и интенсивность флуоресценции (справа) при трансфекции клеток НЕК293Т триазириламинофосфатными олигонуклеотидами с различными параметрами олигонуклеотидной системы (а) и содержащими различные дополнительные фосфатные модификации (б). Концентрация олигонуклеотидов – 5 мкМ. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

На основании полученных данных можно сделать несколько выводов. Во-первых, НК-последовательность в значительной мере влияет на эффективность проникновения триазириламинофосфатных производных – при одинаковой длине олигонуклеотидов А и В, степень их внутриклеточного накопления отличается кратно (Рис. 74а, справа). Природа гидрофобной группы также влияет на эффективность проникновения, что частично было показано ранее (см. разд. 4.6.3.1) – в данном эксперименте холестеринный олигонуклеотид Н накапливается лучше, чем триазириламинофосфатные аналоги А и В, хотя и не слишком значительно (Рис. 74а, справа).

Во-вторых, введение ФГ-групп в район 5'-конца повышает эффективность проникновения гидрофобных олигонуклеотидов вне зависимости от их последовательности (А против АХ, В против ВХ) и природы липофильной группы (А против АХ, Н против НХ). Стоит отметить, что данный эффект больше выражен для додецил-содержащих триазириламинофосфатных олигонуклеотидов, чем для холестеринных аналогов. Так, при введении ФГ-групп в последовательность (А) интенсивность флуоресценции возрастает примерно в 2 раза ($6,5 \cdot 10^4$ RFU (А) и $1,15 \cdot 10^5$ RFU (АХ)), в последовательность (В) – в 3 раза ($3,0 \cdot 10^4$ RFU (В) и $9,0 \cdot 10^4$ RFU (ВХ)), а в

холестерин-содержащий олигонуклеотид – всего на 25% ($8,0 \cdot 10^4$ RFU (H) и $1,0 \cdot 10^5$ RFU (HX)). Такая разница во влиянии ФГ-групп на степень накопления может быть связана с различными механизмами клеточного захвата для холестериновых и триазириламидофосфатных олигонуклеотидов, что требует, однако, дальнейших доказательств.

В-третьих, положение ФГ-групп в олигонуклеотидной цепи значительно влияет на эффективность проникновения. Так, производное BX', содержащее две ФГ-группы в середине цепи проникает в 3 раза хуже по сравнению с аналогом, содержащим модификации в районе 5'-конца ($9,0 \cdot 10^4$ RFU (BX) и $3,0 \cdot 10^4$ RFU (BX')), а олигонуклеотид BX'', содержащий ФГ-группы в непосредственной близости к триазириламидофосфату – в 6 раз хуже ($9,0 \cdot 10^4$ RFU (BX) и $1,5 \cdot 10^4$ RFU (BX'')). Учитывая одинаковый состав олигонуклеотидов и, как следствие, их равную гидрофобность, одна из причин таких различий может заключаться в эффективности образования супрамолекулярных комплексов, способствующих улучшенному проникновению, что было изучено в следующей части работы.

Наконец, в-четвертых, введение фосфатных модификаций в район 5'-конца олигонуклеотидов увеличивает эффективность их проникновения вне зависимости от природы используемых модификаций (Рис. 746, справа). Все олигонуклеотиды, несущие пирролидиновые фосфорилгуанидиновые (BY), тиофосфатные (BS) или мезильные (BM) группы повышают степень накопления исходного триазириламидофосфатного производного более чем в 2 раза. При этом изменение данного параметра в зависимости от структур фосфатных модификаций неочевидна. Так, олигонуклеотид BY, содержащий более объемную и гидрофобную ФГ-модификацию, проникает хуже производного BX с менее объемной ФГ-группой. С наибольшей эффективностью накапливается мезильное производное BM, несмотря на наименьшую гидрофобность данной группы. Вероятно, причина таких различий, как и в случае для производных BX, BX' и BX'', может быть связана с различной эффективностью образования супрамолекулярных комплексов.

Для определения возможной корреляции между эффективностью проникновения триазириламидофосфатных олигонуклеотидов с дополнительными модификациями и способностью образования супрамолекулярных мицеллоподобных комплексов, исследуемые производные были проанализированы методом динамического светорассеяния (ДСР). Условия эксперимента были выбраны аналогичными таковым при трансфекции клеток олигонуклеотидами (5 мкМ раствор в среде DMEM, 4 часа) для максимально корректной имитации возможных НК-структур, контактирующих с клеткой,

и интерпретации результатов анализа. Полученные данные ДСР-анализа после 10 измерений с равным временным интервалом в виде усредненных значений распределения по размеру частиц в зависимости от числа зарегистрированных сигналов представлены на Рис. 75.

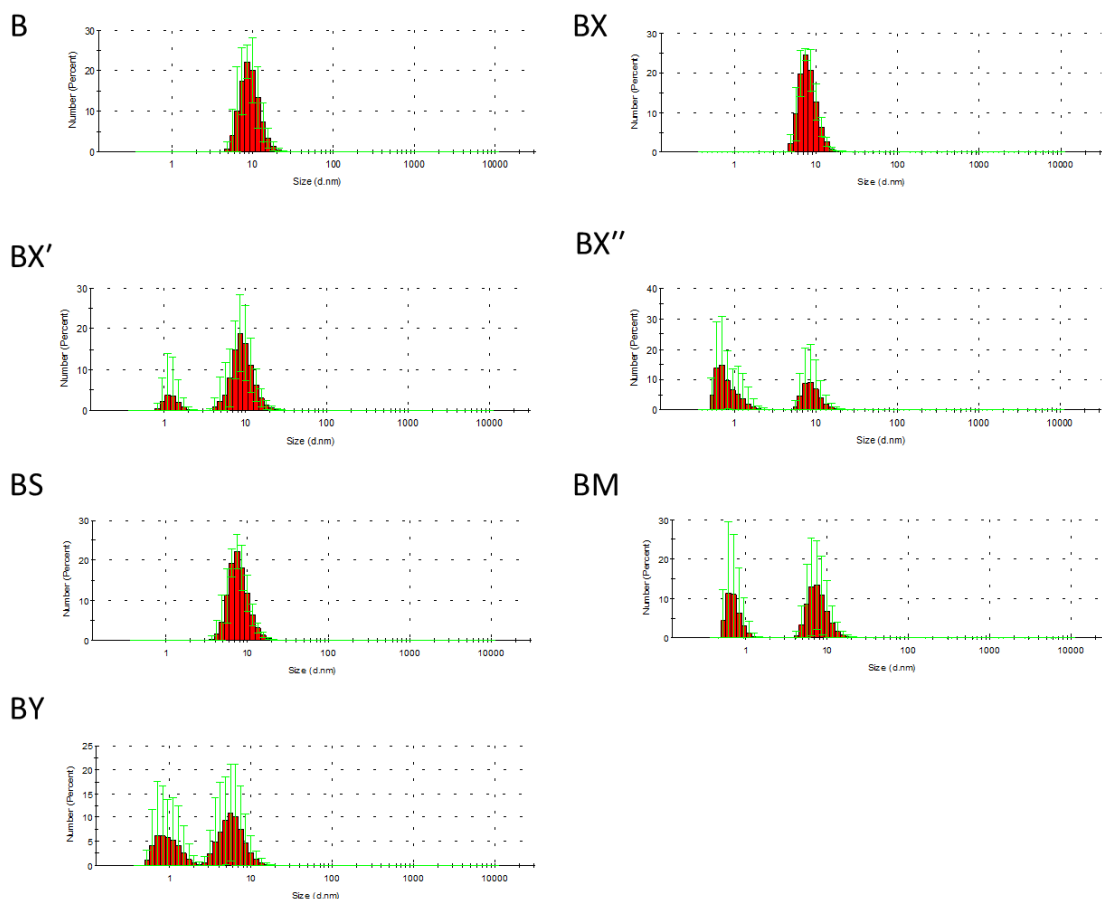


Рис. 75. Графики зависимости распределения значений размера частиц от числа измерений для додецил-содержащих триазириламидофосфатных производных в виде 5 мкМ растворов в DMEM-среде после 10 измерений в течение 4 часов. Ось X – размер частиц, нм; ось Y – число измерений, проценты. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

Из полученных данных видно, что триазириламидофосфатный олигонуклеотид В, как и его ФГ-содержащий аналог ВХ, образуют стабильные частицы со средним гидродинамическим диаметром около 10 нм, что в целом согласуется с литературными данными по схожим олигонуклеотидным системам [218]. В то же время, при постепенном перемещении ФГ-групп в сторону 3'-конца, в растворе олигонуклеотидов детектируется большое количество неупорядоченных структур (производные ВХ' и ВХ'', Рис. 75). Учитывая снижение интенсивности флуоресценции клеток при таком же перемещении ФГ-групп в составе производных, можно утверждать о наличии некоторой корреляции между эффективностью проникновения и образованием мицеллоподобных структур в растворе олигонуклеотидов. С другой стороны, мезил-содержащий триазириламидофосфатный

олигонуклеотид ВМ, обладающий наибольшей эффективностью проникновения среди производных, содержащих различные дополнительные фосфатные модификации, находится в растворе как в форме супрамолекулярного комплекса, так и в неупорядоченной форме. Среди таких производных наиболее упорядоченной структурой обладают ФГ-содержащий (ВХ) и тиофосфатный (BS) олигонуклеотиды, которые обеспечивают примерно равную степень внутриклеточного накопления. Примечательно, что даже при незначительном изменении структуры фосфатной модификации способность к агрегации меняется существенно – так пирролидин-содержащий фосфорилгуанидиновый олигонуклеотид ВУ образует значительно меньше мицеллоподобных структур по сравнению с более компактным аналогом ВХ. Таким образом, четкой корреляции между эффективностью проникновения и способностью олигонуклеотидов образовывать супрамолекулярные комплексы не существует. Для более детального определения причин различий в степени внутриклеточного накопления в зависимости от различных параметров системы следует провести более детальное исследование, в том числе и касающееся механизмов клеточного захвата соответствующих производных.

По совокупности полученных результатов можно заключить, что додецил-содержащие триазириламидофосфатные олигонуклеотиды проникают в клетки с очень высокой эффективностью. Взаимное расположение додецильных остатков в триазиновом остове модификации является наиболее предпочтительным для захвата клеткой среди всех других исследованных додецил-содержащих НК-производных. При варьировании некоторых параметров олигонуклеотидной системы, например, при введении дополнительных фосфатных модификаций, возможно еще больше повысить эффективность накопления додецильных триазириламидофосфатов. Таким образом, разработанный класс модифицированных олигонуклеотидов может быть использован в качестве удобного инструмента для внутриклеточной доставки различных НК-конструкций.

4.7. Заключение

В ходе выполнения данной работы был предложен основной подход к получению нового класса триазириламидофосфатных НК-производных, основанный на взаимодействии фосфит-триэфирного звена олигонуклеотида с различными 2-азидо-1,3,5-триазинами по реакции Штаудингера. При разработке различных способов в рамках единого подхода была показана строгая зависимость эффективности протекания реакции

Штаудингера от донорно-акцепторных свойств заместителей в составе триазинового остова реагентов-модификаторов. Так, например, при использовании 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазинов реакция Штаудингера протекает с эффективностью, не превышающей 15%, в то время как применение самого реакционноспособного из таких модификаторов – 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина – обеспечивает практически количественное встраивание триазинового остова в состав олигонуклеотида. При исследовании реакционной способности азидо-триазинов также были определены некоторые ключевые факторы, влияющие на эффективность получения триазиниламидофосфатных групп. В частности, было показано, что включение в синтетическую схему отдельного этапа β -элиминирования 2-цианоэтильной группы значительно повышает выходы целевых продуктов за счет перевода триазинилфосфазенового интермедиата реакции в более стабильную амидофосфатную форму. Кроме того, было установлено, что присутствие воды в используемых растворах может приводить к деградации как фосфазенового, так и амидофосфатного звена. Определение данных факторов позволило в значительной степени оптимизировать процесс получения исследуемых НК-производных.

С применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина получена широкая библиотека функционализированных триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов. После проведения реакции Штаудингера и этапа β -элиминирования образуется активное промежуточное соединение, содержащее атомы хлора, которое является общим прекурсором для получения всех триазиниламидофосфатов. Такая прекурсорная стратегия позволяет гибко варьировать вводимые в состав триазинового остова функциональные группы. В частности, в состав триазинового ядра модификации были введены различные гидрофобные и катионные группы, которые являются распространенными вариантами функциональных групп олигонуклеотидов, а также концевые остатки аминов и спиртов. Кроме того, была показана возможность введения сложных заместителей путем поэтапной сборки на твердофазном носителе с получением уникальных структур, что дополнительно повышает гибкость предлагаемого подхода. Другой тип реагентов – 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазины – был использован для получения триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов с несимметрично замещенным триазиновым остовом, содержащим два различных функциональных заместителя. Введение таких модификаций позволяет еще более тонко настраивать свойства создаваемых НК-конструкций. На примере компактных 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов была показана возможность введения триазиниламидофосфатной модификации в полностью автоматическом режиме за счет их промежуточной реакционной способности. Данная особенность позволит более

эффективно получать в том числе и множественно модифицированные олигонуклеотиды, что дополнительно расширяет границы применимости разработанного подхода.

В ходе исследования физико-химических свойств некоторых представителей класса триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов была продемонстрирована их высокая химическая и ферментативная устойчивость. Модификация остается стабильной при обработке олигонуклеотида сильнокислым или сильнощелочным раствором, а также практически не расщепляется при инкубации олигонуклеотида с нуклеазами цельноклеточных экстрактов. Такие свойства триазиниламидофосфатной группы можно использовать, например, при разработке антисмысловых препаратов гапмерного типа для стабилизации концевых участков. На примере компактных триазиниламидофосфатных модификаций показана лишь незначительная дестабилизация соответствующих дуплексов олигонуклеотидов, в том числе и множественно модифицированных. Степень дестабилизации, однако, зависит от нуклеотидного контекста и расположения модификации в цепи, что следует учитывать при дизайне триазиниламидофосфатных НК-конструкций для конкретных приложений.

В качестве одного из самых важных результатов работы можно привести доказанную высокую эффективность проникновения триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов на примере додецил-содержащего производного. Было показано, что такой модифицированный олигонуклеотид накапливается в клетках с эффективностью, сопоставимой с доставкой нативного олигонуклеотида коммерчески доступным реагентом Lipofectamine2000. Кроме того, было обнаружено, что додецил-содержащий триазиниламидофосфатный олигонуклеотид проникает в клетки лучше остальных гидрофобных НК-производных, несущих додецильные остатки на разных остовах. Данный факт можно объяснить влиянием взаимного расположения додецильных остатков в составе олигонуклеотида на эффективность проникновения, которое в случае триазиниламидофосфатного производного наиболее предпочтительно. Также была определена роль различных параметров олигонуклеотидной системы на эффективность проникновения триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов. Варьирование таких параметров, как наличие и количество дополнительных фосфатных модификаций, нуклеотидная последовательность, расположение фосфатных модификаций внутри цепи и их природа, может значительно влиять на степень внутриклеточного накопления. В частности, было обнаружено, что введение дополнительных фосфорилгуанидиновых групп в район 5'-конца олигонуклеотида, содержащего триазиниламидофосфатную модификацию при 3'-конце, способно кратно повысить эффективность проникновения. В целом можно

заклучить, что додецил-содержащие триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды являются удобным и перспективным инструментом доставки НК в клетки.

Таким образом, в ходе данной работы был разработан подход к получению нового класса модифицированных нуклеиновых кислот, а именно триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов, обеспечивающий возможность широкой функционализации олигонуклеотидов, а также определен ряд свойств некоторых представителей класса, указывающих на высокий терапевтический потенциал триазиниламидофосфатных производных.

5. ВЫВОДЫ

1. Разработан подход к получению нового класса модифицированных олигонуклеотидов, а именно триазиниламидофосфатных производных, основанный на реакции Штаудингера с применением азидо-триазинов различной структуры. Показана прямая зависимость эффективности введения модификации от донорно-акцепторных свойств заместителей в составе азидо-триазинов. В ходе оптимизации процесса получения триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов с использованием в качестве реагента-модификатора 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина установлена ключевая роль реакции β -элиминирования 2-цианоэтильных защитных групп.

2. Продемонстрирована возможность широкой функционализации олигонуклеотидов с применением разработанного подхода:

- С применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина получен набор триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов, содержащих гидрофобные и катионные группы, остатки аминов и спиртов, а также сложные заместители, последовательно собранные на твердофазном носителе;
- С применением различных 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов получены производные, несущие в триазиновом остове два различных заместителя, в том числе и комбинацию гидрофобных и катионных.

3. Обнаружено, что триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды стабильны в кислых и щелочных условиях ($\text{pH} = 1$ и $\text{pH} = 12$), не обладают выраженной цитотоксичностью на линиях клеток НЕК293Т и Т98G ($\text{IC}_{50} > 30$ мкМ), незначительно дестабилизируют дуплекс ДНК/ДНК, а также практически не деградируют при обработке нуклеазами цельноклеточных экстрактов, особенно в дуплексной форме.

4. Для додецил-содержащего триазиниламидофосфатного олигонуклеотида показана высокая эффективность проникновения в клетки НЕК293Т, в 2 раза превышающая другие додецил-содержащие НК-производные, а также сопоставимая с доставкой олигонуклеотидов коммерческим реагентом Lipofectamine2000. Подобные олигонуклеотиды воспроизводимо накапливаются в 100% клеток.

5. Выявлено, что на эффективность проникновения додецил-содержащих триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов влияют ряд параметров, а именно наличие, количество и тип дополнительных фосфатных модификаций, в том числе и фосфорилгуанидиновых, их расположение в олигонуклеотидной цепи, нуклеотидный состав последовательности. Показан как положительный, так и отрицательный эффект варьирования таких параметров на степень внутриклеточного накопления.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khvorova, A., Watts, J. K. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility // *Nat. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 35. – N. 3. – P. 238–248.
2. Belgrad, J., Fakih, H. H., Khvorova, A. Nucleic Acid Therapeutics: Successes, Milestones, and Upcoming Innovation // *Nucleic Acid Ther.* – 2024. – Vol. 34. – N. 2. – P. 52–72.
3. Gao, J., Nutan, B., Gargouri, D., Pisal, N. D., Do, V., Zubair, M., Alanzi, H., Wang, H., Lee, D., Joshi, N., Ullah, A. Unlocking the Potential of Chemically Modified Nucleic Acid Therapeutics // *Adv. Ther.* – 2024. – Vol. 7. – N. 11. – P. 1–29.
4. Vinjamuri, B. P., Pan, J., Peng, P. A review on commercial oligonucleotide drug products // *J. Pharm. Sci.* – 2024. – Vol. 113. – N. 7. – P. 1749–1768.
5. Rinaldi, C., Wood, M. J. A. Antisense oligonucleotides : the next frontier for treatment of neurological disorders // *Nat. Rev. Neurol.* – 2017. – Vol. 14. – N. 1. – P. 9–21.
6. Egli, M., Manoharan, M. Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – Vol. 51. – N. 6. – P. 2529–2573.
7. Østergaard, M. E., Jackson, M., Low, A., E Chappell, A., G Lee, R., Peralta, R. Q., Yu, J., Kinberger, G. A., Dan, A., Carty, R., Tanowitz, M., Anderson, P., Kim, T. W., Fradkin, L., Mullick, A. E., Murray, S., Rigo, F., Prakash, T. P., Bennett, C. F., Swayze, E. E., Gaus, H. J., Seth, P. P. Conjugation of hydrophobic moieties enhances potency of antisense oligonucleotides in the muscle of rodents and non-human primates // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – Vol. 47. – N. 12. – P. 6045–6058.
8. Crooke, S. T., Vickers, T. A., Liang, X. H. Phosphorothioate modified oligonucleotide-protein interactions // *Nucleic Acids Res.* – 2021. – Vol. 48. – N. 10. – P. 5235–5253.
9. Schultz, R. G., Gryaznov, S. M. Oligo-2'-fluoro-2'-deoxynucleotide N3'→P5' phosphoramidates: Synthesis and properties // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – Vol. 24. – N. 15. – P. 2966–2973.
10. Kandasamy, P., Liu, Y., Aduda, V., Akare, S., Alam, R., Andreucci, A., Boulay, D., Bowman, K., Byrne, M., Cannon, M., Chivatakarn, O., Shelke, J. D., Iwamoto, N., Kawamoto, T., Kumarasamy, J., Lamore, S., Lemaitre, M., Lin, X., Longo, K., Looby, R., Marappan, S., Metterville, J., Mohapatra, S., Newman, B., Paik, I. H., Patil, S., Purcell-Estabrook, E., Shimizu, M., Shum, P., Standley, S., Taborn, K., Tripathi, S., Yang, H., Yin, Y., Zhao, X., Dale, E., Vargeese, C. Impact of guanidine-containing backbone linkages on stereopure antisense oligonucleotides in the CNS // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – Vol. 50. – N. 10. – P. 5401–5423.
11. Kandasamy, P., McClorey, G., Shimizu, M., Kothari, N., Alam, R., Iwamoto, N., Kumarasamy, J., Bommineni, G. R., Bezigian, A., Chivatakarn, O., Butler, D. C. D., Byrne, M., Chwalenia, K., Davies, K. E., Desai, J., Shelke, J. D., Durbin, A. F., Ellerington, R., Edwards,

- B., Godfrey, J., Hoss, A., Liu, F., Longo, K., Lu, G., Marappan, S., Oieni, J., Paik, I. H., Estabrook, E. P., Shivalila, C., Tischbein, M., Kawamoto, T., Rinaldi, C., Rajão-Saraiva, J., Tripathi, S., Yang, H., Yin, Y., Zhao, X., Zhou, C., Zhang, J., Apponi, L., Wood, M. J. A., Vargeese, C. Control of backbone chemistry and chirality boost oligonucleotide splice switching activity // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – Vol. 50. – N. 10. – P. 5443–5466.
12. Chang, P. K., Welch, A. D. Iodination of 2'-Deoxycytidine and Related Substances // *J. Med. Chem.* – 1963. – Vol. 6. – N. 4. – P. 428–430.
13. Gannett, P. M., Sura, T. P. An improved synthesis of 8-bromo-2'-deoxyguanosine // *Synth. Commun.* – 1993. – Vol. 23. – N. 11. – P. 1611–1615.
14. Liang, Y., Wnuk, S. F. Modification of purine and pyrimidine nucleosides by direct C-H bond activation // *Molecules.* – 2015. – Vol. 20. – N. 3. – P. 4874–4901.
15. Müggenburg, F., Müller, S. Azide-Modified Nucleosides as Versatile Tools for Bioorthogonal Labeling and Functionalization // *Chem. Rec.* – 2022. – Vol. 22. – N. 5. – P. 1–13.
16. Krasheninina, O. A., Thaler, J., Erlacher, M. D., Micura, R. Amine-to-Azide Conversion on Native RNA via Metal-Free Diazotransfer Opens New Avenues for RNA Manipulations // *Angew. Chemie - Int. Ed.* – 2021. – Vol. 60. – N. 13. – P. 6970–6974.
17. Balintová, J., Špaček, J., Pohl, R., Brázdová, M., Havran, L., Fojta, M., Hocek, M. Azidophenyl as a click-transformable redox label of DNA suitable for electrochemical detection of DNA-protein interactions // *Chem. Sci.* – 2015. – Vol. 6. – N. 1. – P. 575–587.
18. Neef, A. B., Luedtke, N. W. An azide-modified nucleoside for metabolic labeling of DNA // *ChemBioChem.* – 2014. – Vol. 15. – N. 6. – P. 789–793.
19. Gourdain, S., Petermann, C., Harakat, D., Clivio, P. Highly efficient and facile synthesis of 5-azido-2'-deoxyuridine // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* – 2010. – Vol. 29. – N. 7. – P. 542–546.
20. Graham, D., Parkinson, J. A., Brown, T. DNA duplexes stabilized by modified monomer residues: Synthesis and stability // *J. Chem. Soc. - Perkin Trans. 1.* – 1998. – N. 6. – P. 1131–1138.
21. Seela, F., Sirivolu, V. R., Chittepu, P. Modification of DNA with octadiynyl side chains: Synthesis, base pairing, and formation of fluorescent coumarin dye conjugates of four nucleobases by the alkyne-azide “click” reaction // *Bioconjug. Chem.* – 2008. – Vol. 19. – N. 1. – P. 211–224.
22. Salic, A., Mitchison, T. J. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2008. – Vol. 105. – N. 7. – P. 2415–2420.
23. Ding, P., Wunnicke, D., Steinhoff, H. J., Seela, F. Site-directed spin-labeling of DNA by the

- azide-alkyne “Click” reaction: Nanometer distance measurements on 7-deaza-2'-deoxyadenosine and 2'-deoxyuridine nitroxide conjugates spatially separated or linked to a “dA-dT” base pair // *Chem. - A Eur. J.* – 2010. – Vol. 16. – N. 48. – P. 14385–14396.
24. Slavíčková, M., Janoušková, M., Šimonová, A., Cahová, H., Kambová, M., Šanderová, H., Krásný, L., Hocek, M. Turning Off Transcription with Bacterial RNA Polymerase through CuAAC Click Reactions of DNA Containing 5-Ethynyluracil // *Chem. - A Eur. J.* – 2018. – Vol. 24. – N. 33. – P. 8311–8314.
25. Gierlich, J., Gutsmedl, K., Gramlich, P. M. E., Schmidt, A., Burley, G. A., Carell, T. Synthesis of highly modified DNA by a combination of PCR with alkyne-bearing triphosphates and click chemistry // *Chem. - A Eur. J.* – 2007. – Vol. 13. – N. 34. – P. 9486–9494.
26. Panattoni, A., Pohl, R., Hocek, M. Flexible Alkyne-Linked Thymidine Phosphoramidites and Triphosphates for Chemical or Polymerase Synthesis and Fast Postsynthetic DNA Functionalization through Copper-Catalyzed Alkyne-Azide 1,3-Dipolar Cycloaddition // *Org. Lett.* – 2018. – Vol. 20. – N. 13. – P. 3962–3965.
27. Kennedy, D. C., McKay, C. S., Legault, M. C. B., Danielson, D. C., Blake, J. A., Pegoraro, A. F., Stolor, A., Mester, Z., Pezacki, J. P. Cellular consequences of copper complexes used to catalyze bioorthogonal click reactions // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – Vol. 133. – N. 44. – P. 17993–18001.
28. Ren, X., Gerowska, M., El-Sagheer, A. H., Brown, T. Enzymatic incorporation and fluorescent labelling of cyclooctyne-modified deoxyuridine triphosphates in DNA // *Bioorganic Med. Chem.* – 2014. – Vol. 22. – N. 16. – P. 4384–4390.
29. Ren, X., El-Sagheer, A. H., Brown, T. Efficient enzymatic synthesis and dual-colour fluorescent labelling of DNA probes using long chain azido-dUTP and BCN dyes // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Vol. 44. – N. 8. – P. e79.
30. Ren, X., El-Sagheer, A. H., Brown, T. Azide and trans-cyclooctene dUTPs: Incorporation into DNA probes and fluorescent click-labelling // *Analyst.* – 2015. – Vol. 140. – N. 8. – P. 2671–2678.
31. Abendroth, F., Seitz, O. Double-Clicking Peptides onto Phosphorothioate Oligonucleotides: Combining Two Proapoptotic Agents in One Molecule // *Angew. Chemie.* – 2014. – Vol. 126. – N. 39. – P. 10672–10677.
32. Eördögh, Á., Steinmeyer, J., Peewasan, K., Schepers, U., Wagenknecht, H. A., Kele, P. Polarity Sensitive Bioorthogonally Applicable Far-Red Emitting Labels for Postsynthetic Nucleic Acid Labeling by Copper-Catalyzed and Copper-Free Cycloaddition // *Bioconjug. Chem.* – 2016. – Vol. 27. – N. 2. – P. 457–464.
33. Gutsmedl, K., Fazio, D., Carell, T. High-density DNA functionalization by a combination of

- Cu-catalyzed and Cu-free click chemistry // *Chem. - A Eur. J.* – 2010. – Vol. 16. – N. 23. – P. 6877–6883.
34. Wang, K., Wang, D., Ji, K., Chen, W., Zheng, Y., Dai, C., Wang, B. Post-synthesis DNA modifications using a trans-cyclooctene click handle // *Org. Biomol. Chem.* – 2015. – Vol. 13. – N. 3. – P. 909–915.
35. Reisacher, U., Ploschik, D., Röncke, F., Cserép, G. B., Kele, P., Wagenknecht, H. A. Copper-free dual labeling of DNA by triazines and cyclopropenes as minimal orthogonal and bioorthogonal functions // *Chem. Sci.* – 2019. – Vol. 10. – N. 14. – P. 4032–4037.
36. Borsenberger, V., Howorka, S. Diene-modified nucleotides for the Diels-Alder-mediated functional tagging of DNA // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – Vol. 37. – N. 5. – P. 1477–1485.
37. Clovis, J. S., Eckell, A., Huisgen, R., Sustmann, R. 1.3-Dipolare Cycloadditionen, XXV. Der Nachweis des freien Diphenylnitrilimins als Zwischenstufe bei Cycloadditionen // *Chem. Ber.* – 1967. – Vol. 100. – N. 1. – P. 60–70.
38. Lehmann, B., Wagenknecht, H. A. Fluorogenic “photoclick” labelling of DNA using a Cy3 dye // *Org. Biomol. Chem.* – 2018. – Vol. 16. – N. 41. – P. 7579–7582.
39. Wu, Y., Guo, G., Zheng, J., Xing, D., Zhang, T. Fluorogenic “photoclick” Labeling and Imaging of DNA with Coumarin-Fused Tetrazole in Vivo // *ACS Sensors.* – 2019. – Vol. 4. – N. 1. – P. 44–51.
40. Raiber, E. A., Hardisty, R., van Delft, P., Balasubramanian, S. Mapping and elucidating the function of modified bases in DNA // *Nat. Rev. Chem.* – 2017. – Vol. 1. – N. 9. – P. 1–13.
41. Sugiyama, H., Matsuda, S., Kino, K., Zhang, Q. M., Yonei, S., Saito, I. New synthetic method of 5-formyluracil-containing oligonucleotides and their melting behavior // *Tetrahedron Lett.* – 1996. – Vol. 37. – N. 50. – P. 9067–9070.
42. Münzel, M., Lischke, U., Stathis, D., Pfaffeneder, T., Gnerlich, F. A., Deiml, C. A., Koch, S. C., Karaghiosoff, K., Carell, T. Improved synthesis and mutagenicity of oligonucleotides containing 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine // *Chem. - A Eur. J.* – 2011. – Vol. 17. – N. 49. – P. 13782–13788.
43. Liu, C., Luo, X., Chen, Y., Wu, F., Yang, W., Wang, Y., Zhang, X., Zou, G., Zhou, X. Selective Labeling Aldehydes in DNA // *Anal. Chem.* – 2018. – Vol. 90. – N. 24. – P. 14616–14621.
44. Guo, P., Yan, S., Hu, J., Xing, X., Wang, C., Xu, X., Qiu, X., Ma, W., Lu, C., Weng, X., Zhou, X. Selective detection of 5-formyl-2'-deoxycytidine in DNA using a fluorogenic hydroxylamine reagent // *Org. Lett.* – 2013. – Vol. 15. – N. 13. – P. 3266–3269.
45. Hardisty, R. E., Kawasaki, F., Sahakyan, A. B., Balasubramanian, S. Selective Chemical Labeling of Natural T Modifications in DNA // *J. Am. Chem. Soc.* – 2015. – Vol. 137. – N. 29. –

P. 9270–9272.

46. Wang, S. R., Song, Y. Y., Wei, L., Liu, C. X., Fu, B. S., Wang, J. Q., Yang, X. R., Liu, Y. N., Liu, S. M., Tian, T., Zhou, X. Cucurbit[7]uril-Driven Host-Guest Chemistry for Reversible Intervention of 5-Formylcytosine-Targeted Biochemical Reactions // *J. Am. Chem. Soc.* – 2017. – Vol. 139. – N. 46. – P. 16903–16912.
47. Liu, C., Chen, Y., Wang, Y., Wu, F., Zhang, X., Yang, W., Wang, J., Chen, Y., He, Z., Zou, G., Wang, S., Zhou, X. A highly efficient fluorescence-based switch-on detection method of 5-formyluracil in DNA // *Nano Res.* – 2017. – Vol. 10. – N. 7. – P. 2449–2458.
48. Wang, Y., Liu, C., Yang, W., Zou, G., Zhang, X., Wu, F., Yu, S., Luo, X., Zhou, X. Naphthalimide derivatives as multifunctional molecules for detecting 5-formylpyrimidine by both PAGE analysis and dot-blot assays // *Chem. Commun.* – 2018. – Vol. 54. – N. 12. – P. 1497–1500.
49. Raiber, E. A., Portella, G., Martínez Cuesta, S., Hardisty, R., Murat, P., Li, Z., Iurlaro, M., Dean, W., Spindel, J., Beraldi, D., Liu, Z., Dawson, M. A., Reik, W., Balasubramanian, S. 5-Formylcytosine organizes nucleosomes and forms Schiff base interactions with histones in mouse embryonic stem cells // *Nat. Chem.* – 2018. – Vol. 10. – N. 12. – P. 1258–1266.
50. Ji, S., Fu, I., Naldiga, S., Shao, H., Basu, A. K., Broyde, S., Tretyakova, N. Y. 5-Formylcytosine mediated DNA-protein cross-links block DNA replication and induce mutations in human cells // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – Vol. 46. – N. 13. – P. 6455–6469.
51. Liu, C., Wang, Y., Zhang, X., Wu, F., Yang, W., Zou, G., Yao, Q., Wang, J., Chen, Y., Wang, S., Zhou, X. Enrichment and fluorogenic labelling of 5-formyluracil in DNA // *Chem. Sci.* – 2017. – Vol. 8. – N. 6. – P. 4505–4510.
52. Hirose, W., Sato, K., Matsuda, A. Selective detection of 5-formyl-2'-deoxyuridine, an oxidative lesion of thymidine, in DNA by a fluorogenic reagent // *Angew. Chemie - Int. Ed.* – 2010. – Vol. 49. – N. 45. – P. 8392–8394.
53. Zhou, Q., Li, K., Liu, Y. H., Li, L. L., Yu, K. K., Zhang, H., Yu, X. Q. Fluorescent Wittig reagent as a novel ratiometric probe for the quantification of 5-formyluracil and its application in cell imaging // *Chem. Commun.* – 2018. – Vol. 54. – N. 97. – P. 13722–13725.
54. Samanta, B., Seikowski, J., Höbartner, C. Fluorogenic Labeling of 5-Formylpyrimidine Nucleotides in DNA and RNA // *Angew. Chemie - Int. Ed.* – 2016. – Vol. 55. – N. 5. – P. 1912–1916.
55. Dadová, J., Orság, P., Pohl, R., Brázdová, M., Fojta, M., Hocek, M. Vinylsulfonamide and acrylamide modification of DNA for cross-linking with proteins // *Angew. Chemie - Int. Ed.* – 2013. – Vol. 52. – N. 40. – P. 10515–10518.
56. Eberhard, H., Diezmann, F., Seitz, O. DNA as a Molecular Ruler: Interrogation of a Tandem

- SH2 Domain with Self-Assembled, Bivalent DNA–Peptide Complexes // *Angew. Chemie.* – 2011. – Vol. 123. – N. 18. – P. 4232–4236.
57. Matyášovský, J., Perlíková, P., Malnuit, V., Pohl, R., Hocek, M. 2-Substituted dATP Derivatives as Building Blocks for Polymerase-Catalyzed Synthesis of DNA Modified in the Minor Groove // *Angew. Chemie.* – 2016. – Vol. 128. – N. 51. – P. 16088–16091.
58. Saxon, E., Bertozzi, C. R. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction // *Science* (80-.). – 2000. – Vol. 287. – N. 5460. – P. 2007–2010.
59. Weisbrod, S. H., Marx, A. A nucleoside triphosphate for site-specific labelling of DNA by the Staudinger ligation // *Chem. Commun.* – 2007. – N. 18. – P. 1828–1830.
60. Olszewska, A., Pohl, R., Brázdová, M., Fojta, M., Hocek, M. Chloroacetamide-Linked Nucleotides and DNA for Cross-Linking with Peptides and Proteins // *Bioconjug. Chem.* – 2016. – Vol. 27. – N. 9. – P. 2089–2094.
61. Probst, N., Lartia, R., Théry, O., Alami, M., Defrancq, E., Messaoudi, S. Efficient Buchwald–Hartwig–Migita Cross-Coupling for DNA Thioglycoconjugation // *Chem. - A Eur. J.* – 2018. – Vol. 24. – N. 8. – P. 1795–1800.
62. Diezmann, F., Eberhard, H., Seitz, O. Native chemical ligation in the synthesis of internally modified oligonucleotide-peptide conjugates. // *Biopolymers.* – 2010. – Vol. 94. – N. 4. – P. 397–404.
63. Wu, Q., Amrutkar, S. M., Shao, F. Sulfinate Based Selective Labeling of 5-Hydroxymethylcytosine: Application to Biotin Pull Down Assay // *Bioconjug. Chem.* – 2018. – Vol. 29. – N. 2. – P. 245–249.
64. Williams, D. M., Benseler, F., Eckstein, F. Properties of 2'-Fluorothymidine-Containing Oligonucleotides: Interaction with Restriction Endonuclease EcoRV // *Biochemistry.* – 1991. – Vol. 30. – N. 16. – P. 4001–4009.
65. Inoue, H., Hayase, Y., Imura, A., Iwai, S., Miura, K., Ohtsuka, E. Synthesis and hybridization studies on two complementary nona(2'-O-methyl)ribonucleotides // *Nucleic Acids Res.* – 1987. – Vol. 15. – N. 15. – P. 6131–6148.
66. Pierre, M. Ein neuer Zugang zu 2'-O-(2-Methoxyethyl)ribonucleosiden ausgehend von D-Glucose // *Helv. Chim. Acta.* – 2003. – Vol. 86. – N. 1. – P. 204–209.
67. Ross, B. S., Song, Q., Han, M. Kilo-scale synthesis process for 2'-O-(2-methoxyethyl)-pyrimidine derivatives // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* – 2005. – Vol. 24. – N. 5–7. – P. 815–818.
68. Manoharan, M. 2'-Carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: Importance of conformation, configuration and conjugation // *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* – 1999. – Vol. 1489. – N. 1. – P. 117–130.

69. Schröder, A. S., Kotljarova, O., Parsa, E., Iwan, K., Raddaoui, N., Carell, T. Synthesis of (R)-Configured 2'-Fluorinated mC, hmC, fC, and caC Phosphoramidites and Oligonucleotides // *Org. Lett.* – 2016. – Vol. 18. – N. 17. – P. 4368–4371.
70. Prakash, T. P. An overview of sugar-modified oligonucleotides for antisense therapeutics // *Chem. Biodivers.* – 2011. – Vol. 8. – N. 9. – P. 1616–1641.
71. Hara, R. I., Kageyama, M., Arai, K., Uchiyama, N., Wada, T. Synthesis of 2'-O-monohaloethoxymethyl-modified RNAs and their duplex formation ability // *RSC Adv.* – 2017. – Vol. 7. – N. 65. – P. 41297–41303.
72. Pasternak, A., Wengel, J. Unlocked nucleic acid - An RNA modification with broad potential // *Org. Biomol. Chem.* – 2011. – Vol. 9. – N. 10. – P. 3591–3597.
73. Jensen, T. B., Henriksen, J. R., Rasmussen, B. E., Rasmussen, L. M., Andresen, T. L., Wengel, J., Pasternak, A. Thermodynamic and biological evaluation of a thrombin binding aptamer modified with several unlocked nucleic acid (UNA) monomers and a 2'-C-piperazino-UNA monomer // *Bioorganic Med. Chem.* – 2011. – Vol. 19. – N. 16. – P. 4739–4745.
74. Karlsen, K. K., Jensen, T. B., Wengel, J. Synthesis of an unlocked nucleic acid terpyridine monomer and binding of divalent metal ion in nucleic acid duplexes // *J. Org. Chem.* – 2009. – Vol. 74. – N. 22. – P. 8838–8841.
75. Karlsen, K. K., Pasternak, A., Jensen, T. B., Wengel, J. Pyrene-Modified Unlocked Nucleic Acids: Synthesis, Thermodynamic Studies, and Fluorescent Properties // *ChemBioChem.* – 2012. – Vol. 13. – N. 4. – P. 590–601.
76. Singh, S. K., Nielsen, P., Koshkin, A. a., Wengel, J. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition // *Chem. Commun.* – 1998. – Vol. 4. – P. 455–456.
77. Youssefeyeh, R. D., Verheyden, J. P. H., Moffatt, J. G. 4'-Substituted Nucleo'sides. 4. Synthesis of Some 4'-Hydroxymethyl Nucleosides // *J. Org. Chem.* – 1979. – Vol. 44. – N. 8. – P. 1201–1309.
78. Rahman, S. M. A., Seki, S., Obika, S., Yoshikawa, H., Miyashita, K., Imanishi, T. Design, synthesis, and properties of 2',4'-BNANC: A bridged nucleic acid analogue // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – Vol. 130. – N. 14. – P. 4886–4896.
79. Shrestha, A. R., Kotobuki, Y., Hari, Y., Obika, S. Guanidine bridged nucleic acid (GuNA): An effect of a cationic bridged nucleic acid on DNA binding affinity // *Chem. Commun.* – 2014. – Vol. 50. – N. 5. – P. 575–577.
80. Osawa, T., Hari, Y., Dohi, M., Matsuda, Y., Obika, S. Synthesis and Properties of the 5-Methyluridine Derivative of 3,4-Dihydro-2H-pyran-Bridged Nucleic Acid (DpNA) // *J. Org. Chem.* – 2015. – Vol. 80. – N. 21. – P. 10474–10481.
81. Seth, P. P., Vasquez, G., Allerson, C. A., Berdeja, A., Gaus, H., Kinberger, G. A., Prakash,

- T. P., Migawa, M. T., Bhat, B., Swayze, E. E. Synthesis and biophysical evaluation of 2',4'-Constrained 2'O-Methoxyethyl and 2',4'-Constrained 2'O-Ethyl nucleic acid analogues // *J. Org. Chem.* – 2010. – Vol. 75. – N. 5. – P. 1569–1581.
82. Abdur Rahman, S. M., Sato, H., Tsuda, N., Haitani, S., Narukawa, K., Imanishi, T., Obika, S. RNA interference with 2',4'-bridged nucleic acid analogues // *Bioorganic Med. Chem.* – 2010. – Vol. 18. – N. 10. – P. 3474–3480.
83. Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C., Erdmann, V. A. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30. – N. 9. – P. 1911–1918.
84. Summerton, J., Weller, D. Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation, and Properties // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* – 1997. – Vol. 7. – N. 3. – P. 187–195.
85. Kundu, J., Ghosh, A., Ghosh, U., Das, A., Nagar, D., Pattanayak, S., Ghose, A., Sinha, S. Synthesis of Phosphorodiamidate Morpholino Oligonucleotides Using Trityl and Fmoc Chemistry in an Automated Oligo Synthesizer // *J. Org. Chem.* – 2022. – Vol. 87. – N. 15. – P. 9466–9478.
86. Ghosh, A., Mukherjee, M., Banerjee, A., Acharya, S., Sinha, S. Phosphoramidite Platform for the Automated Synthesis of Morpholino Antisense Oligonucleotides and Their Chimeras // *Curr. Protoc.* – 2025. – Vol. 5. – N. 6. – P. e70162.
87. Summerton, J. Morpholino, siRNA and S-DNA Compared: Impact of Structure and Mechanism of Action on Off-Target Effects and Sequence Specificity // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 7. – N. 7. – P. 651–660.
88. Damha, M. J., Usman, N., Ogilvie, K. K. Solution and solid phase chemical synthesis of arabinonucleotides // *Can. J. Chem.* – 1989. – Vol. 67. – N. 5. – P. 831–839.
89. Noronha, A. M., Wilds, C. J., Lok, C. N., Viazovkina, K., Arion, D., Parniak, M. A., Damha, M. J. Synthesis and biophysical properties of arabinonucleic acids (ANA): Circular dichroic spectra, melting temperatures, and ribonuclease H susceptibility of ANA·RNA hybrid duplexes // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39. – N. 24. – P. 7050–7062.
90. Damha, M. J., Wilds, C. J., Noronha, A., Brukner, I., Borkow, G., Arion, D., Parniak, M. A. Hybrids of RNA and arabinonucleic acids (ANA and 2'F-ANA) are substrates of ribonuclease H // *J. Am. Chem. Soc.* – 1998. – Vol. 120. – N. 49. – P. 12976–12977.
91. Berger, I., Tereshko, V., Ikeda, H., Marquez, V. E., Egli, M. Crystal structures of B-DNA with incorporated implications of conformational preorganization for duplex stability // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – Vol. 26. – N. 10. – P. 2473–2480.
92. Bellon, L., Barascut, J. louis, Maury, G., Divita, G., Goody, R., Imbach, J. louis. 4'-thio-oligo- β -d-ribonucleotides: Synthesis of β -4'-thio-oligouridylates, nuclease resistance, base

- pairing properties, and interaction with HIV-1 reverse transcriptase // *Nucleic Acids Res.* – 1993. – Vol. 21. – N. 7. – P. 1587–1593.
93. Inagaki, Y., Minakawa, N., Matsuda, A. Synthesis and properties of oligonucleotides containing 4'-selenoribonucleosides // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf).* – 2008. – N. 52. – P. 329–330.
94. Leydier, C., Bellon, L., Barascut, J. L., Deydier, J., Maury, G., Pelicano, H., El Alaoui, M. A., Imbach, J. L. A new synthesis of some 4-thio-d-ribonucleosides and preliminary enzymatic evaluation // *Nucleosides and Nucleotides.* – 1994. – Vol. 13. – N. 10. – P. 2035–2050.
95. Inoue, N., Minakawa, N., Matsuda, A. Synthesis and properties of 4'-thioDNA: Unexpected RNA-like behavior of 4'-thioDNA // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – Vol. 34. – N. 12. – P. 3476–3483.
96. Dande, P., Prakash, T. P., Sioufi, N., Gaus, H., Jarres, R., Berdeja, A., Swayze, E. E., Griffey, R. H., Bhat, B. Improving RNA interference in mammalian cells by 4'-thio-modified small interfering RNA (siRNA): Effect on siRNA activity and nuclease stability when used in combination with 2'-O-alkyl modifications // *J. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 49. – N. 5. – P. 1624–1634.
97. Hoshika, S., Minakawa, N., Matsuda, A. Synthesis and physical and physiological properties of 4'-thioRNA: Application to post-modification of RNA aptamer toward NF- κ B // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – N. 13. – P. 3815–3825.
98. Hayakawa, H., Kohgo, S., Kitano, K., Ashida, N., Kodama, E., Mitsuya, H., Ohnishi, H. Potential of 4'-C-substituted nucleosides for the treatment of HIV-1 // *Antivir. Chem. Chemother.* – 2004. – Vol. 15. – N. 4. – P. 169–187.
99. Petrová, M., Páv, O., Buděšínský, M., Zborníková, E., Novák, P., Rosenbergová, Š., Pačes, O., Liboska, R., Dvořáková, I., Šimák, O., Rosenberg, I. Straightforward Synthesis of Purine 4'-Alkoxy-2'-deoxynucleosides: First Report of Mixed Purine-Pyrimidine 4'-Alkoxyoligodeoxynucleotides as New RNA Mimics // *Org. Lett.* – 2015. – Vol. 17. – N. 14. – P. 3426–3429.
100. Zhou, Y., Lu, K., Li, Q., Fan, C., Zhou, C. C4'-Fluorinated Oligodeoxynucleotides: Synthesis, Stability, Structural Studies // *Chem. - A Eur. J.* – 2021. – Vol. 27. – N. 59. – P. 14738–14746.
101. Malek-Adamian, E., Guenther, D. C., Matsuda, S., Martínez-Montero, S., Zlatev, I., Harp, J., Burai Patrascu, M., Foster, D. J., Fakhoury, J., Perkins, L., Moitessier, N., Manoharan, R. M., Taneja, N., Bisbe, A., Charisse, K., Maier, M., Rajeev, K. G., Egli, M., Manoharan, M., Damha, M. J. 4'-C-Methoxy-2'-deoxy-2'-fluoro Modified Ribonucleotides Improve Metabolic Stability and Elicit Efficient RNAi-Mediated Gene Silencing // *J. Am. Chem. Soc.* – 2017. – Vol. 139. –

N. 41. – P. 14542–14555.

102. Kel'in, A. V., Zlatev, I., Harp, J., Jayaraman, M., Bisbe, A., O'Shea, J., Taneja, N., Manoharan, R. M., Khan, S., Charisse, K., Maier, M. A., Egli, M., Rajeev, K. G., Manoharan, M. Structural Basis of Duplex Thermodynamic Stability and Enhanced Nuclease Resistance of 5'-C-Methyl Pyrimidine-Modified Oligonucleotides // *J. Org. Chem.* – 2016. – Vol. 81. – N. 6. – P. 2261–2279.

103. Mikami, A., Erande, N., Matsuda, S., Kel'in, A., Woods, L. B., Chickering, T., Pallan, P. S., Schlegel, M. K., Zlatev, I., Egli, M., Manoharan, M. Synthesis, chirality-dependent conformational and biological properties of siRNAs containing 5'-(R)- and 5'-(S)-C-methyl-guanosine // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – Vol. 48. – N. 18. – P. 10101–10124.

104. Frey, P. A., Sammons, R. D. Bond order and charge localization in nucleoside phosphorothioates // *Science* (80-.). – 1985. – Vol. 228. – N. 4699. – P. 541–545.

105. 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.

106. Iyer, R. P., Phillips, L. R., Egan, W., Regan, J. B., Beaucage, S. L. The automated synthesis of sulfur-containing oligodeoxyribonucleotides using 3H-1, 2-benzodithiol-3-one 1, 1-dioxide as a sulfur-transfer reagent // *J. Org. Chem.* – 1990. – Vol. 55. – N. 15. – P. 4693–4699.

107. Cheruvallath, Z. S., Carty, R. L., Moore, M. N., Capaldi, D. C., Krotz, A. H., Wheeler, P. D., Turney, B. J., Craig, S. R., Gaus, H. J., Scozzari, A. N. Synthesis of antisense oligonucleotides: Replacement of 3H-1, 2-benzodithiol-3-one 1, 1-dioxide (Beaucage reagent) with phenylacetyl disulfide (PADS) as efficient sulfurization reagent: From bench to bulk manufacture of active pharmaceutical ingredient // *Org. Process Res. Dev.* – 2000. – Vol. 4. – N. 3. – P. 199–204.

108. Krotz, A. H., Gorman, D., Mataruse, P., Foster, C., Godbout, J. D., Coffin, C. C., Scozzari, A. N. Phosphorothioate oligonucleotides with low phosphate diester content: greater than 99.9% sulfurization efficiency with “aged” solutions of phenylacetyl disulfide (PADS) // *Org. Process Res. Dev.* – 2004. – Vol. 8. – N. 6. – P. 852–858.

109. Guzaev, A. P. Reactivity of 3H-1,2,4-dithiazole-3-thiones and 3H-1,2-dithiole-3-thiones as sulfurizing agents for oligonucleotide synthesis // *Tetrahedron Lett.* – 2011. – Vol. 52. – N. 3. – P. 434–437.

110. Scotson, J. L., Andrews, B. I., Laws, A. P., Page, M. I. Phosphorothioate anti-sense oligonucleotides: the kinetics and mechanism of the sulfurisation of phosphites by phenylacetyl disulfide (PADS) // *Org. Biomol. Chem.* – 2016. – Vol. 14. – N. 46. – P. 10840–10847.

111. Ponomarov, O., Laws, A. P., Hanusek, J. 1,2,4-Dithiazole-5-ones and 5-thiones as efficient sulfurizing agents of phosphorus(III) compounds - A kinetic comparative study // *Org. Biomol. Chem.* – 2012. – Vol. 10. – N. 44. – P. 8868–8876.
112. Yang, J., Stolee, J. A., Jiang, H., Xiao, L., Kiesman, W. F., Antia, F. D., Fillon, Y. A., Ng, A., Shi, X. Solid-Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides Using Sulfurization Byproducts for in Situ Capping // *J. Org. Chem.* – 2018. – Vol. 83. – N. 19. – P. 11577–11585.
113. Koziolkiewicz, M., Krakowiak, A., Kwinkowski, M., Boczkowska, M., Stec, W. J. Stereodifferentiation-the effect of P chirality of oligo (nucleoside phosphorothioates) on the activity of bacterial RNase H // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – Vol. 23. – N. 24. – P. 5000–5005.
114. Yu, D., Kandimalla, E. R., Roskey, A., Zhao, Q., Chen, L., Chen, J., Agrawal, S. Stereo-enriched phosphorothioate oligodeoxynucleotides: Synthesis, biophysical and biological properties // *Bioorganic Med. Chem.* – 2000. – Vol. 8. – N. 1. – P. 275–284.
115. Iwamoto, N., Butler, D. C. D., Svrzikapa, N., Mohapatra, S., Zlatev, I., Sah, Di. W. Y., Meena, Standley, S. M., Lu, G., Apponi, L. H., Frank-Kamenetsky, M., Zhang, J. J., Vargeese, C., Verdine, G. L. Control of phosphorothioate stereochemistry substantially increases the efficacy of antisense oligonucleotides // *Nat. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 35. – N. 9. – P. 845–851.
116. Crooke, S. T., Wang, S., Vickers, T. A., Shen, W., Liang, X. H. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides // *Nat. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 35. – N. 3. – P. 230–237.
117. Geary, R. S., Norris, D., Yu, R., Bennett, C. F. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2015. – Vol. 87. – P. 46–51.
118. Crooke, S. T., Seth, P. P., Vickers, T. A., Liang, X. H. The interaction of phosphorothioate-containing RNA targeted drugs with proteins is a critical determinant of the therapeutic effects of these agents // *J. Am. Chem. Soc.* – 2020. – Vol. 142. – N. 35. – P. 14754–14771.
119. Wiesler, W. T., Caruthers, M. H. Synthesis of phosphorodithioate DNA via sulfur-linked, base-labile protecting groups // *J. Org. Chem.* – 1996. – Vol. 61. – N. 13. – P. 4272–4281.
120. Marshall, W. S., Caruthers, M. H. Phosphorodithioate DNA as a potential therapeutic drug // *Science (80-.)*. – 1993. – Vol. 259. – N. 5101. – P. 1564–1570.
121. Abeydeera, N. D., Egli, M., Cox, N., Mercier, K., Conde, J. N., Pallan, P. S., Mizurini, D. M., Sierant, M., Hibti, F. E., Hassell, T., Wang, T., Liu, F. W., Liu, H. M., Martinez, C., Sood, A. K., Lybrand, T. P., Frydman, C., Monteiro, R. Q., Gomer, R. H., Nawrot, B., Yang, X. Evoking picomolar binding in RNA by a single phosphorodithioate linkage // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Vol. 44. – N. 17. – P. 8052–8064.
122. Wu, S. Y., Yang, X., Gharpure, K. M., Hatakeyama, H., Egli, M., McGuire, M. H.,

- Nagaraja, A. S., Miyake, T. M., Rupaimoole, R., Pecot, C. V., Taylor, M., Pradeep, S., Sierant, M., Rodriguez-Aguayo, C., Choi, H. J., Previs, R. A., Armaiz-Pena, G. N., Huang, L., Martinez, C., Hassell, T., Ivan, C., Sehgal, V., Singhanian, R., Han, H. D., Su, C., Kim, J. H., Dalton, H. J., Kovvali, C., Keyomarsi, K., McMillan, N. A. J., Overwijk, W. W., Liu, J., Lee, J. S., Baggerly, K. A., Lopez-Berestein, G., Ram, P. T., Nawrot, B., Sood, A. K. 2'-OMe-phosphorodithioate-modified siRNAs show increased loading into the RISC complex and enhanced anti-tumour activity // *Nat. Commun.* – 2014. – Vol. 5. – P. 1–12.
123. Cummins, L., Graff, D., Beaton, G., Marshall, W. S., Caruthers, M. H. Biochemical and physicochemical properties of phosphorodithioate DNA // *Biochemistry.* – 1996. – Vol. 35. – N. 26. – P. 8734–8741.
124. Li, N.-S., Frederiksen, J. K., Piccirilli, J. A. Synthesis, properties, and applications of oligonucleotides containing an RNA dinucleotide phosphorothiolate linkage // *Acc. Chem. Res.* – 2011. – Vol. 44. – N. 12. – P. 1257–1269.
125. Duschmalé, J., Hansen, H. F., Duschmalé, M., Koller, E., Albaek, N., Møller, M. R., Jensen, K., Koch, T., Wengel, J., Bleicher, K. In vitro and in vivo properties of therapeutic oligonucleotides containing non-chiral 3' and 5' thiophosphate linkages // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – Vol. 48. – N. 1. – P. 63–74.
126. Sun, S., Yoshida, A., Piccirilli, J. A. Synthesis of 3'-thioribonucleosides and their incorporation into oligoribonucleotides via phosphoramidite chemistry // *RNA.* – 1997. – Vol. 3. – N. 11. – P. 1352–1363.
127. Kuimelis, R. G., McLaughlin, L. W. Cleavage properties of an oligonucleotide containing a bridged internucleotide 5'-phosphorothioate RNA linkage // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – Vol. 23. – N. 23. – P. 4753–4760.
128. Cosstick, R., Gaynor, J. W. Synthesis, properties and application of nucleic acids containing phosphorothiolate linkages // *Curr. Org. Chem.* – 2008. – Vol. 12. – N. 4. – P. 291–308.
129. Burgin, A. B., Huizenga, B. N., Nash, H. A. A novel suicide substrate for DNA topoisomerases and site-specific recombinases // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – Vol. 23. – N. 15. – P. 2973–2979.
130. Szczelkun, M. D., Connolly, B. A. Sequence-Specific Binding of DNA by the EcoRV Restriction and Modification Enzymes with Nucleic Acid and Cofactor Analogs // *Biochemistry.* – 1995. – Vol. 34. – N. 34. – P. 10724–10733.
131. Piccirilli, J. A., Vyle, J. S., Caruthers, M. H., Cech, T. R. Metal ion catalysis in the Tetrahymena ribozyme reaction // *Nature.* – 1993. – Vol. 361. – N. 6407. – P. 85–88.
132. Shaw, B. R., Madison, J., Sood, A., Spielvogel, B. F. Oligonucleoside Boranophosphate (Borane Phosphonate) // *Protoc. Oligonucleotides Analog. Synth. Prop.* – 1993. – P. 225–243.

133. Tomasz, J., Shaw, B. R., Porter, K., Spielvogel, B. F., Sood, A. 5'-p-borane-substituted thymidine monophosphate and triphosphate // *Angew. Chemie Int. Ed. English.* – 1992. – Vol. 31. – N. 10. – P. 1373–1375.
134. McCuen, H. B., Noé, M. S., Sierzchala, A. B., Higson, A. P., Caruthers, M. H. Synthesis of mixed sequence borane phosphonate DNA // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 128. – N. 25. – P. 8138–8139.
135. Roy, S., Olesiak, M., Shang, S., Caruthers, M. H. Silver nanoassemblies constructed from boranephosphonate DNA // *J. Am. Chem. Soc.* – 2013. – Vol. 135. – N. 16. – P. 6234–6241.
136. Higson, A. P., Sierzchala, A., Brummel, H., Zhao, Z., Caruthers, M. H. Synthesis of an oligothymidylate containing boranophosphate linkages // *Tetrahedron Lett.* – 1998. – Vol. 39. – N. 23. – P. 3899–3902.
137. Roy, S., Paul, S., Roy, M., Kundu, R., Monfregola, L., Caruthers, M. H. Pyridinium Boranephosphonate Modified DNA Oligonucleotides // *J. Org. Chem.* – 2017. – Vol. 82. – N. 3. – P. 1420–1427.
138. Hall, A. H. S., Wan, J., Shaughnessy, E. E., Shaw, B. R., Alexander, K. A. RNA interference using boranophosphate siRNAs: Structure-activity relationships // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – N. 20. – P. 5991–6000.
139. Olesiak, M., Krivenko, A., Krishna, H., Caruthers, M. H. Synthesis and biological activity of borane phosphonate DNA // *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* – 2011. – Vol. 186. – N. 4. – P. 921–932.
140. McCuen, H. B., Noe, M. S., Olesiak, M., Sierzchala, A. B., Caruthers, M. H., Higson, A. P. Synthesis and biochemical activity of new oligonucleotide analogs // *Phosphorus, Sulfur, and Silicon.* – 2008. – Vol. 183. – N. 2–3. – P. 349–363.
141. Nukaga, Y., Takemura, T., Iwamoto, N., Oka, N., Wada, T. Enhancement of the affinity of 2'-O-Me-oligonucleotides for complementary RNA by incorporating a stereoregulated boranophosphate backbone // *RSC Adv.* – 2015. – Vol. 5. – N. 4. – P. 2392–2395.
142. Iwamoto, N., Oka, N., Wada, T. Stereocontrolled synthesis of oligodeoxyribonucleoside boranophosphates by an oxazaphospholidine approach using acid-labile N-protecting groups // *Tetrahedron Lett.* – 2012. – Vol. 53. – N. 33. – P. 4361–4364.
143. Miller, P. S. Oligonucleoside Methylphosphonates as Antisense Reagents // *Bio/Technology.* – 1991. – Vol. 9. – N. 4. – P. 358–362.
144. Flür, S., Micura, R. Chemical synthesis of RNA with site-specific methylphosphonate modifications // *Methods.* – 2016. – Vol. 107. – N. 2016. – P. 79–88.
145. Miller, P. S., Bhan, P., Cushman, C. D., Kean, J. M., Levis, J. T. Antisense oligonucleoside methylphosphonates and their derivatives // *Nucleosides and Nucleotides.* – 1991. – Vol. 10. –

N. 1–3. – P. 37–46.

146. Agrawal, S., Goodchild, J. OLIGODEOXYNUCLEOSIDE METHYLPHOSPHONATES: SYNTHESIS AND ENZYMIC DEGRADATION // *Tetrahedron Lett.* – 1987. – Vol. 28. – N. 31. – P. 3539–3542.

147. Hogrefe, R. I., Vaghefi, M. M., Reynolds, M. A., Young, K. M., Arnold, L. J. Deprotection of methylphosphonate oligonucleotides using a novel one-pot procedure // *Nucleic Acids Res.* – 1993. – Vol. 21. – N. 9. – P. 2031–2038.

148. Thaden, J., Miller, P. S. Automated Synthesis of Oligodeoxyribonucleoside Methylphosphonates Having [N-(3-Aminoprop-1-yl) -N-(2-hydroxyethyl) -2-aminoethyl] Phosphate or Methylphosphonic Acid at the 3' End Using a Modified Controlled Pore Glass Support // *Bioconjug. Chem.* – 1993. – Vol. 4. – N. 5. – P. 395–401.

149. Miller, P. S., Yano, J., Yano, E., Carroll, C., Jayaraman, K., Ts'o, P. O. P. Nonionic nucleic acid analogs. Synthesis and characterization of dideoxyribonucleoside methylphosphonates // *Biochemistry.* – 1979. – Vol. 18. – N. 23. – P. 5134–5143.

150. Reynolds, M. A., Hogrefe, R. I., Jaeger, J. A., Schwartz, D. A., Riley, T. A., Marvin, W. B., Daily, W. J., Vaghefi, M. M., Beck, T. A., Knowles, S. K., Klem, R. E., Arnold, L. J. Synthesis and thermodynamics of oligonucleotides containing chirally pure R(p) methylphosphonate linkages // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – Vol. 24. – N. 22. – P. 4584–4591.

151. Krishna, H., Caruthers, M. H. Alkynyl phosphonate DNA: A versatile “click”able backbone for DNA-based biological applications // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – Vol. 134. – N. 28. – P. 11618–11631.

152. Timmer, M. S. M., Ovaa, H., Filippov, D. V., Van Der Marel, G. A., Van Boom, J. H. Synthesis of phosphorus mono- and bicycles by catalytic ring-closing metathesis // *Tetrahedron Lett.* – 2001. – Vol. 42. – N. 46. – P. 8231–8233.

153. Shang, S., Monfregola, L., Caruthers, M. H. Peptide-substituted oligonucleotide synthesis and non-toxic, passive cell delivery // *Signal Transduct. Target. Ther.* – 2016. – Vol. 1. – N. July. – P. 1–9.

154. Dellinger, D. J., Sheehan, D. M., Christensen, N. K., Lindberg, J. G., Caruthers, M. H. Solid-phase chemical synthesis of phosphonoacetate and thiophosphonoacetate oligodeoxynucleotides // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – Vol. 125. – N. 4. – P. 940–950.

155. Yamada, C. M., Dellinger, D. J., Caruthers, M. H. Synthesis and Biological Activity of Phosphonocarboxylate DNA // *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids.* – 2007. – Vol. 26. – N. 6–7. – P. 539–546.

156. Sheehan, D., Lunstad, B., Yamada, C. M., Stell, B. G., Caruthers, M. H., Dellinger, D. J. Biochemical properties of phosphonoacetate and thiophosphonoacetate

- oligodeoxyribonucleotides // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – Vol. 31. – N. 14. – P. 4109–4118.
157. Threlfall, R. N., Torres, A. G., Krivenko, A., Gait, M. J., Caruthers, M. H. Synthesis and biological activity of phosphonoacetate- and thiophosphonoacetate-modified 2'-O-methyl oligoribonucleotides // *Org. Biomol. Chem.* – 2012. – Vol. 10. – N. 4. – P. 746–754.
158. Matsui, M., Threlfall, R. N., Caruthers, M. H., Corey, D. R. Effect of 2'-O-methyl/thiophosphonoacetate-modified antisense oligonucleotides on huntingtin expression in patient-derived cells // *Artif. DNA. PNA XNA.* – 2014. – Vol. 5. – N. 3. – P. e1146391.
159. Hendel, A., Bak, R. O., Clark, J. T., Kennedy, A. B., Ryan, D. E., Roy, S., Steinfeld, I., Lunstad, B. D., Kaiser, R. J., Wilkens, A. B., Bacchetta, R., Tsalenko, A., Dellinger, D., Bruhn, L., Porteus, M. H. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells // *Nat. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 33. – N. 9. – P. 985–989.
160. Yamada, C. M., Dellinger, D. J., Caruthers, M. H. Synthesis and biochemical evaluation of phosphonoformate oligodeoxyribonucleotides // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 128. – N. 15. – P. 5251–5261.
161. Meade, B. R., Gogoi, K., Hamil, A. S., Palm-Apergi, C., Van Den Berg, A., Hagopian, J. C., Springer, A. D., Eguchi, A., Kacsinta, A. D., Dowdy, C. F., Presente, A., Lönn, P., Kaulich, M., Yoshioka, N., Gros, E., Cui, X. S., Dowdy, S. F. Efficient delivery of RNAi prodrugs containing reversible charge-neutralizing phosphotriester backbone modifications // *Nat. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 32. – N. 12. – P. 1256–1261.
162. Monfregola, L., Caruthers, M. H. Solid-Phase Synthesis, Hybridizing Ability, Uptake, and Nuclease Resistant Profiles of Position-Selective Cationic and Hydrophobic Phosphotriester Oligonucleotides // *J. Org. Chem.* – 2015. – Vol. 80. – N. 18. – P. 9147–9158.
163. Yanachkov, I., Zavizion, B., Metelev, V., Stevens, L. J., Tabatadze, Y., Yanachkova, M., Wright, G., Krichevsky, A. M., Tabatadze, D. R. Self-neutralizing oligonucleotides with enhanced cellular uptake // *Org. Biomol. Chem.* – 2017. – Vol. 15. – N. 6. – P. 1363–1380.
164. Poijarvi-Virta, P., Lonnberg, H. Prodrug Approaches of Nucleotides and Oligonucleotides // *Curr. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 13. – N. 28. – P. 3441–3465.
165. Hansen, R. A., Märcher, A., Pedersen, K. N., Gothelf, K. V. Insertion of Chemical Handles into the Backbone of DNA during Solid-Phase Synthesis by Oxidative Coupling of Amines to Phosphites // *Angew. Chemie - Int. Ed.* – 2023. – Vol. 62. – N. 26. – P. 1–8.
166. Nekrasov, M. D., Pyshnyi, D. V., Kupryushkin, M. S. Application of Iodine-Amine Oxidation Approach in the Synthesis of Various N-Alkyl Phosphoramidate Oligonucleotide Derivatives // *Med. Chem. (Los. Angeles).* – 2025. – Vol. 21. – N. 3. – P. 229–238.
167. 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.

168. Nielsen, J., Caruthers, M. H. Directed Arbuzov-Type Reactions of 2-Cyano-1,1-dimethylethyl Deoxynucleoside Phosphites // *J. Am. Chem. Soc.* – 1988. – Vol. 110. – N. c. – P. 6275–6276.
169. Santorelli, A., Gothelf, K. V. Conjugation of chemical handles and functional moieties to DNA during solid phase synthesis with sulfonyl azides // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – Vol. 50. – N. 13. – P. 7235–7246.
170. 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.
171. Leffler, J. E., Temple, R. D. The Staudinger Reaction between Triarylphosphines and Azides. A Study of the Mechanism // *J. Am. Chem. Soc.* – 1967. – Vol. 89. – N. 20. – P. 5235–5246.
172. Van Kalker, H. A., Bruins, J. J., Rutjes, F. P. J. T., Van Delft, F. L. Organophosphorus-catalysed Staudinger reduction // *Adv. Synth. Catal.* – 2012. – Vol. 354. – N. 8. – P. 1417–1421.
173. Bazhenov, M. A., Shernyukov, A. V., Kupryushkin, M. S., Pyshnyi, D. V. Study of the Staudinger Reaction and Reveal of Key Factors Affecting the Efficacy of Automatic Synthesis of Phosphoryl Guanidinic Oligonucleotide Analogs // *Russ. J. Bioorganic Chem.* – 2019. – Vol. 45. – N. 6. – P. 699–708.
174. Laurent, A., Naval, M., Debart, F., Vasseur, J. J., Rayner, B. Chiral and steric effects in the efficient binding of α -anomeric deoxyoligonucleoside N-alkylphosphoramidates to ssDNA and RNA // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – Vol. 27. – N. 21. – P. 4151–4159.
175. Letsinger, R. L., Singman, C. N., Hestand, G., Salunkhe, M. Cationic oligonucleotides // *J. Am. Chem. Soc.* – 1988. – Vol. 110. – N. 13. – P. 4470–4471.
176. Kupryushkin, M. S., Apukhtina, V. S., Vasilyeva, S. V., Pyshnyi, D. V., Stetsenko, D. A. A new simple and convenient method for preparation of oligonucleotides containing a pyrene or a cholesterol moiety // *Russ. Chem. Bull.* – 2015. – Vol. 64. – N. 7. – P. 1678–1681.
177. Markov, O. V., Filatov, A. V., Kupryushkin, M. S., Chernikov, I. V., Patutina, O. A., Strunov, A. A., Chernolovskaya, E. L., Vlassov, V. V., Pyshnyi, D. V., Zenkova, M. A. Transport oligonucleotides-a novel system for intracellular delivery of antisense therapeutics // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25. – N. 16. – P. 1–27.
178. Tomasz, J., Simoncsits, A. On the stability of phosphodiester-amide internucleotide bond // *Tetrahedron Lett.* – 1981. – Vol. 22. – N. 39. – P. 3905–3908.
179. Garrison, A. W., Boozer, C. E. The Acid-Catalyzed Hydrolysis of a Series of Phosphoramidates // *J. Am. Chem. Soc.* – 1968. – Vol. 90. – N. 13. – P. 3486–3494.
180. Heindl, D., Kessler, D., Schube, A., Thuer, W., Giraut, A. Easy method for the synthesis of

- labeled oligonucleotides // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf)*. – 2008. – N. 52. – P. 405–406.
181. Chelobanov, B. P., Burakova, E. A., Prokhorova, D. V., Fokina, A. A., Stetsenko, D. A. New oligodeoxynucleotide derivatives containing N-(methanesulfonyl)-phosphoramidate (mesyl phosphoramidate) internucleotide group // *Russ. J. Bioorganic Chem.* – 2017. – Vol. 43. – N. 6. – P. 664–668.
182. Derzhalova, A., Markov, O., Fokina, A., Shiohama, Y., Zatsepin, T., Fujii, M., Zenkova, M., Stetsenko, D. Novel lipid-oligonucleotide conjugates containing long-chain sulfonyl phosphoramidate groups: Synthesis and biological properties // *Appl. Sci.* – 2021. – Vol. 11. – N. 3. – P. 1–15.
183. 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.
184. Anderson, B. A., Freestone, G. C., Low, A., De-Hoyos, C. L., Iii, W. J. D., Østergaard, M. E., Migawa, M. T., Fazio, M., Wan, W. B., Berdeja, A., Scandalis, E., Burel, S. A., Vickers, T. A., Crooke, S. T., Swayze, E. E., Liang, X., Seth, P. P. Towards next generation antisense oligonucleotides: Mesylphosphoramidate modification improves therapeutic index and duration of effect of gapmer antisense oligonucleotides // *Nucleic Acids Res.* – 2021. – Vol. 49. – N. 16. – P. 9026–9041.
185. Kupryushkin, M. S., Pyshnyi, D. V., Stetsenko, D. A. Phosphoryl guanidines: A new type of nucleic acid analogues // *Acta Naturae*. – 2014. – Vol. 6. – N. 23. – P. 116–118.
186. Stetsenko, D., Kupryushkin, M., Pyshnyi, D. Modified Oligonucleotides and Methods for Their Synthesis. International Patent No. WO2016028187A1 // 2014. – Vol. 1. – N. 19. – P. 1–67.
187. Kupryushkin, M. S., Filatov, A. V., Mironova, N. L., Patutina, O. A., Chernikov, I. V., Chernolovskaya, E. L., Zenkova, M. A., Pyshnyi, D. V., Stetsenko, D. A., Altman, S., Vlassov, V. V. Antisense oligonucleotide gapmers containing phosphoryl guanidine groups reverse MDR1-mediated multiple drug resistance of tumor cells // *Mol. Ther. Nucleic Acids*. – 2022. – Vol. 27. – N. March. – P. 211–226.
188. Lomzov, A. A., Kupryushkin, M. S., Shernyukov, A. V., Nekrasov, M. D., Dovydenko, I. S., Stetsenko, D. A., Pyshnyi, D. V. Diastereomers of a mono-substituted phosphoryl guanidine trideoxyribonucleotide: Isolation and properties // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2019. – Vol. 513. – N. 4. – P. 807–811.
189. Dyudeeva, E. S., Kupryushkin, M. S., Lomzov, A. A., Pyshnaya, I. A., Pyshnyi, D. V.

- Physicochemical Properties of the Phosphoryl Guanidine Oligodeoxyribonucleotide Analogs // Russ. J. Bioorganic Chem. – 2019. – Vol. 45. – N. 6. – P. 709–718.
190. Lomzov, A. A., Kupryushkin, M. S., Dyudeeva, E. S., Pyshnyi, D. V. A Comparative Study of the Hybridization of Phosphoryl Guanidine Oligonucleotides with DNA and RNA // Russ. J. Bioorganic Chem. – 2021. – Vol. 47. – N. 2. – P. 461–468.
191. Gryaznov, S. M., Lloyd, D. H., Chen, J. K., Schultz, R. G., Dedionisio, L. A., Ratmeyer, L., Wilson, W. D. Oligonucleotide N3' → P5' phosphoramidates // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1995. – Vol. 92. – N. 13. – P. 5798–5802.
192. Chen, J. kang, Schultz, R. G., Lioyd, D. H., Gryaznov, S. M. Synthesis of oligodeoxyribonucleotide N3'→P5' phosphoramidates // Nucleic Acids Res. – 1995. – Vol. 23. – N. 14. – P. 2661–2668.
193. Matray, T. J., Gryaznov, S. M. Synthesis and properties of RNA analogs - Oligoribonucleotide N3'→P5' phosphoramidates // Nucleic Acids Res. – 1999. – Vol. 27. – N. 20. – P. 3976–3985.
194. Gryaznov, S., Skorski, T., Cucco, C., Nieborowska-Skorska, M., Chiu, C. Y., Lloyd, D., Chen, J. K., Koziolkiewicz, M., Calabretta, B. Oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates as antisense agents // Nucleic Acids Res. – 1996. – Vol. 24. – N. 8. – P. 1508–1514.
195. Skorski, T., Perrotti, D., Nieborowska-Skorska, M., Gryaznov, S., Calabretta, B. Antileukemia effect of c-myc N3'→P5' phosphoramidate antisense oligonucleotides in vivo // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1997. – Vol. 94. – N. 8. – P. 3966–3971.
196. Gryaznov, S. M. Oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates and thio-phosphoramidates as potential therapeutic agents // Chem. Biodivers. – 2010. – Vol. 7. – N. 3. – P. 477–493.
197. Shea-Herbert, B., Pongracz, K., Shay, J. W., Gryaznov, S. M. Oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates as efficient telomerase inhibitors // Oncogene. – 2002. – Vol. 21. – N. 1. – P. 638–642.
198. Keam, S. J. Imetelstat: First Approval // Drugs. – 2024. – Vol. 84. – N. 9. – P. 1149–1155.
199. Stetsenko, D., Kupryushkin, M., Pyshnyi, D. Modified Oligonucleotides and Methods for Their Synthesis // 2016.
200. Riobé, F., Grosshans, P., Sidorenkova, H., Geoffroy, M., Avarvari, N. Mono- and bis(tetrathiafulvalene)-1,3,5-triazines as covalently linked donor-acceptor systems: Structural, spectroscopic, and theoretical investigations // Chem. - A Eur. J. – 2009. – Vol. 15. – N. 2. – P. 380–387.
201. Fink, R., Frenz, C., Thelakkat, M., Schmidt, H. W. Synthesis and characterization of aromatic poly(1,3,5-triazine-ether)s for electroluminescent devices // Macromolecules. – 1997. – Vol. 30. – N. 26. – P. 8177–8181.

202. Sun, D., Si, C., Wang, T., Zysman-Colman, E. 1,3,5-Triazine-Functionalized Thermally Activated Delayed Fluorescence Emitters for Organic Light-Emitting Diodes // *Adv. Photonics Res.* – 2022. – Vol. 3. – N. 11. – P. 1–54.
203. Blotny, G. Recent applications of 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine and its derivatives in organic synthesis // *Tetrahedron.* – 2006. – Vol. 62. – N. 41. – P. 9507–9522.
204. Min, Q., Miao, P., Chu, D., Liu, J., Qi, M., Kazemnejadi, M. Introduction of a Recyclable Basic Ionic Solvent with Bis-(NHC) Ligand Property and The Possibility of Immobilization on Magnetite for Ligand- and Base-Free Pd-Catalyzed Heck, Suzuki and Sonogashira Cross-Coupling Reactions in Water // *Catal. Letters.* – 2021. – Vol. 151. – N. 10. – P. 3030–3047.
205. Thurston, J. T., Schaefer, F. C., Dudley, J. R., Holm-Hansen, D. Cyanuric Chloride Derivatives. V. Reaction of Alkoxy-s-triazines and Aryloxy-s-triazines with Amines // *J. Am. Chem. Soc.* – 1951. – Vol. 73. – N. 7. – P. 2992–2996.
206. Soltani Rad, M. N., Behrouz, S., Asrari, Z., Khalafi-Nezhad, A. A simple and regioselective one-pot procedure for the direct N-acylation of some purine and pyrimidine nucleobases via carboxylic acids using cyanuric chloride // *Monatshefte fur Chemie.* – 2014. – Vol. 145. – N. 12. – P. 1933–1940.
207. Palacios, F., Aparicio, D., Rubiales, G., Alonso, C., de los Santos, J. N-Vinyllic Phosphazenes. A Useful Tool for the Synthesis of Acyclic and Heterocyclic Compounds // *Curr. Org. Chem.* – 2006. – Vol. 10. – N. 18. – P. 2371–2392.
208. Roberts, T. C., Langer, R., Wood, M. J. A. Advances in oligonucleotide drug delivery // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2020. – Vol. 19. – N. 10. – P. 673–694.
209. Merdan, T., Kopeček, J., Kissel, T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer / Merdan, T., Kopeček, J., Kissel, T. – 2002.
210. Sorensen, M. D., Meldgaard, M., Rajwanshi, V. K., Wengel, J. Branched oligonucleotides containing bicyclic nucleotides as branching points and DNA or LNA as triplex forming branch // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* – 2000. – Vol. 10. – N. 16. – P. 1853–1856.
211. Azhayeva, E., Azhayev, A., Guzaev, A., Hovinen, J., Lönnberg, H. Looped oligonucleotides form stable hybrid complexes with a single-stranded DNA // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – Vol. 23. – N. 7. – P. 1170–1176.
212. Antopolsky, M., Azhayeva, E., Tengvall, U., Azhayev, A. Towards a general method for the stepwise solid-phase synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates // *Tetrahedron Lett.* – 2002. – Vol. 43. – N. 3. – P. 527–530.
213. Halpin, D. R., Lee, J. A., Wrenn, S. J., Harbury, P. B. DNA display III. Solid-phase organic synthesis on unprotected DNA // *PLoS Biol.* – 2004. – Vol. 2. – N. 7. – P. 1031–1038.
214. Meschaninova, M. I., Novopashina, D. S., Semikolenova, O. A., Silnikov, V. N.,

- Venyaminova, A. G. Novel convenient approach to the solid-phase synthesis of oligonucleotide conjugates // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – N. 23. – P. 1–14.
215. Golyshev, V. M., Pyshnyi, D. V., Lomzov, A. A. Effects of Phosphoryl Guanidine Modification of Phosphate Residues on the Structure and Hybridization of Oligodeoxyribonucleotides // *J. Phys. Chem. B*. – 2021. – Vol. 125. – N. 11. – P. 2841–2855.
216. Kupryushkin, M. S., Nekrasov, M. D., Stetsenko, D. A., Pyshnyi, D. V. Efficient functionalization of oligonucleotides by new achiral nonnucleosidic monomers // *Org. Lett.* – 2014. – Vol. 16. – N. 11. – P. 2842–2845.
217. Petrova, N. S., Chernikov, I. V., Meschaninova, M. I., Dovydenko, I. S., Venyaminova, A. G., Zenkova, M. A., Vlassov, V. V., Chernolovskaya, E. L. Carrier-free cellular uptake and the gene-silencing activity of the lipophilic siRNAs is strongly affected by the length of the linker between siRNA and lipophilic group // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Vol. 40. – N. 5. – P. 2330–2344.
218. Bauer, I., Ilina, E., Zharkov, T., Grigorieva, E., Chinak, O., Kupryushkin, M., Golyshev, V., Mitin, D., Chubarov, A., Khodyreva, S., Dmitrienko, E. Self-Penetrating Oligonucleotide Derivatives: Features of Self-Assembly and Interactions with Serum and Intracellular Proteins // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – N. 12.



Отчет о проверке

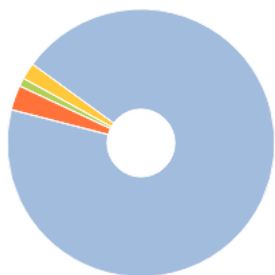
Автор: Жарков Тимофей Дмитриевич

Проверяющий: Мирошниченко Светлана Константиновна

Название документа: Научный Доклад ЖарковТД_wr

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ

Тариф: FULL



Совпадения:
3,33%



Оригинальность:
94,38%



ИИ-контент:
0%



Цитирования:
0,59%



Самоцитирования:
1,7%



«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует проверенному тексту документа.

- 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 отнесла к корректно 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: 35

Тип документа: Не указано

Дата проверки: 09.09.2025 11:48:09

Дата корректировки: 09.09.2025 12:01:25

Количество страниц: 131

Символов в тексте: 255993

Слов в тексте: 30921

Число предложений: 3390

Комментарий: не указано

ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да
Исключение элементов документа из проверки: Нет
Выполнено распознавание текста (OCR): Да
Выполнена проверка с учетом структуры: Нет

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

❗ **Модули, недоступные в рамках тарифа:** Интернет Free

ИСТОЧНИКИ

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	3,44%	0%	Диплом_сборка_27.05.21	27 Мая 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника. Список сокращений, не является плагиатом
[02]	1,23%	1,13%	диплом 6	05 Июнь 2023	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[03]	1,22%	0%	Диплом_специалиста_Сероклино...	10 Июнь 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[04]	1,21%	1,21%	Триазиниламидофосфатные олиг...	21 Июл 2022	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[05]	1,18%	0%	Диплом_сборка_27.05.21	27 Мая 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[06]	0,63%	0%	исследование свойств частично ... http://niboch.nsc.ru	03 Ноя 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[07]	0,62%	0%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[08]	0,59%	0,59%	не указано	13 Янв 2022	Цитирование	
[09]	0,55%	0%	диплом 6	05 Июнь 2023	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[10]	0,55%	0,55%	Диплом_Валяев	03 Июнь 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[11]	0,5%	0%	prokhorova_dv_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	25 Мая 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[12]	0,46%	0%	Диплом_Валяев	03 Июнь 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[13]	0,39%	0%	popova_vk_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	12 Фев 2025	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[14]	0,38%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	07 Янв 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[15]	0,37%	0%	%D0%BF%D0%BE%D0%BF%D0%B... http://niboch.nsc.ru	26 Июнь 2025	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[16]	0,35%	0,32%	Нилов И.Д. Диплом	20 Мая 2025	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	

[17]	0,35%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	10 Сен 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[18]	0,34%	0%	Попова, Виктория Константинов... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2025	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[19]	0,34%	0%	popova_vk_autoref.pdf http://niboch.nsc.ru	12 Фев 2025	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[20]	0,34%	0%	Биоорганическая химия. Т. 47, Н... https://sciencejournals.ru	21 Июн 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[21]	0,34%	0%	https://new.ras.ru/upload/iblock/5... https://new.ras.ru	24 Апр 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[22]	0,33%	0%	Алексеева, Ирина Владимировна... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2024	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[23]	0,33%	0%	Тимошенко, Валентина Викторов... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2020	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[24]	0,33%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	30 Ноя 2024	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[25]	0,31%	0%	Попова, Виктория Константинов... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2025	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[26]	0,29%	0%	Нуклеозиды и олигонуклеотиды ... http://elibrary.ru	27 Авг 2014	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[27]	0,29%	0%	Диплом_4_версия	09 Июн 2023	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[28]	0,29%	0,29%	Особенности автоматического си...	20 Сен 2024	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[29]	0,27%	0%	Тимошенко, Валентина Викторов... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2020	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[30]	0,27%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	26 Янв 2021	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[31]	0,26%	0,26%	TH2016OZAGACMATTHIEU.pdf https://theses.hal.science	02 Сен 2025	Переводные заимствования	
[32]	0,25%	0,25%	БИЦИКЛИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ НУК... http://elibrary.ru	30 Авг 2014	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[33]	0,23%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	03 Мая 2024	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[34]	0,21%	0,21%	Получение химерных триазилил...	20 Дек 2022	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[35]	0,19%	0%	диплом_ЛаптеваAA_v1.0	11 Июн 2023	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[36]	0,18%	0%	Disser_Ulantikov.pdf	12 Янв 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	0,18%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	11 Июл 2020	Интернет Плюс	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[38]	0,18%	0,18%	Адаптация протокола автоматич...	04 Июл 2025	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[39]	0,18%	0,07%	SBB_2022.pdf https://pure.nsu.ru	03 Ноя 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[40]	0,17%	0,16%	96052_CAHUZAC_2021_archivage.p... https://theses.hal.science	25 Авг 2025	Переводные заимствования	
[41]	0,17%	0%	Гвоздева, Ольга Викторовна Инг... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2016	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[42]	0,17%	0%	Диплом_специалиста_Сероклино...	10 Июн 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[43]	0,16%	0%	Козлов, Иван Борисович Молеку... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2024	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[44]	0,13%	0,13%	https://www.justice.gov/media/140... https://justice.gov	10 Июл 2025	Интернет Плюс	
[45]	0,12%	0,12%	Скарга, Владислав Викторович С...	03 Апр 2025	Публикации РГБ (переводы и	

			http://dlib.rsl.ru		перепарафразирования)	
[46]	0,11%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	07 Фев 2024	Перепарафразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[47]	0,1%	0%	О. Ю. Костоусова, Л. С. Малофеев... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2008	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	0,1%	0,07%	Синтез и свойства модифициров... http://elibrary.ru	05 Сен 2011	Публикации eLIBRARY (переводы и перепарафразирования)	
[49]	0,09%	0,09%	MartinezAlejandro_2020_QuimicaP... https://bibliotecadigital.udea.edu.co	06 Июн 2025	Переводные заимствования	
[50]	0,08%	0%	РАЗРАБОТКА ПОДХОДА К ПОЛУЧ...	29 Окт 2022	Публикации eLIBRARY (переводы и перепарафразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0,07%	0%	Брылёв, Владимир Анатольевич ... http://dlib.rsl.ru	03 Апр 2025	Публикации РГБ (переводы и перепарафразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,07%	0%	http://nrcii.ru/diss/Kozlov_IB_diss_2... http://nrcii.ru	16 Янв 2025	Перепарафразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,07%	0%	Tesis_entrada_calcio_inducida.pdf http://sid.usal.es	25 Авг 2025	Переводные заимствования	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,06%	0%	chernikov_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	30 Сен 2024	Перепарафразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,06%	0%	Петрова, Наталья Сергеевна Хим... http://dlib.rsl.ru	20 Сен 2024	Публикации РГБ (переводы и перепарафразирования)	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

Жарков Тимофей Дмитриевич

«Получение и свойства новых модифицированных олигонуклеотидов,
содержащих триазиновую группу»

Оригинальность работы составляет 94.38%, 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