

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

На правах рукописи

**НАУЧНЫЙ ДОКЛАД**  
**об основных результатах**  
**выполненной научно-**  
**квалификационной работы**

**Получение функционализированных олигонуклеотидных производных путем**  
**введения модификаций по межнуклеотидной фосфатной группе**

Направление подготовки  
Научная специальность

04.06.01 Химические науки  
1.4.9. Биоорганическая химия

Аспирант \_\_\_\_\_ Жуков С. А.

Научный руководитель \_\_\_\_\_ к.х.н. Купрюшкин М. С.

Новосибирск – 2024

Работа выполнена в лаборатории химии нуклеиновых кислот Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Купрюшкин Максим Сергеевич**, кандидат химических наук, заведующий Лаборатории химии нуклеиновых кислот Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

## **1. Общая характеристика работы**

### **Актуальность**

Синтетические олигонуклеотиды в настоящее время нашли широкое применение в различных областях молекулярной биологии, биотехнологии и медицины. Из всех направлений использования олигонуклеотидов стоит отметить их применение в качестве терапевтических препаратов – данная область исследований является широко востребованной и быстро развивающейся. Для терапевтического применения олигонуклеотидов особое значение имеют такие свойства, как устойчивость в биологических средах и эффективность проникновения в клетки, которые достигаются путем введения различных модификаций. На данный момент более 20 олигонуклеотидных препаратов уже одобрены организацией FDA (Food and Drug Administration) [1], при этом подавляющее большинство из них основаны на модифицированных олигонуклеотидах.

Существует множество путей введения химических модификаций в структуру олигонуклеотидов, некоторые из них требуют сложного многостадийного синтеза реагентов-модификаторов. Однако особый интерес представляют методы введения модификаций, совместимые с автоматическим твердофазным олигонуклеотидным синтезом, и требующие лишь незначительного изменения протоколов и набора используемых реагентов. К данной категории можно отнести модификации межнуклеотидного фосфата, вводимые в условиях альтернативного этапа окисления. Наиболее широко изученным классом модификаций межнуклеотидного фосфата являются тиофосфаты, многие из одобренных FDA олигонуклеотидных препаратов основаны именно на данной модификации [2]. Однако данный класс модификаций не позволяет варьировать вводимые в состав олигонуклеотидов функциональные группы.

В 2014 г. в ИХБФМ СО РАН был предложен метод получения нового класса олигонуклеотидных производных - фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов, основанный на окислении фосфиттриэфира по реакции Штаудингера с участием реакционноспособных диаминокарбенилазидов [3]. Использование в рамках данного подхода других классов электрон-дефицитных азидов позволило получить новые классы олигонуклеотидных производных [4][5].

Данный метод полностью совместим со стандартным набором реагентов и протоколами, используемыми в твердофазном амидофосфитном синтезе. И вместе с тем введение модификаций межнуклеотидного фосфата по реакции Штаудингера можно рассматривать не только как способ получения олигонуклеотидов с измененным остовом, но и в качестве инструмента для функционализации олигонуклеотидов за счет встраивания азидов, несущих необходимые заместители. Реакция Штаудингера может быть использована в качестве универсального инструмента для тонкой регуляции свойств получаемых модифицированных олигонуклеотидом. В связи с этим представляет интерес как дальнейшая разработка новых классов олигонуклеотидных производных за счет введения в реакцию Штаудингера различных классов электрон-дефицитных азидов, так и разработка синтетических схем, позволяющих с использованием данных модификаций вводить разнообразные функциональные группы.

**Целью работы** является расширение возможностей метода введения модификаций, основанного на окислении фосфиттриэфиров органическими азидами по реакции Штаудингера за счет получения представителей новых классов олигонуклеотидных производных, а также путем разработки синтетических схем, позволяющих вводить разнообразные заместители в состав получаемых производных.

**Задачи:**

1. Получение представителей новых классов олигонуклеотидных производных с использованием электро-дефицитных азидов различной природы
2. Сравнение реакционной способности различных классов электрон-дефицитных азидов в реакции Штаудингера
3. Разработка синтетических схем, позволяющих получать разнообразные представители как уже известных, так и новых классов олигонуклеотидных производных, несущих различные заместители, и демонстрация их применимости
4. Характеризация и первичная оценка физико-химических свойств полученных олигонуклеотидных производных

### **Научная новизна**

В данной работе были разработаны синтетические схемы, позволяющие получать новые представители уже известных классов олигонуклеотидных производных: фосфорилгуанидинов и сульфониламидофосфатов. Были систематизированы данные по эффективности протекания реакции Штаудингера с участием различных диаминокарбенийазидов и сульфонилазидов. Впервые были получены представители новых классов олигонуклеотидных производных с использованием различных классов электрон-дефицитных азидов. Выявлены закономерности, характеризующие сравнительную реакционную способность различных классов электрон-дефицитных азидов.

### **Личный вклад автора**

Все основные результаты получены автором самостоятельно. Регистрация спектров ЯМР выполнена сотрудником ЛХНК ИХБФМ СО РАН Жарковым Т. Д. Масс-спектрометрический анализ выполнен в Центре коллективного пользования ИХБФМ СО РАН.

## 2. Материалы и методы

*Синтез олигонуклеотидов (октатимидилатов)* проводили по стандартной методике на автоматическом ДНК-синтезаторе ASM-800 (Biosset, Россия) с использованием стандартного протокола твердофазного амидофосфитного синтеза с необходимыми изменениями.

После присоединения последнего мономера не проводили стадии экпирования, окисления и отщепления диметокситритильной защиты. Вместо этого CPG с промежуточным продуктом олигонуклеотидного синтеза вручную обрабатывали раствором азид-модификатора, затем удаляли диметокситритильную защиту в автоматическом режиме.

*Хроматографический анализ* ОФ ВЭЖХ полученных олигонуклеотидов проводили на хроматографе “Милихром А02” (“Эконова”, Россия) с использованием колонки (2 x 75 мм, “ProntoSIL-120-5-C18”; “Эконова”). Анализ проводили в системе «0,02 М ацетат триэтиламмония (А) – 90% ацетонитрил (В)», градиент от 0 до 90% В за 30 минут, поток 200 мкл/мин, температура термостата 35 °С. Детекцию осуществляли на длине волны 260 нм.

Для проведения *электрофореза* использовали 15% ПААГ в денатурирующих условиях (акриламид: N,N'-метиленабисакриламид (30:1), 8 М мочевины, 89 мМ Трис-борат, рН 8.3, 2 мМ Na<sub>2</sub>-EDTA) в буферном растворе TBE (89 мМ Трис-борат, рН 8.3, 2 мМ Na<sub>2</sub>-EDTA) при напряженности 50 В/см. Нанесение олигонуклеотидных образцов на гель проводили в растворе 8 М мочевины, содержащем 0.05 % ксиленианол FF и 0.05 % бромфеноловый синий. Результаты электрофоретического разделения визуализировали при помощи красителя Stains-all.

*Спектры ЯМР <sup>1</sup>H* регистрировали на спектрометре «Spinsolve 80» (Magritek, Германия) (80 МГц) в DMSO-d<sub>6</sub> с концентрацией 50 мг/500 мкл. Спектры анализировали с помощью программы SPINWORKS.

Молекулярные массы олигонуклеотидов и олигонуклеотидных аналогов определяли с помощью *масс-спектрометрии* (ионизация методом электрораспыления) на приборе «Agilent G6410A LCMS/MS» (США). Образцы олигонуклеотидов готовили растворением в 20 мМ триэтиламмоний ацетате в 60% водном ацетонитриле до концентрации 0.1 мМ и

объема 10 мкл. Анализ проводился с использованием 80% водного ацетонитрила в качестве элюента при скорости потока 0,1 мл/мин, в режиме регистрации отрицательно заряженных ионов.

### Органический синтез

Синтез диаминокарбений азидов (A01-A07) описан в работе [6].

*Базовая методика* одностадийного синтеза азидов из коммерчески доступных хлорпроизводных (сульфонилхлоридов для азидов **A11-A14** и трисаминофосфонийхлорида для азидов **A10**).

Для получения цианазидов (**A21**) применяли аналогичный метод, однако реакцию проводили при охлаждении до 0 °С в течение 3 ч.

К 0,5 М раствору соответствующего хлорида в ацетонитриле при перемешивании добавляли твердый азид натрия. Реакцию проводили в течение 20 ч. Затем отделяли осадок центрифугированием, и полученный раствор азидов использовали без выделения.

*Спектры ЯМР:*

**A10.** Гексафторфосфат азидотрис(пирролидино)фосфония

$^1\text{H-NMR}$  (80 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 1.99 (t, 4H, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3.32 (t, 4H, -N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-).

$^{31}\text{P-NMR}$  (32 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 23.52 (P<sup>+</sup>), -210.11 – -78.8 (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, hept)

**A11.** Октансульфонилазид

$^1\text{H-NMR}$  (80 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.88 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1.30 (m, 12H, -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.88 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub>).

**A12.** Декансульфонилазид

$^1\text{H-NMR}$  (80 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.88 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1.27 (m, 16H, -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.88 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub>).

**A13.** Додекансульфонилазид

$^1\text{H-NMR}$  (80 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.88 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1.27 (m, 20H, -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.88 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub>).

**A14.** Гексадекансульфонилазид

$^1\text{H-NMR}$  (80 МГц,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.88 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>), 1.27 (m, 28H, -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-CH<sub>3</sub>), 0.88 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CH<sub>3</sub>).

#### Подробные описания методов синтеза. **A16.** Бутилсульфамоилазид

К раствору сульфурилхлорида (243 мкл, 3 ммоль) в 5 мл ацетонитрила при охлаждении добавили азид натрия (200 мг, 3 ммоль). Реакцию проводили в течение 20 ч при комнатной температуре. Затем реакцию смесь отфильтровали, и при охлаждении добавили бутиламин (563 мкл, 5,7 ммоль). Реакцию проводили в течение 3 ч при комнатной температуре, затем реакцию смесь отфильтровали, упарили, растворили в 50 мл дихлорметана, промывали последовательно 1 М соляной кислотой (x2), 10% гидрокарбоната натрия и насыщенным раствором NaCl и высушивали над сульфатом натрия. После упаривания получено 92 мг продукта в виде белого порошка (выход 17 %).

$^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.93 (t,  $-\text{CH}_3$ , 3H), 1,17-1,70 (m, 4H,  $\text{NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ), 3.04 (t, 2H,  $-\text{NH-CH}_2\text{-}$ ).

#### **A17.** (N-метилпиперазино)сульфонилазид

К раствору сульфурилхлорида (243 мкл, 3 ммоль) в 5 мл ацетонитрила при охлаждении добавили азид натрия (200 мг, 3 ммоль). Реакцию проводили в течение 20 ч при комнатной температуре. Затем реакцию смесь отфильтровали, и при охлаждении добавили N-метилпиперазин (570 мкл, 5,1 ммоль). Реакцию проводили в течение 3 ч при комнатной температуре, затем реакцию смесь отфильтровали, упарили и очищали методом колоночной хроматографии в системе 3% триэтиламина в этаноле. После упаривания получено 300 мг продукта в виде белого порошка (выход 49%).

$^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ,  $\delta$ , ppm): 2.19 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 2.31-2.52 (m, 8H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ).

#### **A19.** Имидазолсульфонилазид

К раствору сульфурилхлорида (243 мкл, 3 ммоль) в 5 мл ацетонитрила при охлаждении добавили азид натрия (200 мг, 3 ммоль). Реакцию проводили в течение 20 ч при комнатной температуре. Затем реакцию смесь отфильтровали, и при охлаждении добавили имидазола (408 мкл, 2 ммоль). Реакцию проводили в течение 3 ч при комнатной температуре, затем реакцию смесь отфильтровали, упарили, растворили в 50 мл этилацетата и промывали последовательно водой (x2), 10%  $\text{NaHCO}_3$  и насыщенным раствором NaCl, затем высушивали над сульфатом натрия. После упаривания получено 278 мг продукта в виде прозрачной жидкости (выход 55 %).

$^1\text{H-NMR}$  (80 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 7.19 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 8.00 (s, 1H).

### 3. Результаты и обсуждения

#### 3.1. Реакция Штаудингера как инструмент для получения производных нуклеиновых кислот

Окисление фосфиттриэфиров органическими азидами по реакции Штаудингера является многофункциональным инструментом для получения производных олигонуклеотидов. Наибольшей эффективностью в реакции Штаудингера характеризуются электрон-дефицитные азиды [6]. В рамках данной работы различные классы азидов были использованы для получения представителей различных классов олигонуклеотидных производных. С точки зрения особенностей строения азидов-модификаторов и свойств получаемых производных можно выделить три группы.

Группа I.

Алкил/арилазиды.

Олигонуклеотидные производные: амидофосфаты

Большинство азидов, относящихся к данной категории, не являются электрон-дефицитными и, соответственно, не отличаются высокой реакционной способностью [7]. Получаемые производные, амидофосфаты, не заряжены в водном растворе. Важно отметить низкую стабильность многих представителей данного класса производных в кислой среде [4]. Введение акцепторных заместителей в состав алкил/арилазида может существенно повысить реакционную способность и повлиять на свойства получаемых производных.

Группа II.

Катионные азиды.

Олигонуклеотидные производные: представители различных классов, не заряжены в водном растворе.

Катионные азиды являются электрондефицитными и, соответственно, характеризуются высокой реакционной способностью. Получаемые олигонуклеотидные производные не заряжены и содержат донорную группу, сопряженную с фосфатом (структуры  $P-N=X$ , где  $X$  – донорная группа). В отличие от амидофосфатов, такие производные отличаются стабильностью в кислой среде, что было проверено на отдельных

примерах. К данной группе относятся, в частности, диаминокарбенилазиды и, соответственно, получаемые фосфорилазидиновые олигонуклеотидные производные.

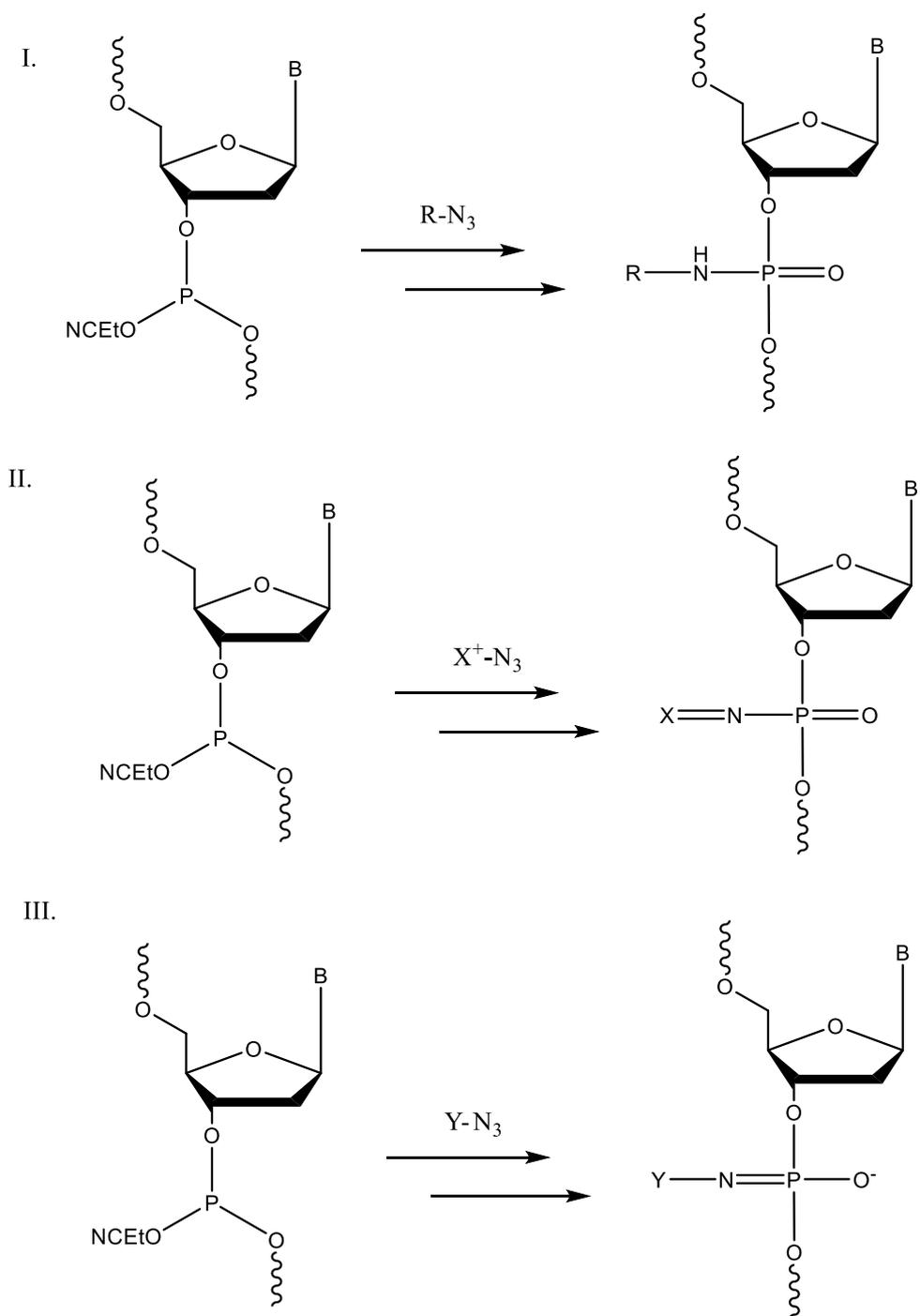


Рис. 1.

### Группа III.

Азиды с сопряженными акцепторами.

Олигонуклеотидные производные: амидофосфаты с сопряженными акцепторами, отрицательно заряжены в водном растворе.

Данные азиды содержат акцепторные группы, непосредственно сопряженные с азидогруппой, в составе получаемых олигонуклеотидных производных акцепторная группа остается сопряженной с амидофосфатной. Такие производные, в отличие от амидофосфатов, отрицательно заряжены, и, подобно представителям группы II, характеризуются стабильностью в кислой среде.

### 3.2. Катионные азиды

**3.2.1. Диаминокарбенийазиды для получения фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидных производных. Схемы синтеза тетразамещенных диаминокарбенийазидов.**

Диаминокарбенийазиды (рис. 2, а) – класс катионных азидов, используемых для получения фосфорилгуанидиновых (ФГ) производных олигонуклеотидов (рис. 2, б). На примере единственного коммерчески доступного диаминкарбенийазида, гексафторфосфата 2-азидо-1,3-диметилимидазолидия (ADMP) была продемонстрирована высокая реакционная способность данного класса азидов [3].

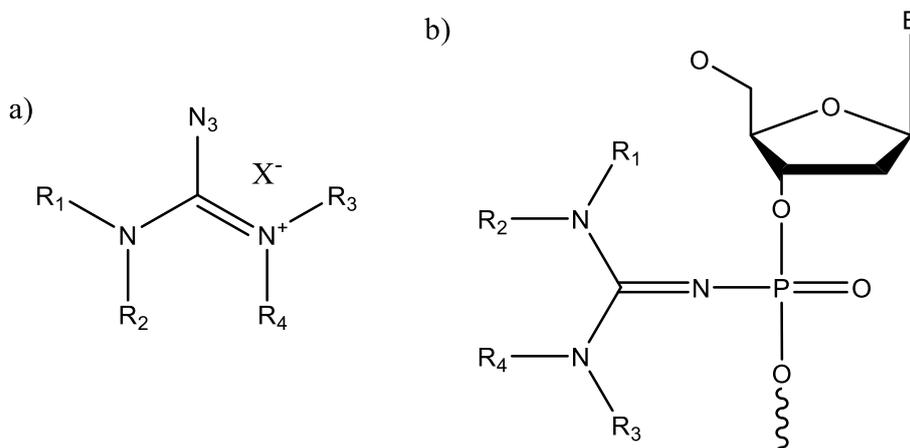


Рис. 2. а) Структура диаминокарбенийазида; б) Структура фосфорилгуанидинового производного

Возможность высокоэффективного введения фосфорилгуанидиновых модификаций в автоматическом режиме позволила создавать разнообразные олигонуклеотидные

конструкции, содержащие ФГ модификации: как полномодифицированные, так и в сочетании с нативными нуклеотидными звеньями или с другими видами модификаций. Олигонуклеотиды с ФГ модификациями нашли различные терапевтические и диагностические применения [8-11]. Однако важно отметить, что все эти результаты получены лишь для одного из представителей класса ФГ модификаций, несущего остаток 1,3 – диметилимидазолидина.

Для получения диаминокарбенийазидов, несущих различные заместители, была предложена синтетическая схема [6] (рис. 3). Данная схема предполагает сборку тетразамещенных мочевин или тиомочевин, их превращение в хлорпроизводные, (т. наз. соли Вильсмайера) и, наконец, замещение хлора на азидогруппу с получением целевого соединения.

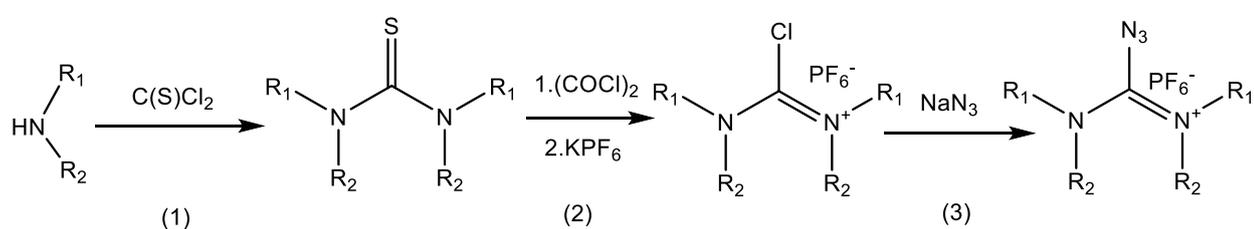


Рис. 3. Схема синтеза тетразамещенных диаминокарбенийазидов

Ближайшими предшественниками азидов являются соли Вильсмайера. В каталогах химических реактивов можно найти лишь несколько таких соединений. Соли Вильсмайера, в свою очередь, могут быть получены из тетразамещенных мочевин (или тиомочевин). Разнообразие коммерчески доступных мочевин несколько выше, однако все равно ограничено. В качестве исходных соединений для получения тетразамещенных мочевин могут быть использованы различные вторичные амины. Широкий набор коммерчески доступных аминов обеспечивает возможность получения азидов с разнообразными заместителями.

С использованием разработанной схемы была получена библиотека азидов, несущих алкильные заместители различной длины (рис.): от компактных, в т. ч. циклических (A01-A04) до протяженных (A06-A07).

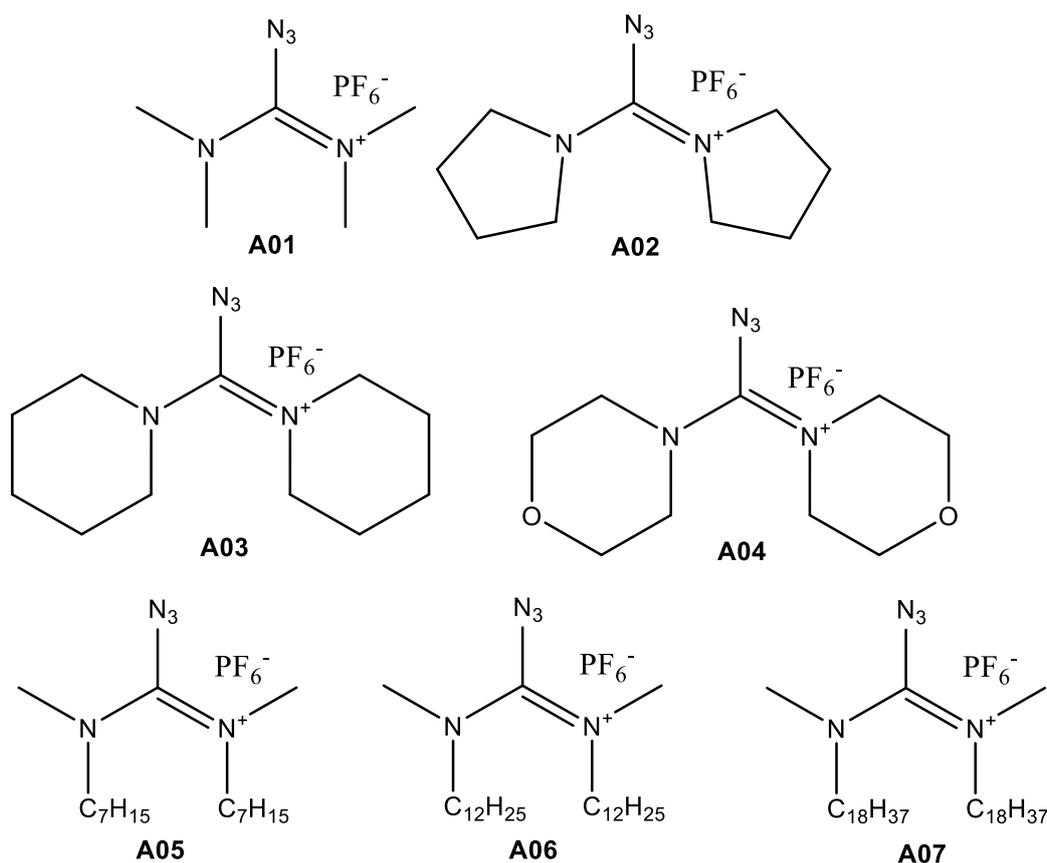


Рис. 3. Библиотека полученных диаминокарбенийазидов

Анализ полученных значений конверсии [6] показывает, что компактные азиды А01-А04 встраиваются с высокой эффективностью в умеренных условиях. При этом для азидов с наиболее объемными заместителями (А06, А07) наблюдается существенное понижение реакционной способности. Таким образом, несмотря на высокую реакционную способность диаминокарбенийазидов, обусловленную их акцепторной природой, стерические затруднения существенным образом влияют на эффективность их встраивания. По этой причине азиды с наиболее объемными заместителями встраиваются с умеренной эффективностью лишь в жестких условиях, что делает затруднительным автоматическое введение модификации и получение множественно модифицированных олигонуклеотидов. Однако при этом даже одна введенная модификация существенно увеличивает гидрофобность олигонуклеотида, что в перспективе может быть использовано для получения липофильных производных, отличающихся улучшенным проникновением в клетки.

### 3.2.2. Получение незамещенных фосфорилгуанидиновых производных

Помимо различных замещенных ФГ производных, представляют интерес олигонуклеотиды с незамещенными ФГ группами – наименее объемной модификацией среди всех представителей данного класса. Для их получения необходимо синтезировать незамещенный гуанилазид. Приведенная выше схема пригодна исключительно для получения тетразамещенных диаминокарбенийазидов. Для получения гуанилазида был выбран синтетический путь, предполагающий окисление гидразинового фрагмента в составе аминогуанидина нитритом натрия в кислых условиях [12].

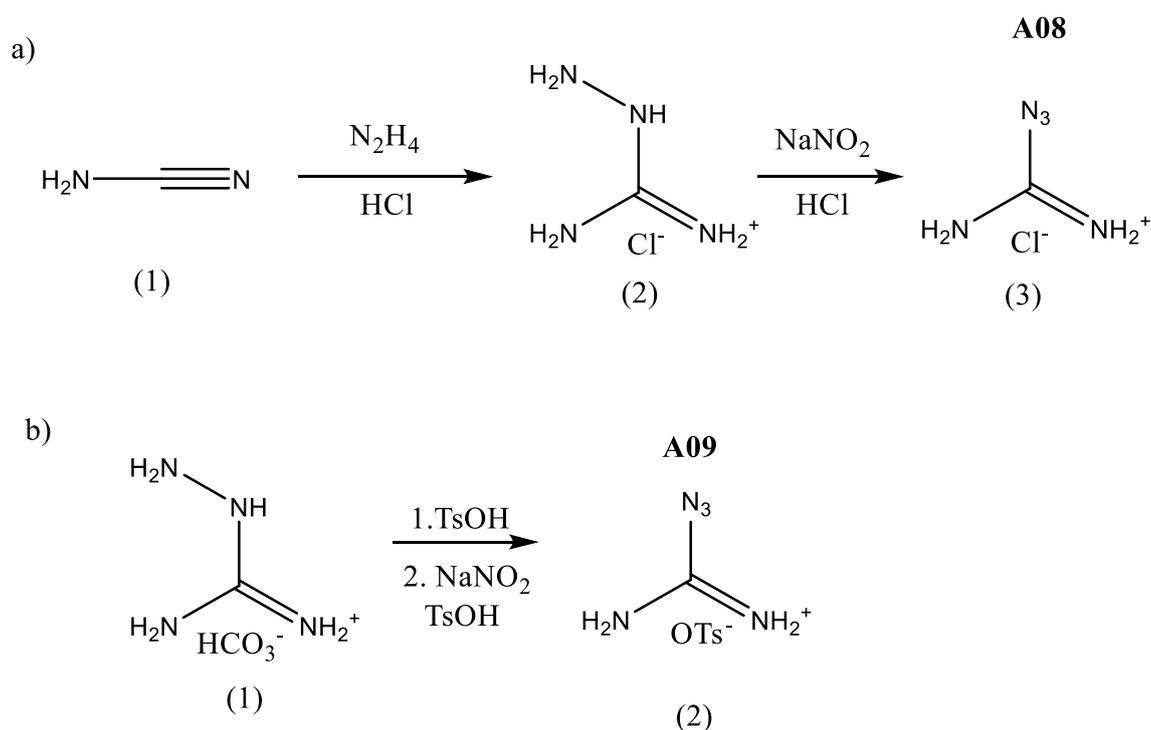


Рис. 4. Схема получения различных солевых форм гуанилазида.

В качестве исходного вещества был выбран цианамид, коммерчески доступный реагент (Рис. 4, а). На первой стадии осуществляли присоединение гидразина по цианогруппе с получением гидрохлорида аминогуанидина. Далее действием нитрита натрия в присутствии соляной кислоты превращали аминогуанидин в гуанилазид.

Полученная соль гуанилазида оказалось нерастворимой в большинстве ненуклеофильных органических растворителей, в том числе и в ацетонитриле, ранее использовавшемся для введения большинства модификаций по реакции Штаудингера. Замещение противоиона на гексафторфосфат не привело к увеличению растворимости в

ацетонитриле. Поэтому для проведения пробных экспериментов был выбран этанол, полярный нуклеофильный растворитель.

Эксперименты показали, что эффективность встраивания гуанилазида составляет не более 80% в мягких условиях (0,5 М раствор, 1 ч, 25 °С), при этом увеличение времени или температуры проведения реакции не приводило к возрастанию конверсии.

Более высокой эффективности введения модификации удалось достичь при использовании гуанилазида в форме соли с п-толуолсульфокислотой (рис. 4, в). Для этой цели было предложено заменить в используемой схеме соляную кислоту на п-толуолсульфокислоту для получения азида в соответствующей солевой форме.

При планировании нового синтеза в качестве исходного вещества был выбран бикарбонат аминокванидина, коммерчески доступный реагент, из которого путем замещения бикарбонат-иона на остаток сильной кислоты можно получить соответствующую солевую форму. В ходе синтеза на первой стадии действием п-толуолсульфокислоты замещали противоион на тозилат. Далее осуществляли окисление нитритом натрия также в присутствии п-толуолсульфокислоты.

Полученный тозилат гуанилазида был растворим в ацетонитриле. Было показано, что даже при использовании 0,1 М раствора при комнатной температуре, эффективность введения модификации составляла более 99%. Таким образом, при условии правильного подбора противоиона и растворителя, была показана возможность достижения эффективности введения гуанилазида, не уступающей эффективности встраивания наиболее компактного представителя тетразамещенных азидов - коммерчески доступного азида ADMP.

### **3.2.3. Трисаминофосфоний ази́ды для получения фосфорилфосфазеновых олигонуклеотидных производных**

Другим классом катионных электрон-дефицитных азидов являются трисаминофосфоний ази́ды (рис. 5, а). Данные ази́ды являются электрон-дефицитными [13], поэтому представляют интерес как модификаторы для получения олигонуклеотидных производных. Можно ожидать, что образующиеся в результате введения азидов фосфорилфосфазеновые (рис. 5, в) производные будут близки по свойствам к фосфорилгуанидиновым.

Для проведения эксперимента из ближайшего коммерчески доступного предшественника, соответствующего хлорпроизводного, был синтезирован гексафторфосфат азидотрис(пирролидино)фосфония (рис 5, с).

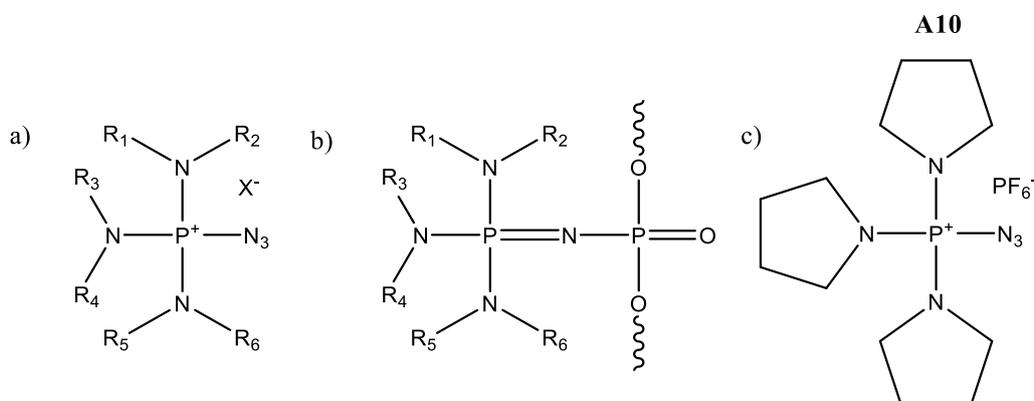


Рис. 5. а) Общая формула триаминофосфонийазидов; б) Общая формула фосфорилфосфазенового олигонуклеотидного производного; в) Структура полученного в данной работе гексафторфосфата азидотрис(пирролидино)фосфония

При встраивании азиды высоких значений конверсии, более 80%, удалось достичь лишь в относительно жестких условиях (0,5 М раствор азиды в ацетонитриле, 3 ч, 50 °С). Таким образом, реакционная способность данного азиды ниже в сравнении с ближайшими аналогами – диаминокарбоний азиды, несмотря на наличие положительного заряда и, следовательно, акцепторности азиды. Вероятно, данное явление связано со стерическими затруднениями, обусловленными наличием трех достаточно объемных групп, связанных с атомом фосфора.

Исследование электрофоретической подвижности полученных фосфорилфосфазеновых производных показало, что они находятся в незаряженном состоянии, что сближает их по свойствам с фосфорилгуанидиновыми производными. Кроме того, было показано, что, как и фосфорилгуанидины, фосфорилфосфазены устойчивы в кислой среде и не деградируют при выдерживании в 0,1 М HCl в течение 3 ч, тогда как амидофосфаты в этих условиях нестабильны [4].

### 3.3. Азиды с сопряженными акцепторами

#### 3.3.1. Сульфолазиды для получения сульфоламидофосфатных олигонуклеотидных производных

Сульфолазиды (рис. 6, а) – класс катионных азидов, используемых для получения сульфоламидофосфатных производных олигонуклеотидов (рис. 6, б). Акцепторная сульфогруппа обеспечивает реакционную способность азидов, и вместе с тем, оставаясь сопряженной с амидофосфатной группой в составе олигонуклеотидного производного, обеспечивает отрицательный заряд модификации. На примере мезилазида (метансульфолазида), простейшего представителя сульфолазидов, была продемонстрирована высокая реакционная способность данного класса азидов и возможность высокоэффективного введения множественных модификаций в автоматическом режиме. Были изучены свойства олигонуклеотидов с метансульфоламидофосфатными модификациями и продемонстрирована возможность биологического применения. [5] [14].

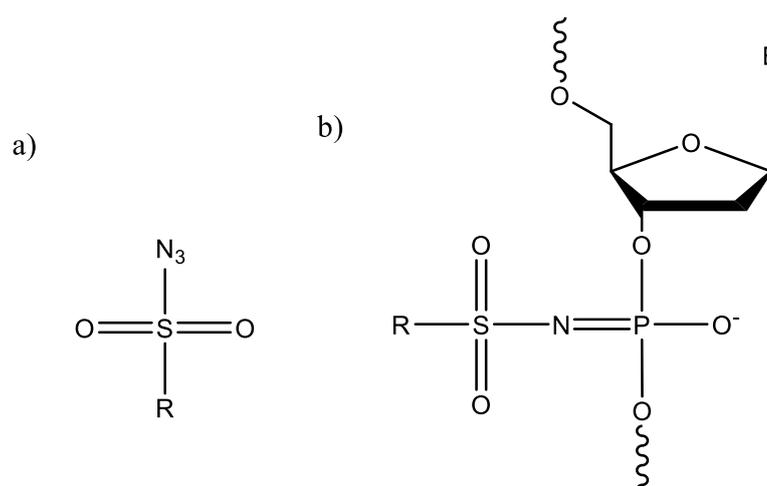


Рис. 6. а) Структура сульфолазида; б) Структура сульфоламидофосфатного производного

Однако сульфоламидофосфаты, как и фосфорилгуанидины, являются расширяемым классом модификаций, при этом возможность получения новых представителей класса обеспечивается наличием в каталогах реактивов большого количества коммерчески доступных сульфонилахлоридов, ближайших предшественников сульфолазидов. Возможность простого одностадийного синтеза сульфолазидов,

несущих различные заместители, (позволяет получать различные представители класса сульфониламидофосфатов.)

Для сравнительного исследования реакционной способности в данной работе были получены сульфонилазиды (A11-A14) с алифатическими заместителями, содержащими от восьми до шестнадцати атомов углерода (рис. 7). Полученные сульфонилазиды использовали без дополнительной очистки. Также для введения модификации был использован коммерчески доступный 4-додецилбензосульфонилазид (A15), содержащий длинную алифатическую цепь, связанную с бензольным фрагментом.

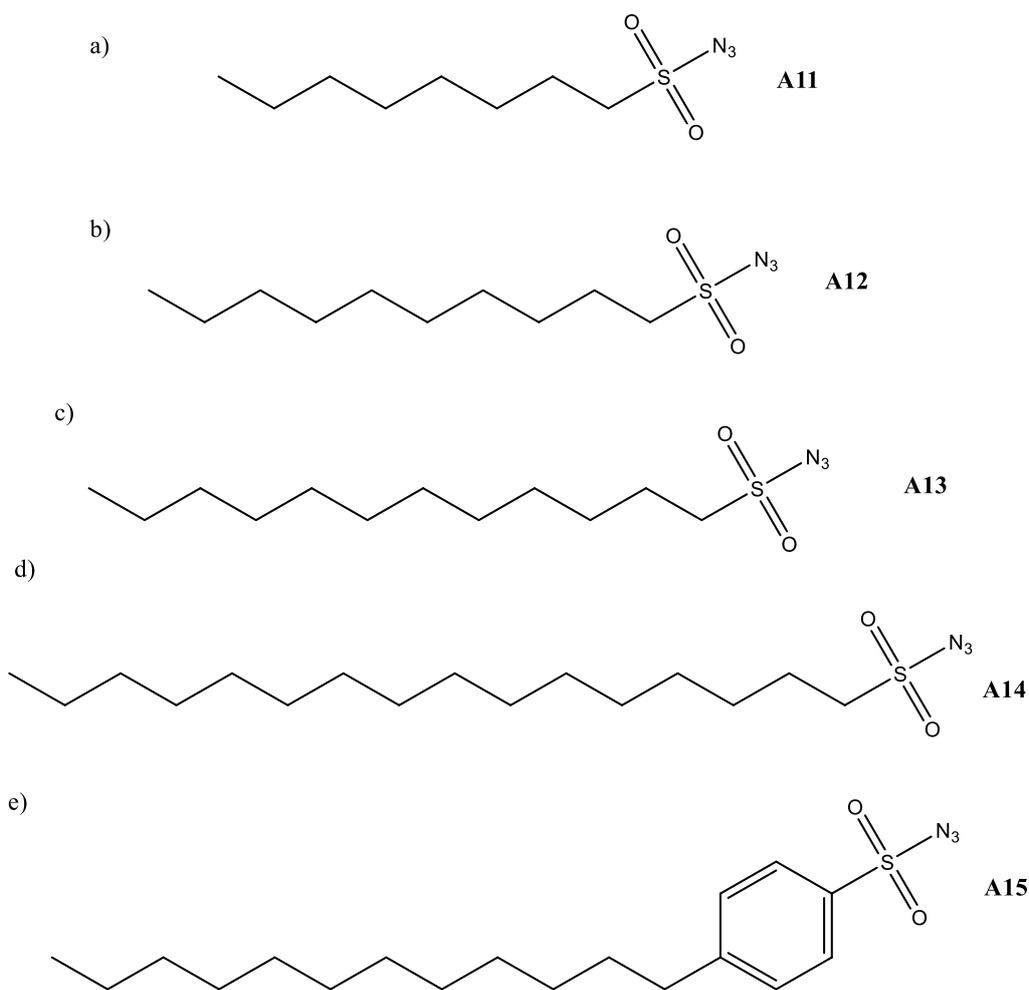


Рис. 7. Структуры сульфонилазидов: а) октансульфонилазид; б) декансульфонилазид; в) додекансульфонилазид; г) гексадекансульфонилазид; д) 4-додецилбензосульфонилазид.

Исследование реакционной способности показало, что сульфонилазиды с длиной алкильного заместителя от 8 до 12 атомов углерода (A11-A14) встраиваются с высокой эффективностью, более 90%, в мягких условиях (0,5 М раствор азида в ацетонитриле, 1 ч, 25 °С), что делает возможным автоматическое введение модификаций. Лишь для азида A14 с остатком длиной 16 атомов углерода наблюдается падение реакционной способности, и сопоставимое значение конверсии достигается только при повышенной температуре.

Азид A15, содержащий бензододецильный остаток, характеризуется высокой реакционной способностью, и встраивается с высокой эффективностью в мягких условиях, несмотря на объем заместителя. Однако интересно отметить, что на хроматограмме наблюдалось образование группы из четырех раздвоенных пиков, соответствующих продуктам введения модификации, тогда как на электрофореграмме наблюдалась гомогенная зона.

Масс-спектрометрический анализ полученного олигонуклеотидного производного позволил выявить причину столь значительного расщепления хроматографического пика, соответствующего продукту введения модификации. На рис. 8, б представлен фрагмент масс-спектра, соответствующий 3-зарядным ионам. Можно обнаружить, что, помимо пика, соответствующего ожидаемому продукту, наблюдается также 3 пика с отличающимся значением массы. По результатам расчетов можно определить, что разность между расчетными значениями масс для продуктов, соответствующих соседним пикам, соответствует массе метиленового фрагмента ( $-\text{CH}_2-$ ).

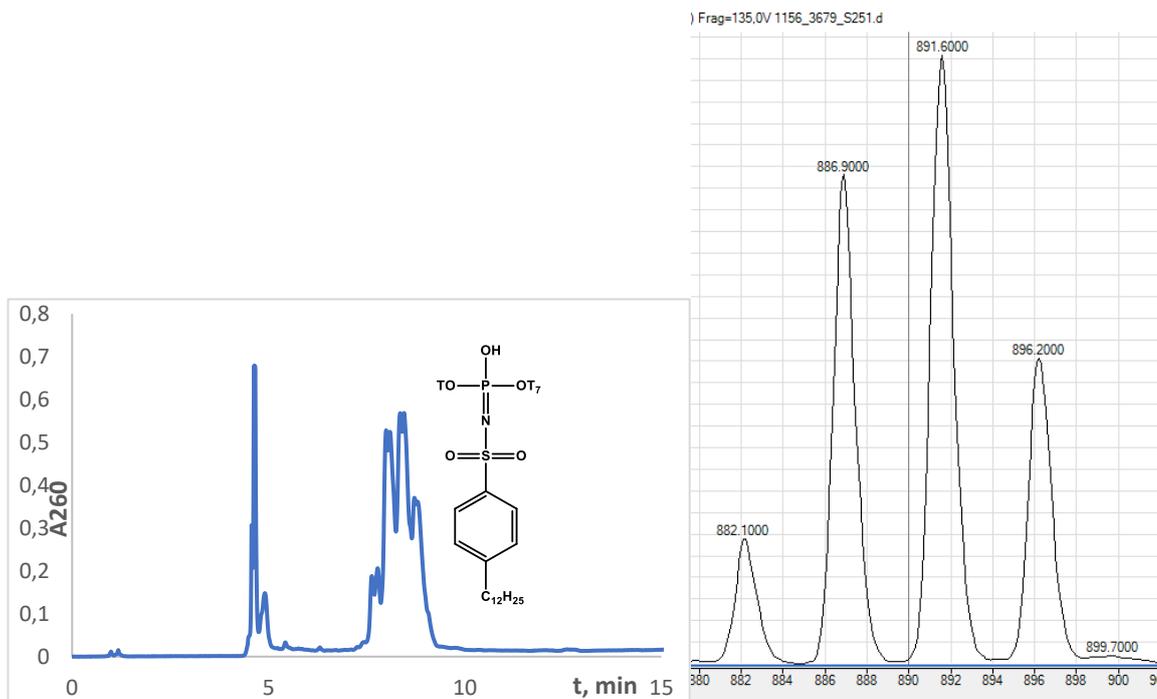


Рис. 8. Профиль ОФ ВЭЖХ (Градиент ацетонитрила 0-50% за 15 мин) и фрагмент масс-спектра, соответствующий 3-зарядным ионам (ESI, Negative mode) для сульфониламидофосфатного производного с остатком безододецила. Последовательность 5'-Т\*ТТТТТТТ-3'.

Данное наблюдение позволяет предположить, что коммерчески доступный 4-додецилбензосульфониазид на самом деле представляет собой смесь азидов с длиной алифатической цепи от десяти до тринадцати атомов углерода, поэтому при введении модификации образуется смесь олигонуклеотидных производных, отличающихся по гидрофобности, что и приводило к столь значительному расщеплению хроматографического пика. Также можно заметить, что соотношение интенсивностей четырех пиков на хроматограмме совпадает с соотношением интенсивностей пиков на масс-спектре, что дополнительно подтверждает данную гипотезу. Раздвоенность же каждого из четырех пиков связана с существованием диастереомерных форм.

Таким образом, сульфониазиды с различными алифатическими заместителями являются перспективными инструментами для введения модификаций в состав олигонуклеотидов и позволяют получать липофильные производные.

### 3.3.2. Сульфамоилазиды для получения сульфамоиламидофосфатных олигонуклеотидных производных.

Синтез сульфонилазидов из коммерчески доступных сульфонилхлоридов позволяет получать разнообразные олигонуклеотидные производные. Однако, несмотря на большое количество сульфонилхлоридов, представленных в каталогах реактивов, их набор все же ограничен. В связи с этим актуальной задачей являлась разработка синтетической схемы, которая позволила бы быстро и эффективно получать сульфонилазиды или их аналоги, несущие различные заместители.

Для этой цели было предложено синтезировать сульфамоилазиды (рис. 9), ближайšie аналоги сульфонилазидов, содержащие остаток амина, связанный с сульфогруппой [15]. В качестве исходного соединения использовали сульфурилхлорид (1). На первой стадии осуществлялось замещение одного из атомов хлора на азидогруппу. Далее, с учетом возможности образования взрывоопасных соединений, промежуточный продукт (2) не выделяли и сразу же замещали оставшийся атом хлора на аминогруппу. Предложенная схема позволяет получать сульфонилазиды с использованием разнообразных коммерчески доступных аминов.

На примере бутилсульфамоилазида было показано, что реакционная способность данного класса азидов значительно ниже, чем у сульфонилазидов. Так, для бутилсульфамоилазида в мягких условиях (0,5 М раствор азидов в ацетонитриле, 1 ч, 25 °С) эффективность встраивания не превышала 50%, и лишь в жестких условиях (3 ч, 50 °С) удалось добиться высокой конверсии, близкой к количественной. При этом сульфонилазиды с длиной алкильного остатка до 12 атомов углерода, как было показано выше, характеризуются существенно более высокой реакционной способностью. Можно предположить, что понижение реакционной способности сульфамоилазидов связано с донорными свойствами аминогруппы.

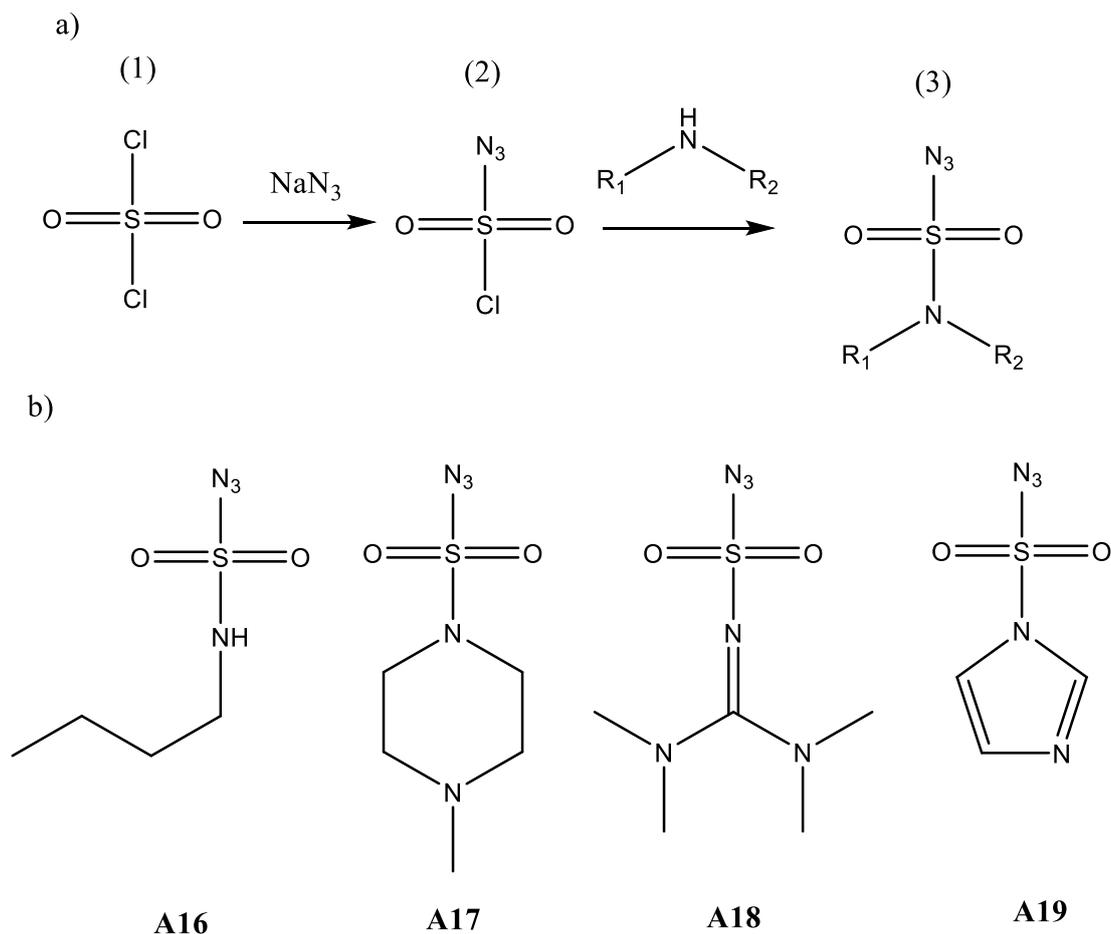


Рис. 9. Схема синтеза сульфамойлазидов. Синтезированные азиды: а) Бутилсульфамойлазид, б) 4-метилпиперазинсульфамойлазид

На примере азидов A17, A18 была продемонстрирована возможность использования схемы для введения функциональных заместителей в состав олигонуклеотидов. Стоит отметить, что, как показал электрофоретический анализ, производное с остатком метилпиперазина существует в водном растворе в цвиттер-ионной форме, обусловленной протонированием третичной аминогруппы. Остаток же тетраметилгуанидина в составе соответствующего производного не протонируется, так как непосредственно сопряжен с акцепторной сульфонилдаминофосфатной группой.

После успешной демонстрации возможности получения сульфамойламинофосфатных производных, несущих различные заместители, посредством синтеза соответствующих азидов, была предпринята попытка использования общего предшественника, чтобы реализовать встраивание остатков аминов в состав

олигонуклеотида уже после проведения реакции Штаудингера. Для этой цели было предложено применять имидазолсульфонилазид (рис. 9, ) – применяемый в синтетической практике электрон-дефицитный азид [16]. Стоит отметить, что реакционная способность данного азиды оказалась выше, чем для ранее полученных сульфамолилазидов, встраивание проходило с высокой эффективностью в мягких условиях, что объясняется, вероятно, акцепторной природой имидазольной группы.

Предполагалось, что после встраивания такого азиды остаток имидазола можно будет заместить на остаток соответствующего амина. Однако, как показали эксперименты, даже при обработке водным раствором метиламина на стадии отщепления олигонуклеотида от твердофазного носителя замещения не происходило, что было подтверждено масс-спектрометрическим анализом. Вероятно, сопряжение сульфогруппы с фосфатной группой затрудняет замещение имидазола, стабилизируя тем самым продукт.

### **3.3.3. Другие классы азидов с сопряженными акцепторами. Фосфорилазиды и цианазид.**

Помимо сульфонилазидов, существуют и другие классы электрон-дефицитных азидов с сопряженными акцепторами. Среди них можно отметить фосфорилазиды (рис. 10, а), при встраивании которых в состав олигонуклеотидов можно ожидать получения фосфориламидофосфатных производных (рис. 10, б).

Для проведения пробного эксперимента был использован коммерчески доступный дифенилфосфорилазид (рис. 10, с). Было показано, что даже при проведении реакции в относительно жестких условиях (0,5 М раствор азиды в ацетонитриле, 3 ч, 50 °С) конверсия не превосходила 10%. Вероятно, столь низкая реакционная способность объясняется, во-первых, стерическими затруднениями, и, во-вторых, более слабыми акцепторными свойствами фосфорильной группы по сравнению, например, с сульфонильной. Стоит отметить, что фосфориламидофосфатная группа, подобно сульфониламидофосфатной, заряжена в условиях электрофореза отрицательно.

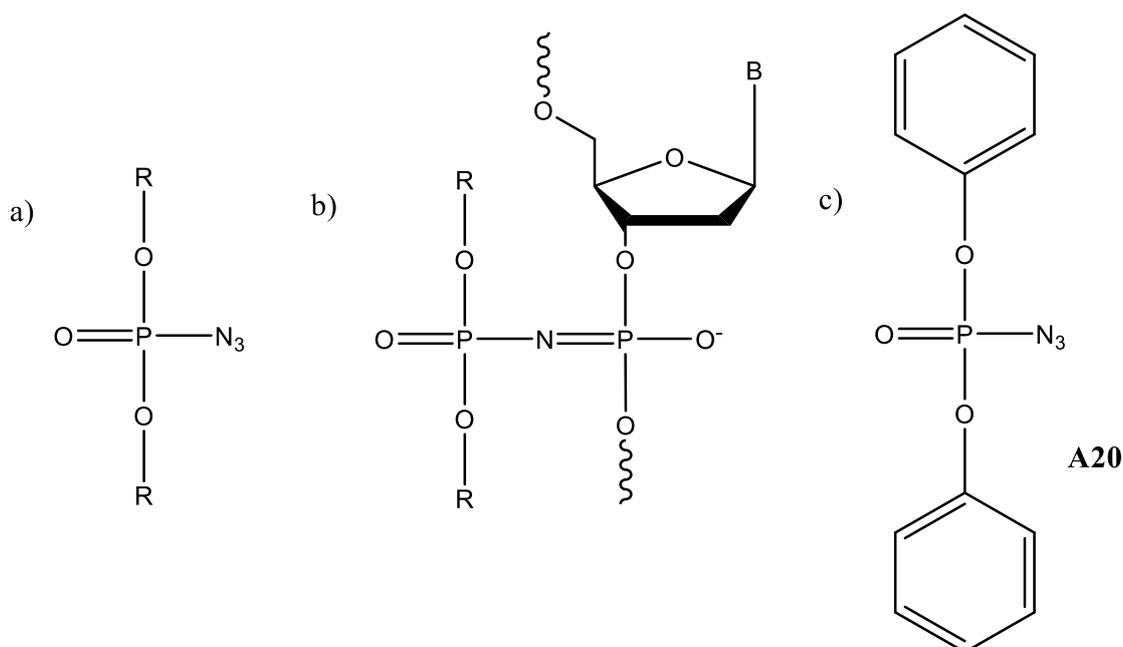


Рис. 10. а) Структура фосфорилазида; б) Структура фосфориламидофосфатного производного; в) Структура дифенилфосфорилазида

Другим электрон-дефицитным азидом с сопряженной акцепторной группой является цианазид (рис. 11, а). В отличие от ранее рассмотренных классов азидов, данное соединение является единственным представителем своего класса. Можно ожидать, что при встраивании таких азидов образуются цианамидофосфатные производные (рис. 11, б), которые затем могут подвергаться превращениям на стадии отщепления олигонуклеотида от твердофазного носителя за счет присоединения аммиака или метиламина по цианогруппе с получением соответствующего фосфорилгуанидинового производного.

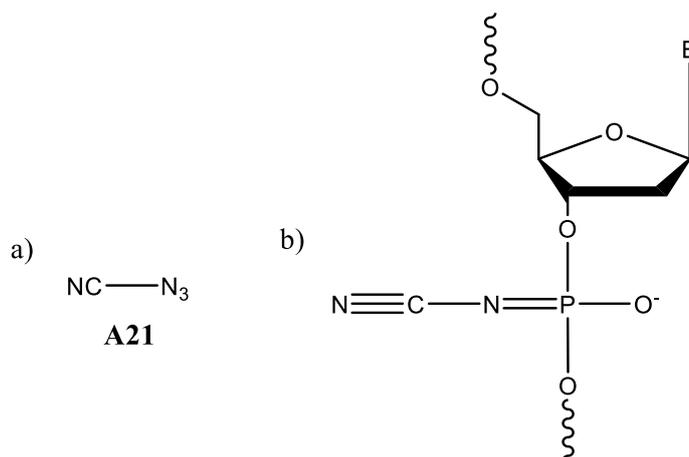


Рис. 11. а) Структура цианазида; б) Структура цианамидофосфатного производного.

Для проверки возможности протекания такого процесса на стадии отщепления проводили обработку метиламином в течение длительного времени (20 ч при 55 °С). Как показали результаты анализа (Табл. 1.), в качестве основного продукта (более 80%) образуется цианамидофосфатное производное, что свидетельствует о высокой эффективности протекания реакции Штаудингера.

Структура	Теор. масса	Эксп. масса	Доля
	2370.4	2370.4	~10%
	2394.4	2394.4	~80%
	2412.4	2412.0	~10%

Табл. 1. Состав реакционной смеси при встраивании цианазида по данным масс-спектрометрического анализа и ОФ ВЭЖХ. Условия реакции Штаудингера: 0.5 М раствор азида в ацетонитриле, 1 ч, 25 °С.

При этом масса минорного продукта, вопреки ожиданиям, соответствует не фосфорилгуанидиновому производному, но фосфорилмочевинному, образующемуся при гидролизе цианогруппы, тогда как присоединения метиламина не происходило вовсе. Замена метиламина на аммиак и варьирование времени обработки не повлияли на состав реакционной смеси, во всех случаях наблюдались идентичные результаты.

Следует также отметить, что цианамидофосфатная группа, подобно сульфониламидофосфатной, отрицательно заряжена в условиях электрофореза. Таким образом было показано, что цианазид отличается высокой реакционной способностью и позволяет получать цианамидофосфатное производное, однако при этом в незначительном количестве образуются также побочные продукты.

#### 4. Выводы

1. Получены отдельные представители новых, ранее не изученных классов фосфат-модифицированных олигонуклеотидных производных по реакции Штаудингера: фосфорилфосфазены с использованием трисаминофосфонийазидов, фосфориламидофосфаты с использованием фосфорилазидов, сульфамоиамидофосфаты с использованием сульфамоиазидов и цинамидофосфат с использованием цианазида

2. Изучена сравнительная реакционная способность представителей различных классов электро-дефицитных азидов. Для диаминокарбенийазидов и сульфонилазидов показано, что реакционная способность падает лишь для азидов с наиболее объемными заместителями, тогда как даже относительно компактные трисаминофосфонийазиды и сульфамоиазиды характеризуются более низкой реакционной способностью

3. Реализованы синтетические схемы, позволяющие получать диаминокарбенийазиды, сульфонилазиды и сульфамоиазиды, несущие различные заместители, в том числе гидрофобные и катионные, и получены библиотеки соответствующих олигонуклеотидных производных.

4. Полученные олигонуклеотидные производные охарактеризованы методами ОФ ВЭЖХ, геле-электрофореза и масс-спектрометрии. Для представителей новых классов, в частности, методом геле-электрофореза изучено зарядовое состояние модифицированной межнуклеотидной группы.

## Список литературы

1. Belgrad, J., Fakih, H. H., Khvorova, A. Nucleic Acid Therapeutics: Successes, Milestones, and Upcoming Innovation // *Nucleic Acid Ther.* 2024, V. 34, No. 2, P. 52-72.
2. Egli, M., Manoharan, M. Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics // *Nucleic Acids Res.* 2023, V. 51, No. 6, P. 2529-2573.
3. Modified Oligonucleotides and Methods for Their Synthesis // Patent WO2016028187A1 / Stetsenko D., Kupryushkin M., Pyshnyi D.
4. Kupryushkin M. S., Zharkov T. D., et al. Triazinylamidophosphate oligonucleotides: synthesis and study of their interaction with cells and DNA-binding proteins // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* – 2021. V. 47. No. 3. P. 719-733.
5. 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, V. 116, No. 4, P. 1229-1234.
6. Zhukov S.A., Pyshnyi D. V., Kupryushkin M.S. Synthesis of Novel Representatives of Phosphoryl Guanidine Oligonucleotides // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2021. Vol. 47, № 2. P. 380–389.
7. Zharkov, T. D., Mironova, E. M., Markov, O. V., Zhukov, S. A., Khodyreva, S. N., Kupryushkin, M. S. Fork- and Comb-like Lipophilic Structures: Different Chemical Approaches to the Synthesis of Oligonucleotides with Multiple Dodecyl Residues // *Int J Mol Sci.* 2023, V. 24, No. 19, P.
8. 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, V. 27, No. P. 211-226.
9. 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, V. 50, No. 10, P. 5401-5423.

10. Prokhorova, D. V., Kupryushkin, M. S., Zhukov, S. A., Zharkov, T. D., Dovydenko, I. S., Yakovleva, K. I., Pereverzev, I. M., Matveeva, A. M., Pyshnyi, D. V., Stepanov, G. A. Effect of the Phosphoryl Guanidine Modification in Chimeric DNA-RNA crRNAs on the Activity of the CRISPR-Cas9 System In Vitro // *ACS Chem Biol.* 2024, V. 19, No. 6, P. 1311-1319.

11. Dmitrienko, E., Naumova, O., Fomin, B., Kupryushkin, M., Volkova, A., Amirkhanov, N., Semenov, D., Pyshnaya, I., Pyshnyi, D. Surface modification of SOI-FET sensors for label-free and specific detection of short RNA analyte // *Nanomedicine (Lond).* 2016, V. 11, No. 16, P. 2073-2082.

12. Klapotke T. M., Mayer P., Stierstorfer J. Crystal Structures of Mono-, Di-, and Triaminoguanidinium Sulfate, as Well as Azidoformamidinium Sulfate: Important Precursors for Syntheses of Nitrogen Rich Ionic Compounds // *Phosphorus, Sulfur, and Silicon.* – 2009. – V. 184, No. 9., P. 2393-2407.

13. McGuinness M., Shechter H. Azidotris (diethylamino) phosphonium bromide: A self-catalyzing diazo transfer reagent // *Tetrahedron letters.* – 1990. V. 31. No 35. P. 4987-4990.

14. Anderson, B. A., Freestone, G. C., Low, A., De-Hoyos, C. L., Iii, W. J. D., Ostergaard, 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, V. 49, No. 16, P. 9026-9041.

15. Matier W. L., Comer W. T., Deitchman D. Sulfamoyl azides. Hydrolysis rates and hypotensive activity // *Journal of Medicinal Chemistry.* – 1972. V. 15. No. 5. P. 538-541.

16. Goddard-Borger, E. D., Stick, R. V. An efficient, inexpensive, and shelf-stable diazotransfer reagent: imidazole-1-sulfonyl azide hydrochloride // *Org Lett.* 2007, V. 9, No. 19, P. 3797-3800.



# Отчет о проверке

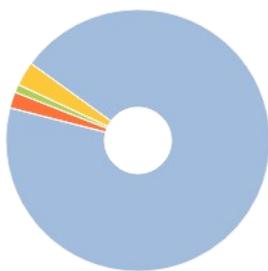
Автор: Жуков Сергей Артемович

Проверяющий: Мирошниченко Светлана Константиновна

Название документа: Диплом аспиранта\_Жуков\_CA\_wr

## РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ

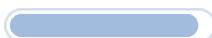
Тариф: FULL



Совпадения:  
1,87%



Оригинальность:  
93,98%



Цитирования:  
1,13%



Самоцитирования:  
3,02%



«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: 24

Тип документа: Не указано

Дата проверки: 10.09.2024 13:55:32

Дата корректировки: 10.09.2024 14:06:24

Количество страниц: 25

Символов в тексте: 34884

Слов в тексте: 4220

Число предложений: 355

Комментарий: не указано

## ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да

Выполнено распознавание текста (OCR): Да

Выполнена проверка с учетом структуры: Нет

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

➔ Модули, недоступные в рамках тарифа: Интернет Free

## ИСТОЧНИКИ

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	14,67%	0%	диплом-2020-06-07	07 Июн 2020	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[02]	13,74%	0%	Получение новых представител... <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	01 Янв 2021	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[03]	10,48%	0%	диплом_Жуков	11 Июн 2020	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[04]	9,21%	0%	Диплом_специалиста_Сероклино...	10 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[05]	8,78%	0%	диплом-2020-06-07	07 Июн 2020	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[06]	8,44%	0%	диплом_Жуков	11 Июн 2020	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[07]	8,05%	0%	Диплом_специалиста_Сероклино...	10 Июн 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[08]	6,22%	0%	i междисциплинарная всеросси... <a href="http://iopc.ru">http://iopc.ru</a>	17 Окт 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[09]	5,77%	0%	Дюдеева, Евгения Сергеевна Ис... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2022	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[10]	5,66%	0%	Book%20of%20Abstracts_Molecul... <a href="http://iopc.ru">http://iopc.ru</a>	07 Сен 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[11]	5,66%	0%	<a href="http://iopc.ru/base/file/Book%20of...">http://iopc.ru/base/file/Book%20of...</a> <a href="http://iopc.ru">http://iopc.ru</a>	23 Авг 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[12]	5,66%	0%	Book%20of%20Abstracts_Molecul... <a href="http://iopc.ru">http://iopc.ru</a>	29 Авг 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[13]	4,19%	0%	исследование свойств частично ... <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>	03 Ноя 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[14]	4,19%	0%	исследование свойств частично ... <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>	03 Ноя 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Нет переводных заимствований из источника.
[15]	3,73%	0%	<a href="http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...">http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...</a> <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>	16 Фев 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[16]	3,67%	0%	i междисциплинарная всеросси... <a href="http://iopc.ru">http://iopc.ru</a>	17 Окт 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.

[17]	3,67%	0%	<a href="http://iopc.ru/base/file/Book%20of...">http://iopc.ru</a>	24 Мар 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[18]	3,65%	0%	диплом_ЛаптеваАА_v1.0	11 Июн 2023	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[19]	3,37%	0%	<a href="http://iopc.ru/base/file/Book%20of...">http://iopc.ru</a>	23 Авг 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[20]	3,37%	0%	<a href="http://iopc.ru">http://iopc.ru</a>	07 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[21]	3,37%	1,65%	<a href="http://iopc.ru">http://iopc.ru</a>	29 Авг 2024	Интернет Плюс*	
[22]	3,11%	0%	<a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	05 Сен 2012	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[23]	3,06%	0%	диплом_ЛаптеваАА_v1.0	11 Июн 2023	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[24]	3,02%	3,02%	<a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	31 Июл 2020	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[25]	2,93%	0%	<a href="http://iopc.ru/base/file/Book%20of...">http://iopc.ru</a>	02 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[26]	2,93%	0,22%	<a href="http://iopc.ru/base/file/Book%20of...">http://iopc.ru</a>	23 Дек 2023	Интернет Плюс*	
[27]	2,76%	0%	<a href="https://www.twirpx.com/file/2172...">https://www.twirpx.com</a>	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[28]	2,49%	0%	<a href="https://sciencejournals.ru">https://sciencejournals.ru</a>	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[29]	2,48%	0%	<a href="https://pure.nsu.ru">https://pure.nsu.ru</a>	03 Ноя 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[30]	2,39%	0%	<a href="https://elibrary.ru">https://elibrary.ru</a>	20 Дек 2022	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[31]	2,3%	0%	<a href="https://elibrary.ru">https://elibrary.ru</a>	31 Дек 2021	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[32]	2,04%	0%	<a href="https://elibrary.ru">https://elibrary.ru</a>	20 Дек 2022	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[33]	2,02%	0%	Диплом-Ляпин_Павел	06 Июн 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[34]	1,81%	0%	<a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	01 Янв 2021	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[35]	1,56%	0%	<a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2022	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[36]	1,56%	0%	<a href="http://isuct.ru">http://isuct.ru</a>	01 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[37]	1,42%	0%	НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ОЛИГОД...	01 Авг 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[38]	1,41%	0%	<a href="http://www.rjbc.ru/2012/6/2012_3...">http://www.rjbc.ru</a>	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[39]	1,35%	0%	Филатова_антиплагиат	09 Июн 2023	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[40]	1,23%	0%	<a href="http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...">http://www.niboch.nsc.ru</a>	31 Мар 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[41]	1,13%	1,13%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	
[42]	1,1%	0%	<a href="https://sciencejournals.ru">https://sciencejournals.ru</a>	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[43]	1,08%	0%	Диплом_сборка_27.05.21	27 Мая 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[44]	1,06%	0%	<a href="http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...">http://www.niboch.nsc.ru</a>	16 Фев 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[45]	0,97%	0%	NYmnik_77409. Жуков Сергей Арт...	22 Окт 2021	Кольцо вузов	
[46]	0,92%	0%	<a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	01 Янв 2009	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[47]	0,83%	0%	<a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	07 Мар 2012	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[48]	0,71%	0%	<a href="https://elibrary.ru">https://elibrary.ru</a>	31 Дек 2021	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[49]	0,67%	0%	диплом 6	11 Янв 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[50]	0,66%	0%	<a href="http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...">http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...</a> <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>	01 Июн 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0,66%	0%	<a href="http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...">http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...</a> <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,59%	0%	Модифицированные олигонукле... <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	15 Янв 2018	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,52%	0%	Новый простой и удобный метод... <a href="http://elibrary.ru">http://elibrary.ru</a>	16 Янв 2015	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	0,49%	0%	<a href="http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...">http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/...</a> <a href="http://niboch.nsc.ru">http://niboch.nsc.ru</a>	07 Авг 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,48%	0%	Диплом_сборка_27.05.21	27 Мая 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,44%	0%	Синтез новых фенолов, полифен... <a href="http://fizmathim.com">http://fizmathim.com</a>	30 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	0,42%	0%	Молекулярная биология. 2017. Т... <a href="http://biblioclub.ru">http://biblioclub.ru</a>	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,41%	0%	<a href="https://new.ras.ru/upload/iblock/5...">https://new.ras.ru/upload/iblock/5...</a> <a href="https://new.ras.ru">https://new.ras.ru</a>	11 Сен 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,4%	0%	<a href="https://www.icgbio.ru/wp-content...">https://www.icgbio.ru/wp-content...</a> <a href="https://icgbio.ru">https://icgbio.ru</a>	30 Янв 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,25%	0%	Угаров, Виктор Иванович Конст... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	раньше 2011	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,25%	0%	УДК 577.113.(7+4) : 547-327 ГИБР... <a href="http://kniga.seluk.ru">http://kniga.seluk.ru</a>	31 Авг 2021	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0,2%	0%	<a href="https://new-disser.ru/_avtoreferat...">https://new-disser.ru/_avtoreferat...</a> <a href="https://new-disser.ru">https://new-disser.ru</a>	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0,19%	0%	RU2798665C2 - Амиды, содержащ... <a href="https://patents.google.com">https://patents.google.com</a>	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0,17%	0%	Чжи Я Аунг диссертация ... канд... <a href="http://dlib.rsl.ru">http://dlib.rsl.ru</a>	14 Июн 2011	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	0,17%	0%	Восстановление характеристик ... <a href="http://rshu.ru">http://rshu.ru</a>	10 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,06%	0%	не указано	13 Янв 2022	Цитирование	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

Жуков Сергей Артемович

«Получение функционализированных олигонуклеотидных производных  
путем введения модификаций по межнуклеотидной фосфатной группе»

Оригинальность работы составляет 93.98%, 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