

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ ИМ. Д.Г.
КНОРРЕ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Лаборатория химии РНК

На правах рукописи

КОЗЫРЕВА ЕВГЕНИЯ АНДРЕЕВНА

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Нуклеазоустойчивые олигонуклеотиды с модифицированным сахарофосфатным остовом
и их пептидные конъюгаты: новые подходы к синтезу и изучение их свойств

Научная специальность

1.4.9 Биоорганическая химия

Аспирант _____ Е. А. Козырева

Научные руководители _____ к.х.н. М. И. Мещанинова

_____ к.х.н. И. А. Пышная

Новосибирск – 2026

Работа выполнена в Лаборатории биомедицинской химии ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

Научный руководитель

Мещанинова Мария Ивановна

Кандидат химических наук, старший научный сотрудник Лаборатории химии РНК ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре СО РАН, г. Новосибирск, Россия.

Научный соруководитель

Пышная Инна Алексеевна

Кандидат химических наук, старший научный сотрудник Лаборатории биомедицинской химии ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре СО РАН, г. Новосибирск, Россия.

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность

Терапевтическая применимость немодифицированных нуклеиновых кислот (АСО, миРНК) как регуляторов экспрессии генов серьёзно ограничена крайней нестабильностью в биологических средах, быстрой почечной экскрецией и практическим отсутствием терапевтического эффекта в свободной форме из-за деградации нуклеазами и слабого проникновения в клетки [1]. С целью повышения эффективности антисмысловой терапии были предложены стратегии модификации нуклеиновых кислот по углеводофосфатному остову. Первым поколением антисмысловых олигонуклеотидов (АСО) стали в середине 80-х годов фосфотиоатные олигодезоксирибонуклеотиды (PS), значительно увеличившие нуклеазную устойчивость препаратов на их основе [2]. Основным недостатком первого поколения АСО выступает их неспецифическое связывание с широким набором белков, ведущее к токсическим эффектам в печени и почках [3, 4]. Второе поколение модифицированных по 2'-положению рибозы олигонуклеотидов (1990-е – 2000-е года), ещё больше повышало нуклеазную устойчивость и снижало неспецифическое связывание с белками [2]. Два этих поколения стратегий модификации решали проблему стабильности нуклеиновых кислот в биологических средах. Третье поколение, замкнутые нуклеиновые кислоты (LNA), фосфородиамидатные морфолиновые олигомеры (PMO), пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) были призваны повысить аффинность и специфичность комплементарного связывания антисмыслового олигонуклеотида с нуклеиновыми кислотами. Несмотря на широкий спектр различных модификаций нуклеиновых кислот [5, 6], нерешенным остаётся вопрос их клеточного проникновения и адресной доставки. В связи с этим можно выделить четвёртое поколение стратегий химической модификации антисмысловых олигонуклеотидов – конструирование сложных мультифункциональных структур на основе конъюгатов олигонуклеотидов (ON) и других функциональных молекул (пептиды, липофильные или рецептор-специфические молекулы и др.) [7–9].

В контексте химической модификации лимитирующим фактором широкого применения тех или иных классов модификаций остаётся сложность химического синтеза и ассоциированные с этим побочные процессы. По этой причине поиск новых синтетических стратегий остаётся актуальным. Настоящее исследование посвящено разработке новых и оптимизации существующих подходов к синтезу двух классов перспективных модифицированных олигонуклеотидов – *N*-незамещенных амидофосфатных олигодезоксирибонуклеотидов (P-NH₂) [10, 11] и олигонуклеотид-пептидных конъюгатов с аргинин-богатым пептидом, проявляющих РНК-гидролитическую активность [12, 13]. Перспективность P-NH₂ модификации заключается в

высокой нуклеазной устойчивости и электронейтральности таких олигонуклеотидов при наибольшей изоструктурности природным фосфодиэфирам среди других немостиковых заместителей (в первом приближении имея ту же молекулярную массу). В свою очередь, РНК-гидролитические олигонуклеотид-пептидные конъюгаты могут повышать эффективность антисмысловой терапии за счёт собственной РНК-гидролитической активности особенно в случаях дефицита эндогенной РНКазы Н в цитоплазме [14]. Оба класса модифицированных олигонуклеотидов серьёзно ограничены в применении за счёт сложностей химического синтеза.

Таким образом, **цель** данного исследования – разработка автоматизированного синтеза Р-NH₂-содержащих олигонуклеотидов, адаптированного к стандартному амидофосфитному протоколу твёрдофазного синтеза, и оптимизация метода активированных эфиров в контексте синтеза РНК-расщепляющих олигонуклеотид-пептидных конъюгатов с сохранением заданной функциональности.

В ходе исследования было необходимо решить следующие **задачи**:

1. адаптация протокола автоматического твердофазного фосфитамидного синтеза олигодезоксирибонуклеотидов для получения их *N*-незамещенных амидофосфатных аналогов;
2. изучение влияния электронейтральных Р-NH₂-звеньев в составе олигодезоксирибонуклеотидов на их термодинамические свойства;
3. рационализация синтеза олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, проявляющих РНК-расщепляющую активность;
4. сравнение РНК-расщепляющей активности олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, полученных по оптимизированным протоколам.

1.2 Научная новизна представляемой работы

В работе впервые показана совместимость синтеза Р-NH₂ модифицированных олигонуклеотидов с автоматическим твёрдофазным амидофосфитным протоколом и изучена гибридизационная активность Р-NH₂ олигонуклеотидов в условиях сниженной ионной силы. В случае пониженной ионной силы Р-NH₂ модификация проявляет слабый стабилизирующий эффект, зависящий от локализации, нуклеотидной последовательности сайта модификации, а также его диастереомерного состояния. В рамках исследования впервые систематически описан процесс ацилирования цитидина в составе незащищенного олигодезоксирибонуклеотида молекулой пептида в различных условиях метода активированных эфиров. Изученные нецелевые продукты ацилирования ДНК стабильны в нейтральных диапазонах рН, не проявляют собственную РНК-гидролитическую активность, однако способны эффективно формировать комплексы с РНК-мишенью, в том числе при наличии нуклеотидных несоответствий. Нецелевые

конъюгаты обладают низкой стабильностью в щелочном диапазоне pH и могут быть расщеплены в условиях кратковременной обработки концентрированным водным аммиаком. Впервые синтез РНК-гидролитических олигонуклеотид-пептидных конъюгатов проведён в водноорганических и полностью водных растворах с использованием водорастворимого карбодиимида EDCI.

Практическая значимость исследования состоит в разработке автоматического твёрдофазного подхода к синтезу P-NH₂ олигонуклеотидов совместимого с амидофосфитным протоколом с использованием стандартных фосфитаминов (со стандартными защитными группами) и твёрдых носителей. С использованием оптимизированных условий синтеза олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, проявляющих РНК-гидролитическую активность в дальнейшем может быть проведён синтез достаточных количеств таких конъюгатов с модифицированным углеводофосфатным остовом для увеличения их нуклеазной устойчивости и общего потенциала в качестве антисмысловых агентов.

1.3 Апробация работы

По результатам исследования опубликовано 7 работ, в том числе 1 статья в рецензируемых изданиях и 6 тезисов конференций:

1. Адаптация протокола автоматического твердофазного фосфитаминового синтеза олигодезоксирибонуклеотидов для получения их *N*-незамещенных амидофосфатных аналогов (P-NH₂) / **Е. А. Малова**, И. А. Пышная, М. И. Мещанинова, Д. В. Пышный // Биоорганическая химия. – 2024. – Т. 50, № 6. – С. 789-805. – DOI 10.31857/S0132342324060065.

2. Протокол автоматизированного синтеза олигодезоксирибонуклеотидамидофосфатов. **Е. А. Малова**, М. А. Баженов, И. А. Пышная. IX Международная конференция молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков. Новосибирск, 2022, С. 572. ISBN: 978-5-4437-1362-5.

3. Особенности синтеза P-NH₂ олигонуклеотидов по адаптированной методике на основе стандартного амидофосфитного протокола. **Е. А. Малова**, И. А. Пышная, М. И. Мещанинова, Д. В. Пышный. Химия: достижения и перспективы. Ростов-на-Дону, 2024. С. 58. ISBN: 978-5-9275-4757-9.

4. Разработка протокола для автоматизированного синтеза амидофосфатных олигодезоксирибонуклеотидов. **Е. А. Малова**, И. А. Пышная, М. А. Баженов, Д. В. Пышный. Синтетическая биология и биофармацевтика. Новосибирск, 2022, С. 200. ISBN: 978-5-85957-199-4.

5. Особенности синтеза P-NH₂ олигонуклеотидов по адаптированной методике на основе стандартного амидофосфитного протокола. **Е. Малова**, И. Пышная, М. Мещанинова, Д.

Пышный. 14-международная мультikonференция: биоинформатика регуляции и структуры геномов/системная биология, Новосибирск, 2024, С. 1947-1950. DOI 10.18699/bgrs2024-11.1-06.

6. Efficient method for conjugating antisense oligonucleotides with peptides exhibiting RNA-hydrolytic activity. **Е. А. Kozyreva**, M. I. Meschaninova. FUTURE OF BIOMEDICINE 2025. Vladivostok, 2025, С. 110. ISBN 978-5-7444-6012-9.

7. Рационализация протокола синтеза олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, проявляющих рибонуклеазную активность. **Е. А. Козырева**, М. И. Мещанинова. Инженерная биология и биофармацевтика. Новосибирск, 2026. С. 93. ISBN 978-5-85957-237-3.

1.4 Вклад автора

Основная часть работы была выполнена автором лично. В частности, автором синтезированы и выделены низкомолекулярные органические соединения и олигодезоксирибонуклеотиды, в том числе Р-NH₂-модифицированные. На модельной системе проведен ³¹P-ЯМР анализ, имитирующий синтез Р-NH₂ модификации. Оптимизирован синтез олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, проявляющих РНК-гидролитическую активность с использованием различных активирующих агентов для метода активированных эфиров и исследована эффективность расщепления 5'-[FAM]-меченой микроРНК-21 этими конъюгатами. Автором проведены все электрофоретические и хроматографические анализы, осуществлено исследование комплексообразования Р-NH₂ олигонуклеотидов методом термической денатурации и олигонуклеотид-пептидных конъюгатов методом задержки в геле.

Масс-спектрометрический анализ (ESI и MALDI-TOF) проводили в Центре масс-спектрометрического анализа ИХБФМ СО РАН. ЯМР- и ИК-спектроскопия выполнена в ЦСИ НИОХ СО РАН. Синтез олигорибонуклеотидов выполнен Мещаниновой М. И. (ЛХРНК ИХБФМ СО РАН), 5'-аминоолигодезоксирибонуклеотидов Дюдеевой Е. С. (ЛБМХ ИХБФМ СО РАН), часть немодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов Бушуевой Т. Ю. (ЛБМХ ИХБФМ СО РАН). Исследование эффективности расщепления 3'-[FAM]-, 5'-[³²P]-меченых микроРНК-21 выполнено Чиглинцевой Д. А. (ЛБНК ИХБФМ СО РАН).

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Исходные материалы

2.1.1 Реактивы и растворители

В работе использованы азид натрия (NaN_3), тетраметилэтилендиамин (TEMED), катионный карбоцианиновый краситель Stains-All, трис-(гидроксиметил)аминометан (Трис), какодilat натрия, метиламин 40% раствор, фиколл 400, цитрат натрия, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид (EDCI), 1,3-дициклогексилкарбодиимид (DCC), *N*-гидроксисукцинимид (NHS), 2-(7-азабензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилурония гексафторфосфат (HATU), *N,N*-диизопропилэтиламин (DIPEA) (Sigma-Aldrich, США); (9-флуоренил)-метоксикарбонилхлорид (FmocCl), 4-диметиламинопиридин (DMAP) (Fluka, Швейцария); трихлоруксусная кислота (ТХУ), пиридин (Py), триэтиламин (Et_3N), хлорид натрия (NaCl), тетрагидрофуран (ТГФ), дихлорметан (CH_2Cl_2) стабилизированный амиленом (Panreac, США); 5-(этилтио)-1H-тетразол (ETT) (Glen Research, США); 1-метилимидазол (MeIm) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Германия); пропионовый ангидрид, 7 М раствор аммиака в метаноле, перхлорат лития (LiClO_4), имидазол (Im), силикагель 0,060-0,2 мм, 60 Å, хлорид лития (LiCl) (Acros Organics, США); кристаллический йод (I_2), ледяная уксусная кислота, динатриевая соль этилендиамина тетрауксусной кислоты (Na_2EDTA), водный аммиак, спирт изопропиловый (iPrOH) (Реахим, Россия); (1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен (DBU) (Alfa Aesar, Германия); акриламид, *N,N'*-метиленбисакриламид, персульфат аммония (PSA), (AppliChem, Германия); бромфеноловый синий (BP), ксиленцианол (XC), цетилтриметиламмония бромид (СТАВ), хлорид калия (Helicon, Россия); борная кислота (Химпром, Россия); мочеви́на, сульфат натрия безводный (Na_2SO_4), стандарт-титр соляной кислоты (Союзхимпром, Россия); стандартные мономеры для фосфорамидитного протокола, носители (CPG) для твердофазного автоматического синтеза с тимидином, дезоксиаденозином, дезоксигуанозином и дезоксицитидином (ChemGenes Co, США); DMS(O)MT-NH- C_6 -амидофосфит (Lumiprobe, Россия); вода бидистиллированная; ацетонитрил (CH_3CN) для ВЭЖХ, *N,N*-диметилформамид (ДМФА), диметилсульфоксид (ДМСО) (Fisher Chemical, Китай); хлороформ, стабилизированный этанолом, гексан, метанол (CH_3OH), концентрированная серная кислота (H_2SO_4) (Вектон, Россия); ацетон (база №1 Химреактивов, Россия); этанол 96% (АО «Кемеровская фармацевтическая фабрика», Россия); формамид (NeoFroxx GmbH, Германия); рибонуклеаза T1 (MBI Fermentas, США); пластинки для TCX Silica gel 60 F254, дигирофосфат калия (KH_2PO_4) (Merck, США); хлороформ-d (CDCl_3) (Solvex, Россия); пептид Ac-[(LR) $_2$ G] $_2$ в виде ацетата и гидрохлорида (PerTech, Россия).

Реактивы и растворители были квалификации х.ч. и ос.ч. отечественного и импортного производства. Абсолютизирование растворителей проводили стандартными методами с последующим выдерживанием над молекулярными ситами или гидридом кальция.

2.1.2 Последовательности олигонуклеотидов

Таблица 1. Набор олигонуклеотидных последовательностей, использованных в ходе исследования

Код	Последовательность 5'→3'
Блок 1. Разработка протокола синтеза Р-NH₂ олигонуклеотидов	
T ₅	T-T-T-T-T
T ₆	T-T-T-T-T-T
T*T ₅	T*T-T-T-T-T
T*T*T ₄	T*T*T-T-T-T-T
T ₂ *T ₄	T-T*T-T-T-T
T ₃ *T ₃	T-T-T*T-T-T
T ₄ *T ₂	T-T-T-T*T-T
T ₅ *T	T-T-T-T-T*T
G*T ₃	G*T-T-T
C*T ₃	C*T-T-T
A*T ₃	A*T-T-T
T*T ₃	T*T-T-T
T ₂ G*T	T-T-G*T
T ₂ C*T	T-T-C*T
T ₂ A*T	T-T-A*T
T ₃ *T	T-T-T*T
M ₈	A-G-C-T-A-C-C-G
N ₈	C-G-G-T-A-G-C-T
N ₁ * ₇	C*G-G-T-A-G-C-T
N ₄ * ₄	C-G-G-T*A-G-C-T
N ₇ * ₁	C-G-G-T-A-G-C*T
(1) N ₁ * ₆ * ₁	C*G-G-T-A-G-C*T
(2) N ₁ * ₆ * ₁	C*G-G-T-A-G-C*T
N ₆ * ₁ * ₁	C-G-G-T-A-G*C*T
N ₄ * ₁ * ₃	C-G-G-T*A*G-C-T
N ₁ * ₁ * ₆	C*G*G-T-A-G-C-T
Блок 2. Оптимизация синтеза олигонуклеотид-пептидных конъюгатов	
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
5'-FAM-miR-21	FAM-UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
3'-FAM-miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-FAM
16nt	T-C-A-G-T-C-T-G-A-T-A-A-G-C-T-A
5'-NH ₂ -16nt	NH ₂ -C ₆ -T-C-A-G-T-C-T-G-A-T-A-A-G-C-T-A
30nt	A-G-T-C-T-G-A-T-A-A-G-C-T-A-GTCAGCGAAAGCTGAC
5'-NH ₂ -30nt	NH ₂ -C ₆ -A-G-T-C-T-G-A-T-A-A-G-C-T-A-GTCAGCGAAAGCTGAC
16C0	T-T-A-G-T-T-T-G-A-T-A-A-G-T-T-A
16C3	T-T-A-G-T-T-T-G-A-T-A-A-G-C-T-A
16C11	T-T-A-G-T-C-T-G-A-T-A-A-G-T-T-A
16C15	T-C-A-G-T-T-T-G-A-T-A-A-G-T-T-A
T ₆	TTTTTT
T ₅ C	TTTTTC
T ₅ G	TTTTTG
T ₅ A	TTTTTA

2.1.3 Буферы и растворы

ТВЕ	89 мМ Трис-борат pH 8.3, 2 мМ Na ₂ EDTA
ТЕАА	20 мМ триэтиламмония ацетат pH 7.0
Буфер А ₁	10 мМ какодилат натрия, 0.01 М NaCl, pH 7.2
Буфер А ₂	10 мМ какодилат натрия, 0.1 М NaCl, pH 7.2
Буфер А ₃	10 мМ какодилат натрия, 1 М NaCl, pH 7.2
PВ	100 мМ фосфатный буфер pH 7.0
Буфер В	50 мМ Трис-HCl pH 7.0, 200 мМ KCl, 1 мМ EDTA
Буфер С	2 М имидазол-HCl pH 7.0, 1мМ EDTA
Буфер D	6 М мочевины, 25 мМ цитрат натрия pH 4.8, 1 мМ EDTA
Буфер E	25 мМ Трис-HCl pH 6.5
ПААГ ₁	15% акриламид: <i>N,N'</i> -метиленбисакриламид (29:1), 8 М мочевины в ТВЕ
ПААГ ₂	18% акриламид: <i>N,N'</i> -метиленбисакриламид (19:1), 8 М мочевины в ТВЕ
ПААГ ₃	15% акриламид: <i>N,N'</i> -метиленбисакриламид (29:1) в ТВЕ
Раствор F	20% фиколл-400, 0.025% бромфеноловый синий в воде
Раствор G	0.025% ксиленианол в 95% формамиде
Раствор H	0.025% бромфеноловый синий в 95% формамиде
Раствор I	0.025% ксиленианол, 0.025% бромфеноловый синий в 8 М мочевины
Раствор J	0.5 мг/мл Stains-all в 25% ДМФА
Раствор АМА	смесь концентрированного водного аммиака и 40% водного метиламина (1:1)

2.2 Основные методы

2.2.1 Синтез олигонуклеотидов и их аналогов

Олигодезоксирибонуклеотиды 16nt, 16CO, 16C3, 16C11, 16C15 (Таблица 1) были синтезированы инженером Лаборатории биомедицинской химии Бушуевой Т. Ю. (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия) по стандартному амидофосфитному протоколу на синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия), деблокированы стандартными методами и выделены методом офВЭЖХ в DMTr-on режиме (за 5'-концевую диметокситритильную группу (DMTr)). Флуоресцентномеченные 5'-FAM-miR-21, 3'-FAM-miR-21 и нативная miR-21 РНК-мишени, а также 5'-аминомодифицированный 30-ти звенный олигодезоксирибонуклеотид 5'-NH₂-30nt с фталоильной защитной группой (PDA) (Таблица 1) были синтезированы старшим научным сотрудником Лаборатории химии РНК Мещаниновой М. И. (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия) на автоматизированном ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия) по

стандартному амидофосфитному протоколу. РНК-мишени деблокированы стандартными методами и выделены электрофоретически. Олигодезоксирибонуклеотид 5'-NH₂-30nt с PDA-защитой деблокировали раствором АМА (пункт 2.1.3) 15 мин. при 65 °С и использовали без выделения. 5'-Аминомодифицированные 30-ти и 16-ти звенные олигодезоксирибонуклеотиды 5'-NH₂-30nt и 5'-NH₂-16nt с монометокситритильной защитной группой (ММТ) (Таблица 1) были синтезированы научным сотрудником Лаборатории биомедицинской химии Дюдеевой Е. С. (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия) по стандартному амидофосфитному протоколу на синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия), деблокированы стандартными методами и выделены методом офВЭЖХ в DMTr-on режиме.

Немодифицированные олигодезоксирибонуклеотиды, 5'-аминомодифицированный 30-ти звенный олигодезоксирибонуклеотид 5'-NH₂-30nt с сульфодиметокситритильной защитной группой (DMS(O)MT) и *N*-незамещенные амидофосфатные аналоги олигодезоксирибонуклеотидов синтезированы автором на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 (Биоссет, Россия) с использованием коммерчески доступных мономеров (0.07 М) для амидофосфитного протокола, в качестве активатора применяли раствор ЕТТ (0.25 М) в CH₃CN. В качестве кэпирующих агентов выступали CrA – 15% пропионовый ангидрид в ТГФ, CrB – 16% *N*-метилимидазол в ТГФ. 5'-Диметокситритильную защитную группу удаляли 3% трихлоруксусной кислотой в CH₂Cl₂. Триэфирфосфиты окисляли до триэфирфосфатов смесью 0.05 М I₂, 1% пиридина, 9% H₂O в ТГФ. Для получения межнуклеозидного амидофосфата на стадии окисления в процессе твердофазного автоматического синтеза использовали альтернативную программу, основанную на реакции Штаудингера. В качестве окислителя применяли 0.1 М или 0.25 М раствор FmocN₃ в CH₃CN. Суммарное время окисления составляло 15–45 мин. Удаление Fmoc-защитной группы проводили обработкой 2% раствором DBU в CH₃CN в течение 5 мин либо в ходе синтетического цикла на автоматическом ДНК-синтезаторе, либо отдельно в пробирке объемом 1.5 мл.

2.2.2 Масс-спектрометрический анализ

ESI и MALDI-TOF анализы проводили в Центре масс-спектрометрического анализа ИХБФМ СО РАН. На оборудовании MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker Daltonics, Германия) регистрировали спектры в линейных режимах регистрации отрицательных и положительных ионов для олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, в рефлексном режиме регистрации положительных ионов для свободного пептида. На приборе ESI LC/MS/MSD XCT (Agilent Technologies, США) проводили анализ низкомолекулярного фосфодиэфира и олигодезоксирибонуклеотидов, в том числе P-NH₂-модифицированных в диапазоне масс – 105–1600 m/z.

2.2.3 ЯМР анализ

^{31}P -ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре Magritek Spinsolve (Новая Зеландия) с частотой 80 МГц (^{31}P – 32 МГц) в CH_3CN (при записи ^{31}P). ЯМР анализ на ядрах ^1H и ^{13}C проводили в ЦСИ НИОХ СО РАН им. Н.Н. Ворожцова на спектрометре Bruker Avance 400 (Германия) с частотой 400 МГц в CDCl_3 .

2.2.4 ИК спектроскопия

Структуру органического азида (FmocN_3) устанавливали с использованием ИК-Фурье спектрометра Bruker Tensor 27 (Германия) в ЦСИ НИОХ СО РАН им. Н.Н. Ворожцова. Спектр регистрировали в кювете диаметром 0.28 мм, растворителем выступал хлороформ, концентрация раствора исследуемого азиды составила 1 масс.%. ИК-спектр регистрировали в диапазоне 4000–400 cm^{-1} . Идентификацию химического состава азиды проводили по характеристическим полосам поглощения, представленным в литературе [15].

2.2.5 УФ спектроскопия

Для определения концентрации олигонуклеотидов и их конъюгатов регистрировали УФ-спектр водных растворов. Спектры получали на спектрофотометре NanoVue Plus (GE Healthcare, Швеция) в диапазоне длин волн 400–200 нм при комнатной температуре в капле 2 мкл (длина оптического пути – 0.5 мм). Коэффициент молярного поглощения немодифицированного олигонуклеотида определяли как сумму значений коэффициентов молярного поглощения нуклеотидов, входящих в состав последовательности [16]. Коэффициенты молярного поглощения модифицированных олигонуклеотидов при 260 нм считали равными сумме значений коэффициентов молярного поглощения немодифицированных нуклеотидов. Для флуоресцентомеченных олигонуклеотидов проводили к коэффициенту молярного поглощения немодифицированного олигонуклеотида добавляли коэффициент молярного поглощения флуоресцентной метки на 260 нм.

2.2.6 Хроматография

а) тонкослойная хроматография (ТСХ)

Методом ТСХ контролировали протекание реакций при синтезе низкомолекулярных соединений модификаторов или нуклеотидных производных на пластинках с силикагелем 60 F254 в системах, представленных в Таблице 2. Продукты, содержащие π -системы и поглощающие в УФ-области, визуализировали в УФ-свете прибора "Хроматоскоп М" (ФИМЕТ, Россия). Для химической идентификации нуклеозидсодержащих соединений применяли проявление 2 мас.% раствором нингидрина в этаноле и реактивом Дини (0.4 мас.% раствор L-

цистеина в водном растворе 13 об.% серной кислоты). Для проявления азидогруппы использовали последовательную обработку растворами трифенилфосфина и нингидрина [17] или нагрев над пламенем спиртовки.

Таблица 2. Системы ТСХ

Название системы	Состав системы
А	15% хлористый метилен в гексане
В	10% этанол, 0.1% Et ₃ N в хлористом метиле

б) колоночная хроматография

Выделение 5'-диметокситритил-2'-дезокситимидин-3'-изопропиламидофосфата проводили методом флэш колоночной хроматографии (1% этанол, 0,1% Et₃N в хлороформе) на силикагеле (0,060-0,2 мм, 60 Å) в колонке с диаметром 1.5 см.

в) обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (офВЭЖХ)

Анализ составов реакционных смесей олигонуклеотидов, содержащих Р-NH₂ модификации проводили на хроматографе Милихром А02 (Эконова, Россия) с использованием колонки (2 × 75 мм) с сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 (Эконова, Россия) и градиента концентрации CH₃CN (“градиент I”: 0-30% в течение 15 мин; “градиент II”: 0-30% в течение 30 мин) в буфере ТЕАА (пункт 2.1.3) (скорость потока 200 мкл/мин, температура термостата 35 °С). Конверсии реакций получения олигонуклеотид-пептидных конъюгатов определяли в градиенте концентрации CH₃CN (“градиент III”: 0-10% в течение 5 мин, 10-30% в течение 16 мин) в буфере ТЕАА (скорость потока 100 мкл/мин, температура термостата 35 °С). Детекцию осуществляли на длинах волн 260, 280 и 300 нм. Содержание целевого продукта во всех случаях определяли по отношению площади целевого пика к суммарному интегральному оптическому поглощению всех компонентов реакционной смеси на длине волны 260 нм.

Выделение нативных и Р-NH₂ модифицированных олигонуклеотидов в DMTr-on режиме, олигонуклеотид-пептидных конъюгатов за счёт сильного увеличения гидрофобности от пептидного остатка проводили на хроматографе Agilent 1200 series (Agilent, США). Использовали колонку (4.6 × 150 мм) с сорбентом Eclipse XDB-C18 (5 мкм) (Agilent, США), элюировали в градиенте концентрации CH₃CN (“градиент IV” 0-50% за 40 мин) в буфере ТЕАА (скорость потока 1.5 мл/мин). Детекцию осуществляли на длинах волн 260, 280 и 330 нм.

2.2.7 Полиакриламидный гель-электрофорез

а) ПААГ в денатурирующих условиях для анализа реакционных смесей и выделенных олигонуклеотидов

Электрофоретическую подвижность олигонуклеотидов и их аналогов оценивали, используя ПААГ₁ в буфере ТВЕ (пункт 2.1.3) при плотности тока 2,5 мА/см². Олигонуклеотиды

из блока 1 (пункт 2.1.2, Таблица 1) наносили из раствора G (пункт 2.1.3), длина пробега по лидирующему красителю (BP) 12 см. Пробы олигонуклеотидов из блока 2 (пункт 2.1.2, Таблица 1) и соответствующих олигонуклеотид-пептидных конъюгатов наносили из раствора H (пункт 2.1.3), длина пробега по лидирующему красителю (BP) 18 см. Результаты электрофоретического разделения визуализировали окрашиванием с помощью раствора J в течение 10 мин.

б) ПААГ в денатурирующих условиях для выделения целевых олигонуклеотидов и их конъюгатов

Разделение реакционных смесей олигонуклеотидов и их конъюгатов проводили в ПААГ1 в буфере TBE (толщина геля 0.8 мм, ширина кармана 2.5 см) при плотности тока 1.25 мА/см². Для нанесения образцов в гель использовали раствор H (пункт 2.1.3). Результаты электрофоретического разделения визуализировали в УФ-свете прибора “Хроматоскоп М” (ФИМЕТ, Россия). Полоски геля, содержащие продукт, вырезали и проводили элюцию нуклеотидного материала из геля, добавляя 1 мл деионизованной воды в течение 16 ч при 25 °С и встряхивании. Отделяли раствор от геля и обессоливали с помощью центрифужных фильтров Microcon (Millipore, США) или осаждением в этанол. Олигонуклеотидный материал осаждали десятикратным объемом 2% LiClO₄ в ацетоне, выдерживали 30 мин при -20 °С, центрифугировали, супернатант удаляли, осадок промывали ацетоном, сушили на воздухе в течение 30 мин.

в) ПААГ в денатурирующих условиях для анализа продуктов расщепления РНК олигонуклеотид-пептидными конъюгатами

Разделение продуктов расщепления флуоресценто-меченной микроРНК-21 проводили, используя ПААГ2 в буфере TBE (пункт 2.1.3) при плотности тока 2,5 мА/см². Продукты реакции наносили из 8 М мочевины. Для контроля за пробегом в отдельный карман наносили раствор I и вели электрофорез до разделения красителей на 6-8 см. Результаты электрофоретического разделения визуализировали с помощью системы гель-документации BioRad ChemiDoc MP Imaging System. Общую степень расщепления РНК и степень расщепления РНК в каждом отдельном сайте определяли с помощью программного обеспечения для анализа GelAnalyzer 23.1.1.

г) ПААГ в нативных условиях для анализа формирования комплексов между микроРНК-мишенью и олигонуклеотид-пептидными конъюгатами

Разделение продуктов комплексообразования олигонуклеотид-пептидных конъюгатов с микроРНК-мишенью проводили в ПААГ3 в буфере TBE (пункт 2.1.3) при 4 °С и напряженности электрического поля 10-20 В/см в течение 3-4 ч. Гель сканировали с помощью системы гель-документации BioRad ChemiDoc MP Imaging System. Полученные после сканирования изображения анализировали с помощью программного обеспечения GelAnalyzer 23.1.1.

2.2.8 Метод термической денатурации с оптической регистрацией сигнала

Термическую денатурацию олигонуклеотидных комплексов проводили на спектрофотометре Cary 300 Biomelt (Varian, Австралия), оснащенном терморегулируемой 6-кюветной приставкой. Компоненты комплексов в эквимольном соотношении (суммарная концентрация 10 мкМ) в буферах А₁, А₂ или А₃ (пункт 2.1.3) нагревали–охлаждали в диапазоне температур от 5 до 95°C со скоростью изменения температуры 0.5 °C/мин. Оптическую плотность регистрировали при 260, 270 и 300 нм. Температуру плавления комплекса определяли, как температуру, соответствующую максимуму первой производной кривой (или профиля) зависимости оптической плотности образца от температуры с использованием программного обеспечения Simplex Version 4.11.

2.3 Основные методики

2.3.1 Синтез (9-флуоренил)-метоксикарбониллазида (FmocN₃)

(9-Флуоренил)-метоксикарбонилхлорид (1.88 ммоль) растворяли в 10 мл безводного CH₃CN. К раствору добавляли 2.64 ммоль сухого NaN₃. Полученную суспензию перемешивали 10 ч при нагревании до 40°C. После окончания реакции супернатант отделяли фильтрованием и проводили экстракцию CH₂Cl₂. Органический слой промывали 1 раз насыщенным солевым раствором, далее 2 раза водой, затем сушили над Na₂SO₄ (безв.). Растворитель удаляли упариванием на ротационном испарителе. Очистку проводили перекристаллизацией из гексана. Для удаления следов воды остаток в колбе дважды упаривали из ацетонитрила. Выход после перекристаллизации 72% (1.35 ммоль). R_f (FmocCl) = 0.28, R_f (FmocN₃) = 0.08 (ТСХ система А, пункт 2.2.6 а). ¹H-ЯМР (80 МГц, CDCl₃; J, Гц): 7.79 (d, J 6.7, 2H), 7.55 (d, J 1.7, 2H), 7.42 (t, J 4.3, 2H), 7.27 (t, J 1.7, 2H), 4.50 (d, J 6.3, 2H), 4.31 (t, J 7.0, 1H). ИК (см⁻¹): 3037, 2189, 2135 (R-N₃), 1734, 1601, 1448, 1375, 1317, 1240, 1111, 1076, 1030, 982, 922, 864, 621, 563, 482, 424.

2.3.2 Получение 5'-диметокситритил-2'-дезокситимидин-3'-[(β-цианэтил)-изопропил]фосфиттриэфира (II)

В пластиковой пробирке с завинчивающейся крышкой к 145 мкл 0.1 М раствора 5'-диметокситритил-2'-дезокситимидин-3'-[(β-цианэтил)-(N,N-диизопропил)]амидофосфита (I) в CH₃CN (0.01 ммоль) приливали 250 мкл 0.25 М раствора ЕТТ в CH₃CN (0.04 ммоль) и 150 мкл изопропанола (абс.) (2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали 5 мин при комнатной температуре. Продукт экстрагировали CH₂Cl₂, в качестве водной фазы использовали фосфатный буфер (1 М KH₂PO₄, pH 6.5). Органическую фазу упаривали на ротационном испарителе, сухое вещество растворяли в 500 мкл ацетонитрила. Продукт анализировали методами ТСХ и ³¹P ЯМР

спектроскопии и использовали в последующих реакциях без дополнительной очистки. Rf (I) = 0.4, Rf (II) = 0.36 (ТСХ система В, пункт 2.2.6 а). ^{31}P -ЯМР (32 МГц, CH_3CN): 139.27, 138.88.

2.3.3 Синтез 5'-*O*-диметокситритил-2'-дезокситимидин-3'-изопропиламидофосфата (V)

К полученному фосфиттриэфиру (II) (0.01 ммоль) приливали 0.1 М раствор FmocN₃ (0.02 ммоль). Через 5 мин после перемешивания при комнатной температуре реакцию смесь анализировали методами ТСХ и ^{31}P ЯМР-спектроскопии. Rf (II) = 0.36, Rf (IV) = 0.30 (ТСХ система В, пункт 2.2.6 а). ^{31}P -ЯМР (32 МГц, CH_3CN): 5.70, 5.46.

К полученной реакционной смеси добавляли 15 мкл DBU с конечным содержанием основания в системе 2%, выдерживали 5 мин при комнатной температуре, затем анализировали методами ТСХ и ^{31}P ЯМР-спектроскопии. Rf (IV) = 0.30, Rf (V) = 0.15, 0.10 (в виде двух диастереомеров). ^{31}P -ЯМР (32 МГц, CH_3CN): 8.90, 8.42.

Далее раствор экстрагировали CH_2Cl_2 , водная фаза – 1 М KH_2PO_4 (pH 6.5). Органическую фазу упаривали на ротационном испарителе. Продукт очищали колоночной хроматографией на силикагеле (пункт 2.2.6 б). Затем проводили масс-спектрометрический анализ $m/z = 767.1$ $[\text{M}+\text{Et}_3\text{N}]^+$ (по данным ESI), $m/z = 703.8$ $[\text{M}+\text{K}]^+$ (по данным MALDITOF). MW расчетн. = 665.7 г/моль.

2.3.4 Щелочное деблокирование олигонуклеотидов и их аналогов

Немодифицированные олигонуклеотиды деблокировали раствором АМА (пункт 2.1.3) 15 мин при 65 °С или концентрированным водным аммиаком 18 ч при 55 °С. *N*-незамещенные амидофосфатные аналоги деблокировали насыщенным раствором аммиака в метаноле 2 ч при комнатной температуре (для гомотимидилатов) или 18 ч при комнатной температуре (для гетеронуклеотидных последовательностей).

2.3.5 Осаждение олигонуклеотидов и их конъюгатов

а) осаждение ацетоном

К водному раствору олигонуклеотида или конъюгата добавляли 10-ти кратный объём 2% раствора LiClO_4 в ацетоне, смесь перемешивали и центрифугировали 10 мин при 14000 об./мин. Супернатант удаляли, осадок промывали тем же объёмом ацетона и сушили на воздухе до полного исчезновения запаха ацетона. В случае растворов олигонуклеотид-пептидных конъюгатов сразу после реакции конъюгации осаждение проводили добавлением равного объёма 3 М LiClO_4 в воде и 10-ти кратный объёма ацетона.

б) осаждение этанолом

К водному раствору олигонуклеотида или конъюгата добавляли 3 М NaCl в воде и 96% этанол ($C_{\text{конеч.}}=50$ мМ, $\omega_{\text{конеч.}}=70$ об.%), смесь перемешивали и выдерживали 1 ч при -20°C , затем центрифугировали 30 мин при 14000 об./мин. и 4°C . Супернатант удаляли, осадок промывали этанолом и высушивали при 37°C .

в) осаждение в цетилтриметиламмонийную (ЦТА) соль

К водному раствору олигонуклеотида порциями добавляли 8% СТАВ в воде (по 1 мкл) и после каждой порции центрифугировали 4 мин при 14000 об./мин. После прекращения формирования осадка его промывали водой (2 раза по 200 мкл) и лиофилизировали. Промывочные растворы собирали и осаждали ацетоном.

2.3.6 Удаление 5'-тритильных защитных групп

К водному раствору олигонуклеотида, содержащего DMTr- или DMS(O)MT-группы, (20 мкл) добавляли 80 мкл ледяной уксусной кислоты и выдерживали 15 мин при комнатной температуре, после чего осаждали ацетоном (пункт 2.3.5, а). Осадок растворяли в 0.1 М растворе Трис (100 мкл) и снова осаждали ацетоном, осадок промывали ацетоном и сушили на воздухе.

2.3.7 Насыщение метанола хлороводородом

В круглодонную колбу на 250 мл поместили NaCl (13.7 ммоль), в колбу через капельную воронку прикапывали концентрированную H_2SO_4 (41.1 ммоль) при перемешивании, выделяющийся хлороводород последовательно пропускали через две склянки Дрекслея, наполненные концентрированной H_2SO_4 , и пробулькивали через метанол (20 мл) на ледяной бане. Насыщение производили до полного расходования NaCl.

2.3.8 Смена противоиона в пептиде

Процедуру смены противоиона с ацетата на гидрохлорид проводили согласно [18]. Навеску пептида $\text{Ac}-[(\text{LR})_2\text{G}]_2$ в виде ацетатной соли растворяли в солянокислом метаноле (0.5 мл) pH 3.0-3.5 и упаривали при пониженном давлении досуха. Процедуру переупаривания повторяли 4 раза и лиофилизировали остаток пептида из 0.1 М раствора соляной кислоты в воде.

2.3.9 Общие схемы получения олигонуклеотид-пептидных конъюгатов

Протокол А (на основе DCC) [12]

5'-Аминосодержащий олигонуклеотид (1 экв) в H_2O (100 мкл) переводили в растворимую в ДМСО соль посредством осаждения раствором цетилтриметиламмоний бромида (пункт 2.3.5 в). После лиофилизации осадок растворяли в минимальном объёме безводного ДМСО (~20 мкл). Параллельно пептид $\text{Ac}-[(\text{LR})_2\text{G}]_2$ (75 экв), также после лиофилизации, растворяли в минимальном объёме безводного ДМСО (~20 мкл), нагревали, встряхивали и центрифугировали.

Затем к пептиду добавляли 75 экв DMAP и 75 экв DCC в безводном ДМСО. Смесь (общий объем ~30 мкл) перемешивали и добавляли непосредственно к раствору олигонуклеотида и инкубировали при 60 °С в течение 12 ч, затем осаждали ацетоном (пункт 2.3.5 а).

Протокол В (на основе HATU)

На основе протокола из [19] 5'-аминосодержащий олигонуклеотид (1 экв) в H₂O (100 мкл) переводили в растворимую в ДМСО соль посредством осаждения раствором цетилтриметиламмоний бромида (пункт 2.3.5 в). После лиофилизации осадок растворяли в минимальном объеме безводного ДМСО (~20 мкл). Параллельно пептид Ас-[(LR)₂G]₂ (1 экв), также после лиофилизации, растворяли в минимальном объеме безводного ДМСО (~20 мкл), нагревали, встряхивали и центрифугировали. Затем к пептиду добавляли DIPEA (3.5 экв) и HATU (3.5 экв) в безводном ДМСО. Смесь (общий объем ~30 мкл) перемешивали и инкубировали 10 мин при 37 °С, после чего добавляли непосредственно к раствору олигонуклеотида и инкубировали при 37 °С в течение 18 ч, затем осаждали ацетоном (пункт 2.3.5 а).

Протокол С (на основе EDCI)

На основе протокола из [20] к 5'-аминосодержащему олигонуклеотиду (1 экв) в H₂O добавляли буфер РВ (60 экв) (пункт 2.1.3), пептид Ас-[(LR)₂G]₂ (20 экв) растворяли в ДМСО (~10 мкл), нагревали, встряхивали и центрифугировали. Затем к пептиду добавляли EDCI (60 экв) в ДМСО, перемешивали и инкубировали 10 мин при 37 °С. Активированный пептид смешивали с раствором олигонуклеотида и полученную смесь (общий объем 100 мкл с соотношением H₂O:ДМСО 1:1) перемешивали и инкубировали 18 ч при 37 °С, затем осаждали ацетоном (пункт 2.3.5 а).

Протокол D (на основе EDCI/NHS)

Пептид Ас-[(LR)₂G]₂ (20 экв) растворяли в ДМСО (~10 мкл), нагревали, встряхивали и центрифугировали. Затем к пептиду добавляли NHS (60 экв) и EDCI (60 экв) в ДМСО, перемешивали и инкубировали 10 мин при 37 °С. Активированный пептид смешивали с раствором 5'-аминосодержащего олигонуклеотида (1 экв) и полученную смесь (общий объем 100 мкл с соотношением H₂O:ДМСО 1:1) перемешивали и инкубировали 18 ч при 37 °С, затем осаждали ацетоном (пункт 2.3.5 а).

Далее в Таблице 3 представлены разновидности вышеописанных протоколов по концентрационному содержанию реагирующих веществ и составу растворителя.

Таблица 3. Разновидности протоколов синтеза олигонуклеотид-пептидных конъюгатов

Протокол	Соотношение компонентов относительно олигонуклеотида, экв	Состав растворителя
A	пептид:DCC:DMAP = 75:75:75	100% ДМСО
B ₁	пептид:HATU:DIPEA = 1:3.5:3.5	100% ДМСО
B ₂	пептид:HATU:DIPEA = 5:17.5:17.5	100% ДМСО
B ₃	пептид:HATU:DIPEA = 5:5:10	100% ДМСО
B ₄	пептид:HATU:DIPEA = 15:15:30	100% ДМСО
C ₁	пептид:EDCl:PB = 20:60:60	50% ДМСО в H ₂ O
C ₂	пептид:EDCl:PB = 20:60:60	100% H ₂ O
D ₁	пептид:EDCl:NHS = 20:60:20	50% ДМСО в H ₂ O
D ₂	пептид:EDCl:NHS = 20:60:20	100% H ₂ O
D ₃	пептид:EDCl:NHS = 5:15:5	50% ДМСО в H ₂ O
D ₄	пептид:EDCl:NHS = 5:15:5	20% ДМСО в H ₂ O
D ₅	пептид:EDCl:NHS = 5:15:5	100% H ₂ O
D ₆	пептид:EDCl:NHS = 5:50:5	100% H ₂ O
D ₇	пептид:EDCl:NHS = 5:250:5	100% H ₂ O

2.3.10 Исследование эффективности расщепления микроРНК олигонуклеотид-пептидными конъюгатами

Реакционную смесь (20 мкл), содержащую 1 мкМ 5'-FAM-miR-21 или 3'-FAM-miR-21 и 20 мкМ соответствующего конъюгата, в буфере В (пункт 2.1.3) инкубировали при 37 °С в течение 24 ч и останавливали реакцию осаждением РНК ацетоном. В качестве контроля инкубировали реакционную смесь того же состава без конъюгатов. Продукты расщепления РНК анализировали методом денатурирующего электрофореза (пункт 2.2.7 в). Соотнесение сайтов гидролиза проводили сравнением с продуктами статистического гидролиза этой же РНК под действием 2 М имидазола (пункт 2.3.11 а) и РНКазы Т1 (пункт 2.3.11 б).

2.3.11 Статистический гидролиз микроРНК-21

а) расщепление 2 М имидазолом (pH 7.0)

К 1 мкл РНК-мишени (~55 пмоль) добавили 9 мкл буфера С (пункт 2.1.3) и инкубировали при 90 °С в течение 30 мин. Затем осаждали ацетоном (пункт 2.3.5 а) и осадок растворяли в 10 мкл 8 М мочевины.

б) расщепление РНКазой Т1

К 1 мкл РНК-мишени (~55 пмоль) добавили 9 мкл буфера D (пункт 2.1.3) и инкубировали при 55 °С в течение 10 мин, затем быстро охлаждали на льду (1 мин) и добавляли 1 е.а. РНКазы Т1. Смесь инкубировали при 55 °С в течение 10 мин, реакцию останавливали добавлением 10-ти кратного буфера TBE (1 мкл).

2.3.12 Исследование способности олигонуклеотид-пептидных конъюгатов формировать комплексы с РНК-мишенью методом задержки в геле

Реакционную смесь (20 мкл), содержащую 1 мкМ 5'-FAM-miR-21 и 20 мкМ соответствующего конъюгата, инкубировали в буфере В (пункт 2.1.3) при 37 °С в течение 1 ч. По истечении заданного времени аликвоту 5 мкл смешивали с раствором F (пункт 2.1.3) и анализировали методом задержки геле (пункт 2.2.7 г).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе решались проблемы синтеза двух классов производных олигонуклеотидов – *N*-незамещенных амидофосфатных олигодезоксирибонуклеотидов (P-NH₂) и олигонуклеотид-пептидных конъюгатов с аргинин-богатым пептидом, проявляющих РНК-гидролитическую активность, с целью повышения доступности этих объектов для расширения границ их применимости.

Каждая новая разработка в области синтеза нуклеиновых кислот и их производных, претендующая на усовершенствование процедуры синтеза должна отвечать следующим требованиям:

1. высокая селективность;
2. универсальность по отношению к длине и последовательности олигонуклеотидов;
3. экономическая целесообразность;
4. простота;
5. высокая продуктивность;
6. сохранение заданной функциональности продуктов синтеза;
7. экологичность.

Описанные критерии уже являются прописными истинами, однако в гонке за новизной многие группы разработчиков упускают критерий простоты, что приводит к возрастанию стоимости технологического процесса и, следовательно, снижению общей экономической целесообразности. Такие разработки с гораздо меньшей вероятностью найдут широкое применение в будущем.

3.1 Адаптация стандартного амидофосфитного протокола к синтезу P-NH₂ олигодезоксирибонуклеотидов

Класс *N*-незамещенных амидофосфатных олигодезоксирибонуклеотидов (P-NH₂) достоин особого внимания, поскольку P-NH₂ практически изоструктурны природным нуклеиновым кислотам (в первом приближении имея ту же молекулярную массу), но в то же время электронейтральны, благодаря чему сильно отличаются по свойствам от нативных олигонуклеотидов. Впервые их синтез был описан в 1986 г. [21] на примере получения динуклеотида Т*Т, где звездочкой указано месторасположение модифицированного амидофосфатного звена. В рамках предложенного подхода проводили окислительное амидирование дизфирного Н-фосфонатного звена раствором аммиака (10%) в CCl₄. После долгого перерыва интерес к их синтезу вновь возник в 1996–1997 гг. [10, 11, 22–25] параллельно у двух независимых групп под руководством Р. Айера и Б. Ренера. В рамках первых работ обозначилась проблема гидролиза при щелочном деблокировании, которую решали, применяя

различные стратегии защиты мономеров, пригодные для удаления безводными аммиачными смесями [11, 24]. Кардинальных изменений в способах введения P-NH₂-модификации в углеводофосфатный остов не производили, основным подходом по-прежнему оставалось окислительное амидирование. Однако в 1997 г. группой Б. Ренера был представлен иной подход, основанный на окислении OMe-фосфиттриэфирного звена растущей цепи ON по реакции Михаэлиса–Арбузова под действием йода и 2-нитробензиламина с последующим фотолитическим отщеплением 2-нитробензильного остатка [26]. Указанные выше исследовательские группы смогли провести предварительные физико-химические и молекулярно-биологические исследования, в рамках которых показали перспективность *N*-незамещенных амидофосфатных (P-NH₂) аналогов в качестве антисмысловых олигонуклеотидов [10, 22, 23, 25]. Позднее, в 2014 г., группа под руководством Д.В. Пышного продемонстрировала подход к синтезу амидофосфатных аналогов с использованием алкил- и арилазидов [27]. На том этапе подход имел ограниченную совместимость этапа окисления выбранными азидами с протоколом стандартного автоматического синтеза ON. Неугасающий интерес к эффективному синтезу P-NH₂ продемонстрировала группа М. Карузерса [28], когда в 2015 г. они предложили новый метод постсинтетической модификации боранфосфонатных олигодезоксинуклеотидов посредством иодзависимого замещения при атоме фосфора с целью получения P-NH₂-аналогов. Основное ограничение данного подхода – необходимость использования для синтеза ON неканонических, коммерчески не доступных амидофосфитных мономеров. Таким образом, синтез *N*-незамещенных амидофосфатных аналогов по представленным схемам неоправданно дорогостоящий для различных групп разработчиков биологически активных соединений на основе ON.

Ранее в ряде работ [29–32] была неоднократно показана применимость реакции Штаудингера для получения *N*-замещенных амидофосфатных ON в рамках стандартного амидофосфитного твердофазного синтеза ON. При таком подходе фосфиттриэфир P(III), образующийся на этапе конденсации амидофосфита и 5'-ОН компонента при наращивании ON-цепи, окисляется до иминофосфорана P(V) (рис. 1) при обработке органическим азидом.

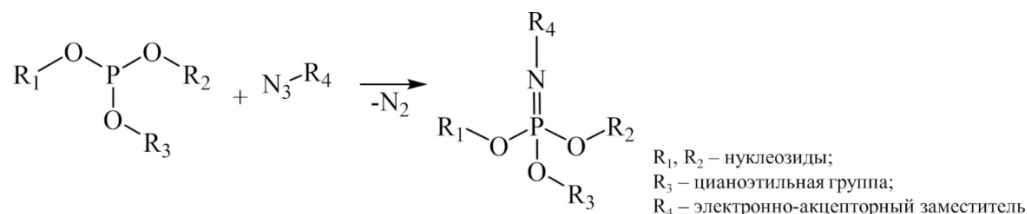


Рис. 1. Схема окисления фосфиттриэфиров электронно-акцепторными органическими азидами

В данной работе мы также постарались оптимизировать использование окисления по классической схеме Штаудингера для осуществления автоматического синтеза *N*-незамещенных

амидофосфатных аналогов олигодезоксирибонуклеотидов. Для окисления P(III) до P(V) в ходе реакции Штаудингера в качестве азидного компонента был выбран (9-флуоренил)-метоксикарбонилазид (FmocN_3). Соответствующий азид был получен из коммерчески доступного хлорформата (FmocCl) по методу, аналогичному описанному в работе [33]. Азид получен с высоким выходом и охарактеризован методами ^1H -ЯМР- и ИК-спектроскопии. Важно отметить, что Fmoc -группа относится к разряду щелочелабильных защитных остатков [33], что дает основание предполагать ее функциональную стабильность в рамках синтетического цикла при автоматическом синтезе ON.

3.1.1 Анализ реакционной способности FmocN_3 на модельной системе

На первом этапе исследования мы доказали (рис. 2), что выбранный нами азид (FmocN_3) реагирует как с 5'-DMTr-2'-дезокситимидин-3'-[(β -цианэтил)-(N,N -диизопропил)]амидофосфитом (I), так и с 5'-DMTr-2'-дезокситимидин-3'-[(β -цианэтил)-изопропил]фосфиттриэфиром (II). По данным ^{31}P -ЯМР-спектроскопии, соединения (I) и (II) менее чем за 5 мин после добавления FmocN_3 превращаются в соответствующие иминофосфораны (III) и (IV), что можно было ожидать из работы М.А. Баженова с соавт. [34]. Следует отметить, что взаимодействие органического азиды (FmocN_3) с указанными P(III)-содержащими соединениями фосфора протекало, как и ожидалось, с интенсивным выделением газа – молекулярного азота.

Реакции FmocN_3 с амидофосфитом и фосфиттриэфиром проводили непосредственно в ампулах ЯМР. Образование соединений (III) и (IV) регистрировали по ядрам [^{31}P] без последующего выделения соответствующих продуктов в индивидуальном состоянии. По данным ЯМР-спектроскопии, переход от P(III)-содержащих соединений, характеризующих химическими сдвигами $\sim 139\text{--}148$ м.д., к P(V)-содержащим аддуктам (химический сдвиг $\sim 5.5\text{--}15.1$ м.д.) регистрируется практически сразу после контакта FmocN_3 с источником трехвалентного фосфора. Таким образом, было доказано, что выбранный реагент FmocN_3 , при используемых избытках (1 : 1.8 экв.) в растворе способен быстро и количественно окислять P(III)-атом фосфора в составе соединений (I) и (II).

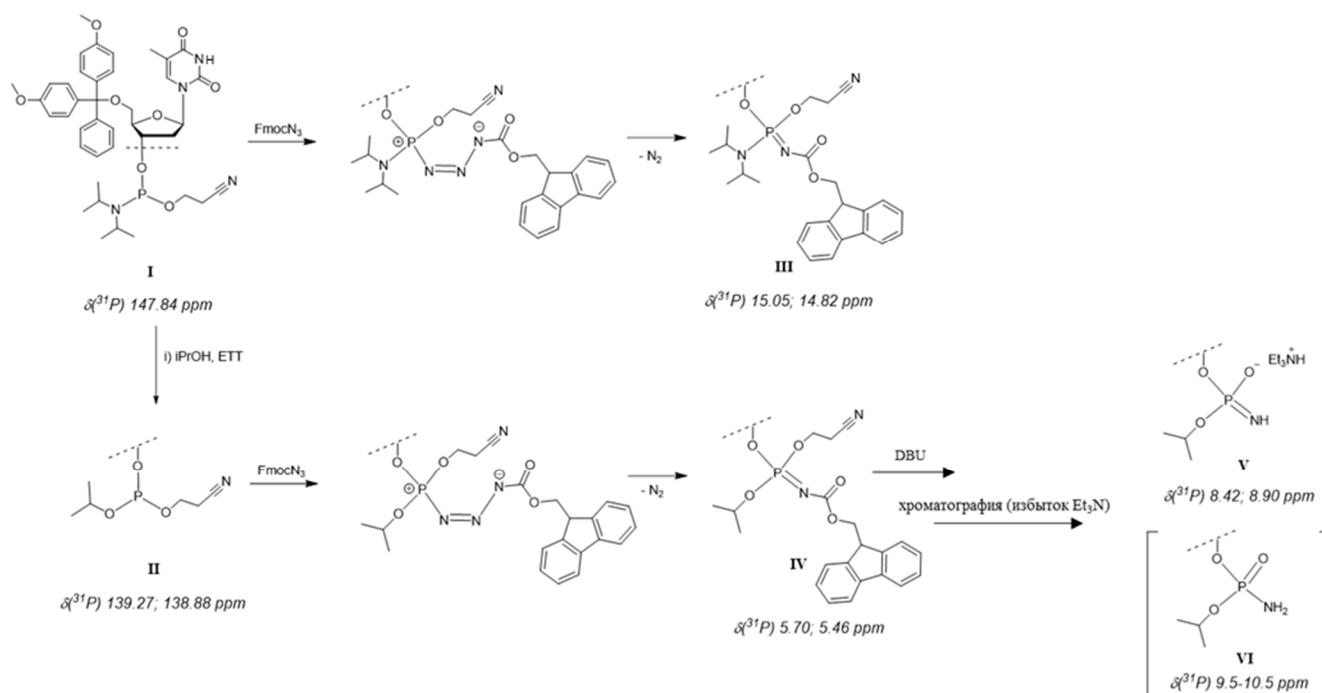


Рис. 2. Стадии превращения тимидин амидофосфита при окислении FmocN_3 по реакции Штаудингера с указанием ^{31}P ЯМР-характеристик, полученных в ходе эксперимента. Соединение VI не было зарегистрировано в ходе превращений и указано здесь как ожидаемый продукт с диапазоном хим. сдвигов, представленным в литературе [28, 35]

Обработка амидофосфата (IV) сильным основанием 1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундец-7-еном (DBU) должна была привести к получению изопропильного P-NH_2 -производного тимидилата (VI) (ожидаемый амидофосфат). К удивлению, химический сдвиг атома ^{31}P -фосфора, зарегистрированный для хроматографически чистого DMTg-2'-дезокситимидин-3'-изопропиламидофосфата (V) (в форме смеси R_p - и S_p -диастереомеров), составил значения, равные 8.4 и 8.9 м.д. По данным работ [28, 35], для атома фосфора в составе P-NH_2 -модификации в цепи олигонуклеотида должны были бы регистрироваться значения химических сдвигов в диапазоне 9.5–10.5 м.д. (в зависимости от растворителя), что соответствует, по мнению авторов указанных работ, именно электронейтральной форме амидофосфатного звена. Позднее, получив T^*T_5 -олигонуклеотид (здесь и далее по тексту звездочкой указано месторасположение амидофосфатного звена, имеющего структуру $-(\text{OPO}(\text{O})(\text{NH}_2))-$ или $-(\text{OPO}(\text{O}^-)(\text{NFmoc}))-$, при необходимости уточнения приводятся сокращенные обозначения, например, $\text{T}-(\text{P}^{(\text{V})}(\text{NH}_2))- \text{T}$ или $\text{T}-(\text{P}^{(\text{V})}=\text{N-Fmoc})-\text{T}$, мы зарегистрировали химический сдвиг атома фосфора в составе амидофосфатного остатка, равный 12.5 м.д. (в H_2O) (рис. 3), что соответствует ранее опубликованным данным [11]. Мы считаем, что ожидаемый амидофосфат $-(\text{OPO}(\text{O})(\text{NH}_2))-$ (VI) (рис. 2), после хроматографического выделения в присутствии избытка триэтиламина (Et_3N), должен преимущественно находиться в виде стабильной ионизированной имидофосфатной

формы $-(\text{OPO}(\text{N}=\text{H})(\text{O}^-))(\text{Et}_3\text{NH}^+)-$ (V). Полученные данные хорошо согласуются с результатами работы [36], в которой показано, что амидофосфаты проявляют свойства слабых кислот ($\text{pK}_a \sim 8.2$).

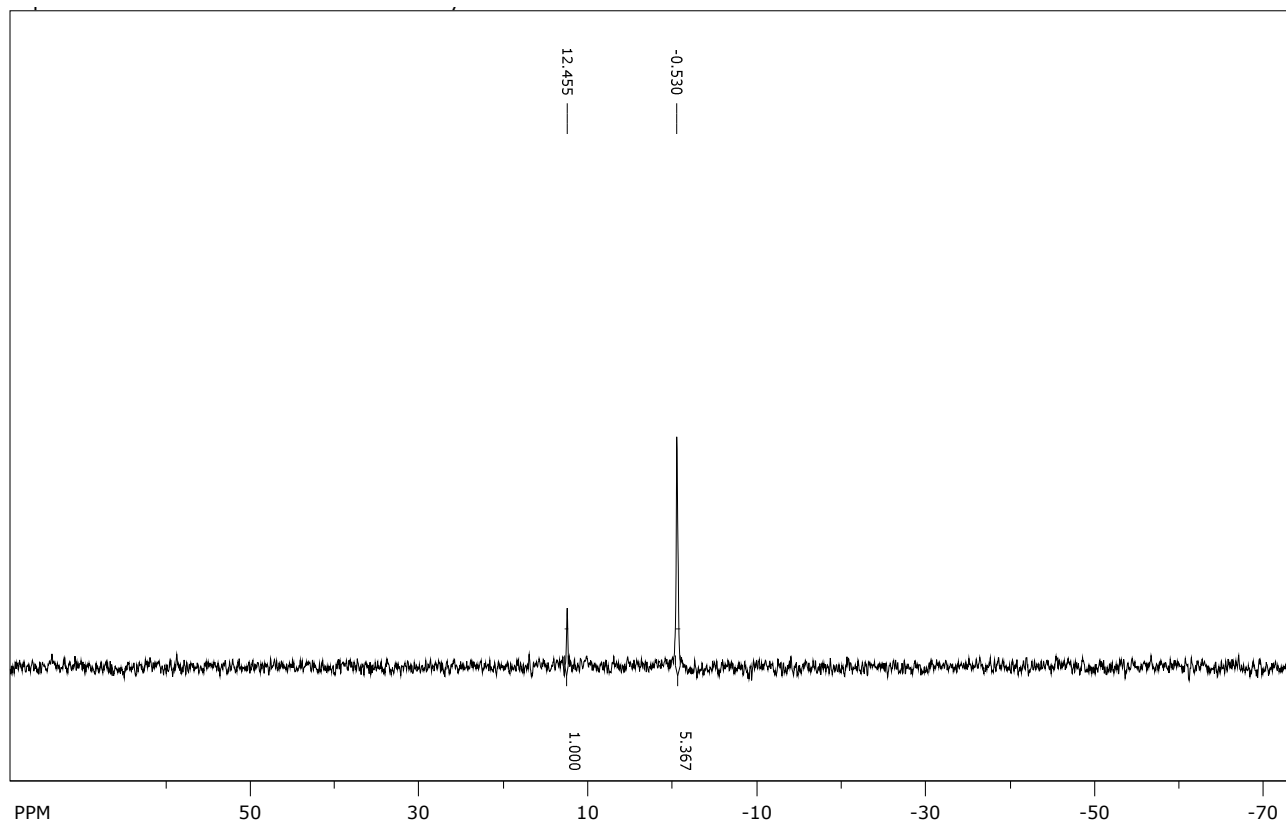


Рис. 3. ^{31}P ЯМР анализ гексатимидилата $\text{TTTTTT}(-\text{P}^{(\text{V})}(\text{NH}_2)-)\text{T}$ (32 МГц, H_2O)

Важно отметить еще раз, что взаимодействие FmocN_3 с $\text{P}(\text{III})$ -содержащими соединениями позволяет практически количественно получать соответствующие $\text{P}(\text{V})$ -содержащие аддукты.

Таким образом, нами показано, что органический азид (в данном случае FmocN_3) потенциально пригоден для автоматического синтеза P-NH_2 -модифицированных олигомеров, т.к. может обеспечить быстрое, в течение нескольких минут, окисление фосфиттриэфиров до Fmoc -содержащего амидофосфата (IV).

3.1.2 Оптимизация автоматического синтеза P-NH_2 -аналогов

Далее реакцию окисления $\text{P}(\text{III})$ до $\text{P}(\text{V})$ с помощью FmocN_3 апробировали в формате автоматического ДНК-синтеза, используя стандартные коммерчески доступные 5'-DMTr-2'-дезокситимидин-3'- $[(\beta\text{-цианэтил})-(N,N\text{-диизопропил})]$ -фосфитамида и твердофазный носитель (CPG), содержащий стандартный сукцинатный линкер. Включение P-NH_2 -модификации в состав растущего ON первоначально проводили, синтезируя модельный гексатимидилат по протоколу, разработанному для синтеза фосфорилгуанидиновых аналогов [37] (таблица 1).

Таблица 4. Стартовый протокол для синтеза модельных гексатимидилат-*N*-незамещённых амидофосфатных олигонуклеотидов на основе протокола синтеза фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов [37]

Стадия	Реагент и условия	Время, сек
Детритилирование	3% трихлоруксусная к-та в CH_2Cl_2	172
Конденсация	0.07 М амидофосфит, 0.25 М ЕТТ в CH_3CN	151
Кэпирование	CapA (15% пропионовый ангидрид в ТГФ) CapB (13% 1-MeIm, 13% Py в ТГФ)	109
Окисление или окисление по Штаудингеру	0.02 М I_2 , 1% Py, 9% H_2O в ТГФ	27
	0.1 М FmocN ₃ в CH_3CN	1800
Деблокирование	Концентрированный $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1800

На первом этапе провели синтез модельных гексатимидилатов с одной (T^*T_5) и двумя ($\text{T}^*\text{T}^*\text{T}_4$) подряд Р- NH_2 -модификациями вблизи 5'-конца цепи олигонуклеотида. Мы ожидали, что на этапе краткосрочного (30 мин, 56 °С) финального деблокирования олиготимидилатных производных и отделения от твердофазного носителя концентрированным водным раствором аммиака [38] также должно происходить и удаление Fmoc-защитной группы с $\text{P}^{(\text{V})}=\text{N}$ -Fmoc-модифицированного иминофосфоранового межнуклеозидного звена, приводя к формированию *N*-незамещенного амидофосфатного олигодезоксирибонуклеотида. Однако, по данным электрофоретического анализа в денатурирующем ПААГ и офВЭЖХ (рис. 4а, б, соответственно), образование целевого продукта наблюдали только для мономодифицированного T^*T_5 гексатимидилата (со степенью превращения не более 35%) (рис. 4, дор. 2). Такой результат можно было ожидать, опираясь на данные работы относительно стабильности целевого *N*-незамещенного амидофосфата в условиях аммонолиза [38]. Однако не следует исключать и тот факт, что $\text{P}^{(\text{V})}=\text{N}$ -Fmoc-производное может деградировать и до удаления защитной группы [39].

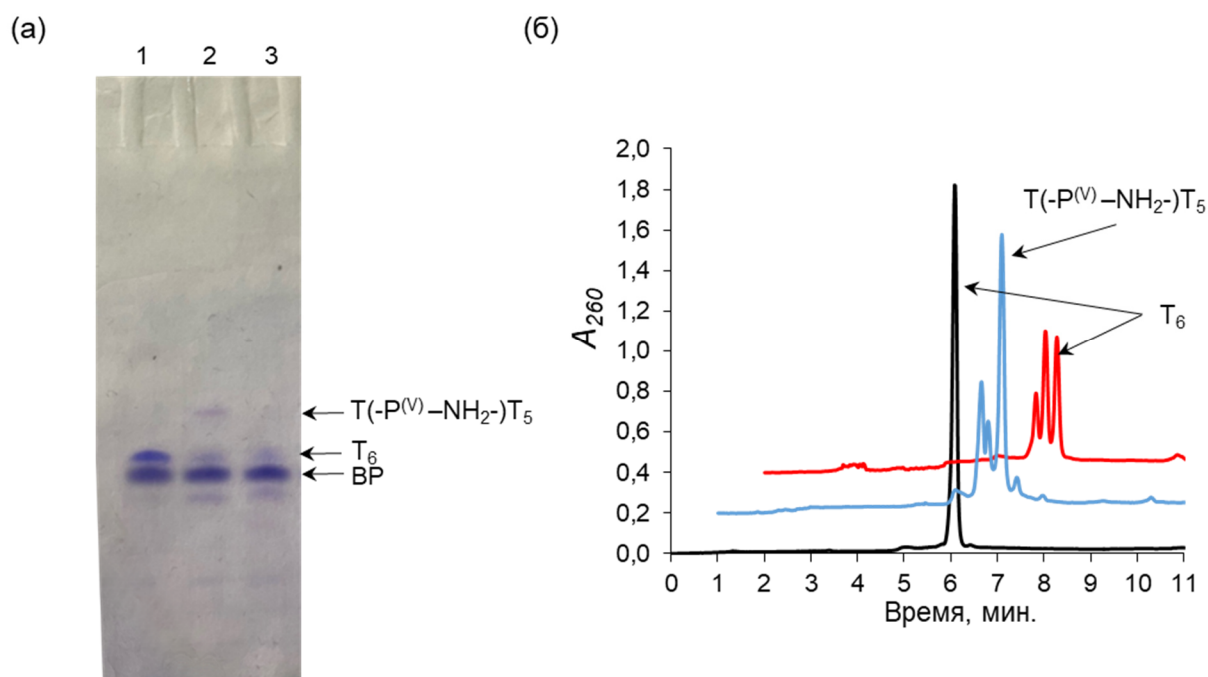


Рис. 4. Анализ реакционных смесей амидофосфатных ON, полученных по протоколу из Таблицы 1 методами а) гель-электрофореза (пункт 2.2.7а) (дор. 1 – T_6 , дор. 2 – T^*T_5 , дор. 3 – $T^*T^*T_4$, BP – бромфеноловый синий), б) офВЭЖХ (черная линия – T_6 , синяя линия – T^*T_5 , красная линия – $T^*T^*T_4$; градиент I (пункт 2.2.6 в))

С целью максимального смягчения условий щелочного деблокирования удаление цианэтильных защитных групп осуществляли в безводных условиях 50%-ным Et_3N в CH_3CN с последующим отщеплением ON от твердофазного носителя концентрированным водным аммиаком (30 мин, $25^\circ C$), финальное удаление DMTr-группы проводили 80% уксусной кислотой после отщепления от полимерного носителя (пункт 2.3.6). Поскольку возможной причиной низкой конверсии в целевой продукт могло выступать неполное окисление P(III) на этапе окисления по Штаудингеру в условиях твердофазного синтеза ON, была проанализирована эффективность получения гексатимидилата T^*T_5 как в условиях дискретного возрастания концентрации окислителя $FmocN_3$ с 0.1 до 0.25 М, так и увеличения продолжительности этого технологического этапа – 15, 30 и 45 мин. По результатам эксперимента увеличение концентрации азидо и длительности этапа окисления по Штаудингеру значительно повышают выход модифицированного P-NH₂-аналога. Важно отметить, что нам удалось, повысив концентрацию окислителя и время обработки $FmocN_3$ (0.25 М, 45 мин.), достичь более чем 80%-ной суммарной конверсии в олигомер T^*T_5 , по данным офВЭЖХ, даже при использовании классического аммонолиза на финальном этапе синтеза ON (рис. 5а, б).

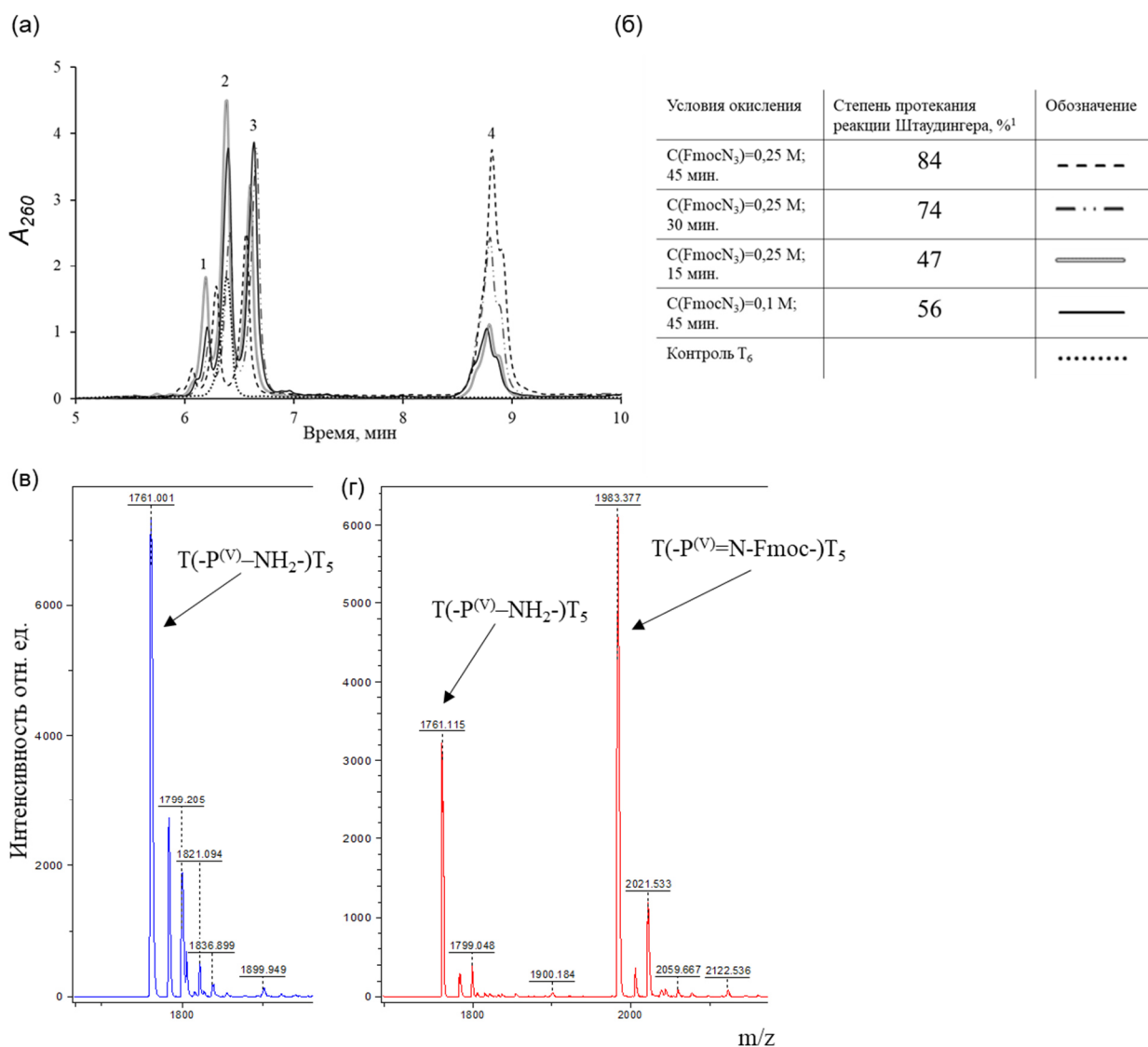


Рис. 5. (а) – офВЭЖХ-анализ реакционных смесей гексатимидилатов (T^*T_5), полученных в разных условиях окисления по Штаудингеру и обработанных концентрированным водным аммиаком в течение 30 мин при 25°C в градиенте I (пункт 2.2.6 в) Соотнесение пиков проводили по совокупности данных масспектрометрического анализа и сравнения с контрольным олигонуклеотидом T_6 : пик 1 – T_5 , пик 2 – T_6 , пик 3 – $T(-P^{(V)}(NH_2)-)T_5$, пик 4 – $T(-P^{(V)}=N-Fmoc-)T_5$; (б) – условия окисления по Штаудингеру без учета степени деструкции модифицированного звена, полученные как отношение суммы интегральных площадей пиков 3 и 4 к сумме интегральных площадей всех компонентов реакционной смеси (по данным офВЭЖХ); результат MALDITOF-MS анализа в) хроматографического пика 3 (рис.5а), $m/z(\text{теор})=1761.3$, г) хроматографического пика 4 (рис.5а), $m/z(\text{теор})=1983.4$

В составе реакционных смесей, отнесенных по совокупности данных масспектрометрического и хроматографического анализов, идентифицированы нативные пента- и гексатимидилаты (T_5 и T_6) и целевой N -незамещенный продукт, T^*T_5 (рис. 5а, фракции 1, 2 и 3

соответственно). Кроме того, анализ показал, что при использовании краткосрочной схемы аммонолиза концентрированным водным аммиаком (30 мин, 25°C) исчерпывающего удаления Fmoc-защиты не происходит (рис. 5а, фракция 4). Стоит особенно отметить, что $P^{(V)}=N$ -Fmoc-производное неустойчиво в условиях масс-спектрометрического анализа, так по данным MALDITOF-масс-спектрометрического анализа (рис. 5в, г), хроматографически чистая фракция 4 (рис. 5а) имеет в своем составе как гексатимидилат $T(-P^{(V)}=N\text{-Fmoc-})T_5$, так и целевой *N*-незамещенный амидофосфат, т.е. $T(-P^{(V)}(NH_2)-)T_5$.

Таким образом, далее в ходе автоматического синтеза амидофосфатных олигомеров мы использовали следующие режимы для этапа окисления P(III)-триэфира: концентрация окислителя FmocN₃ 0.25 М в ацетонитриле, длительность реакции Штаудингера при этих условиях – не менее 45 мин.

Поскольку смягчение условий деблокирования не позволило полностью избежать гидролиза модифицированного звена в водно-аммиачной среде, что, несомненно, согласуется с работами [11, 21, 24, 40] было предложено использовать насыщенный раствор аммиака в метаноле для финального удаления защитных групп с ON и его отщепления от CPG. С целью оценки устойчивости модифицированного звена к новым условиям деблокирования часть реакционной смеси T^*T_5 , полученной по усовершенствованному протоколу из табл. 1 (0.25 М FmocN₃, 45 мин.), дополнительно обработали 24 часа концентрированным водным аммиаком или насыщенным раствором аммиака в метаноле (рис. 6, дорожки 6 и 7 соответственно). Электрофоретический анализ показал высокую степень гидролиза модифицированных звеньев в случае обработки реакционной смеси концентрированным водным аммиаком; напротив, обработка метанольно-аммиачной смесью не привела к значительной деструкции амидофосфатных групп.

Полученный результат позволяет обоснованно считать, что связь P-NH₂ стабильна при обработке насыщенным раствором аммиака в метаноле, что подтверждается результатами работы [11]. Однако выбранный подход к удалению защитных групп не позволяет полностью удалить Fmoc-группу за 24 ч, в связи с чем было принято решение использовать предшествующее аммонолизу отщепление Fmoc-защиты обработкой раствором сильного основания (DBU) без отщепления от полимерного носителя согласно работе [24].

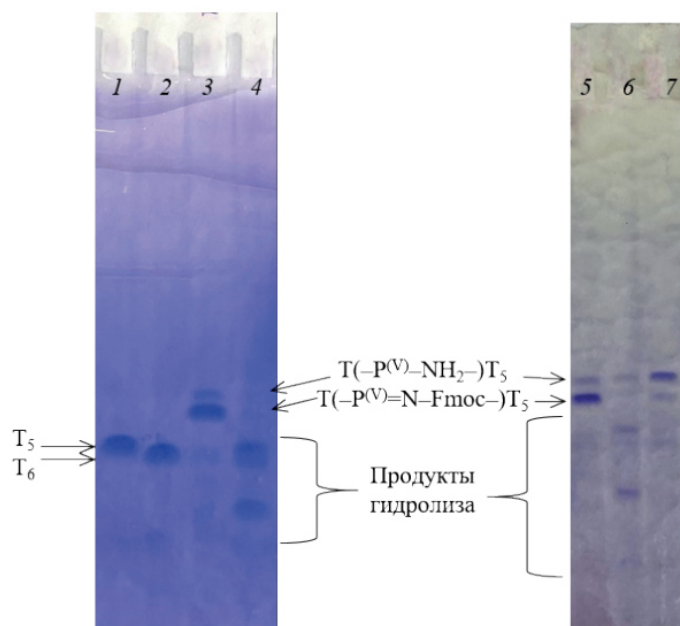


Рис. 6. Анализ реакционных смесей олигонуклеотидов T^*T_5 , полученных по усовершенствованному протоколу из таблицы 1 (0.25 М FmocN₃, 45 мин.) в зависимости от последовательной постсинтетической обработки, методом гель-электрофореза (пункт 2.2.7а). Дор. 1, 2 – контрольные T_5 и T_6 соответственно; дор. 3, 5 – аммонолиз (концентрированный водный аммиак, 30 мин), детритилирование (80% уксусная кислота, 10 мин); дор. 4 – детритилирование на CPG (3% трихлоруксусная кислота в CH₂Cl₂, 2 мин), удаление Fmoc-группы на CPG (2% раствор DBU в ацетонитриле, 5 мин), аммонолиз (насыщенный раствор аммиака в метаноле, 2 ч); дор. 6 – аммонолиз (концентрированный водный аммиак, 30 мин), детритилирование (80% уксусная кислота, 10 мин), дополнительный аммонолиз (концентрированный водный аммиак, 24 ч); дор. 7 – аммонолиз (концентрированный водный аммиак, 30 мин), детритилирование (80% уксусная кислота, 10 мин), дополнительный аммонолиз (насыщенный раствор аммиака в метаноле, 24 ч)

На следующем этапе работы мы провели синтез T^*T_5 с дополнительной обработкой DBU в ацетонитриле перед аммонолизом. В результате электрофоретического разделения реакционной смеси выявлено отсутствие модифицированного олигонуклеотида в ее составе (рис. 6, дорожка 4). Учитывая ранее показанную устойчивость P-NH₂-связи к деблокированию в метанольно-аммиачной смеси и к обработке DBU в безводных условиях, причиной отсутствия целевого соединения в реакционной смеси сочли деструкцию $(-P^{(V)}=N-Fmoc-)$ -фрагмента на стадии детритилирования трихлоруксусной кислотой. Предполагаемый механизм включает в себя протонирование сложноэфирной группы Fmoc-фрагмента с последующей локализацией положительного заряда на атоме фосфора и нуклеофильной атакой молекулой воды (рис. 7).

Присутствие воды на стадии детритилирования полностью исключить невозможно, поскольку в синтетическом цикле присутствует вода в составе йод-содержащего окислителя.

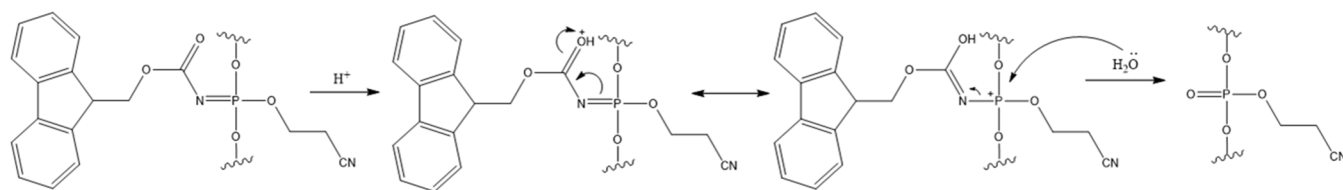


Рис. 7. Предполагаемый механизм гидролиза Fmoc-содержащего фрагмента на стадии детритилирования трихлоруксусной кислотой во время синтеза P-NH₂-олигонуклеотидов

Во избежание деструкции Fmoc-защищенного олигонуклеотида в кислых условиях в протокол синтеза ввели стадию отщепления защитных групп у амидофосфатного звена обработкой DBU, и, таким образом, в синтетическом цикле стадии детритилирования предшествует стадия отщепления Fmoc- и β-цианэтильной групп с образованием (–P(O)(NH₂)–)-фрагмента. Внедрение дополнительной стадии в цикл синтеза первоначально проводили вне автоматического синтезатора, для чего извлекали CPG-носитель с Fmoc-содержащим олигонуклеотидом из реакционной колонки, переносили в пробирку и обрабатывали раствором DBU в ацетонитриле в течение 5 мин при комнатной температуре. Экспериментально нами установлено, что свободная (–P^(V)(NH₂)–)-связь устойчива к обработке трихлоруксусной кислотой и другими реагентами, используемым в синтетическом цикле (рис. 8, дорожка 3).

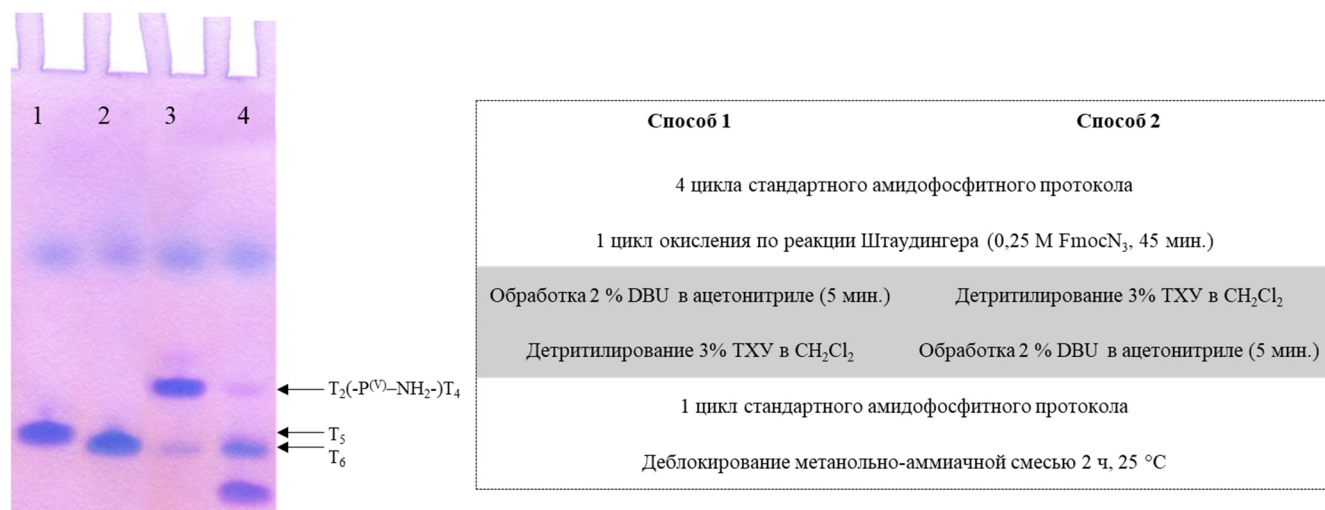


Рис. 8. Электрофоретический анализ (пункт 2.2.7 а) реакционных смесей: дор. 1, 2 – контрольные олигонуклеотиды T₅ и T₆, соответственно; дор. 3 – T₂*T₄, полученный по способу 1; дор. 4 – T₂*T₄, полученный по способу 2

Таким образом, введение дополнительной стадии отщепления защитных групп у модифицированного фосфата в сочетании с использованием мягкого щелочного деблокирования насыщенным раствором аммиака в метаноле позволило нам разработать протокол синтеза P-NH₂-

олигонуклеотидов с применением отечественного оборудования, в частности, ASM800 (Биоссет, Россия), стандартных коммерчески доступных мономеров и полимерных носителей (табл. 2).

Таблица 5. Протокол синтеза *N*-незамещенных амидофосфатных (P-NH₂) олигонуклеотидов в рамках амидофосфитного метода синтеза с использованием стандартных коммерчески доступных мономеров и полимерных носителей для отечественного ДНК/РНК-синтезатора ASM-800 (Биоссет, Россия)

Стадия	Реагент и условия	Время, сек
Детритилирование	3% трихлоруксусная кислотата в CH ₂ Cl ₂	172
Конденсация	0.07 М амидофосфит, 0.25 М ЕТТ в CH ₃ CN	151
Кэпирование	CapA (15 % пропиононовый ангидрид в ТГФ) CapB (13 % 1-MeIm, 13 % Py в ТГФ)	109
Окисление или окисление по Штаудингеру	0.02 М I ₂ , 1 % Py, 9% H ₂ O в ТГФ 0.25 М FmocN ₃ в CH ₃ CN	27 2700
Удаление Fmoc-группы	2 % DBU в CH ₃ CN	300
Деблокирование	Насыщенный раствор аммиака в метаноле	2-24 ч

3.1.3 Стабильность P-NH₂-аналогов в условиях щелочного деблокирования

Следует отметить, что при введении единичной P-NH₂-модификации конверсия в целевой продукт (*N*-незамещенный амидофосфатный (P-NH₂) олигонуклеотид) не превысила 85%. Так, при синтезе олигомера T*T₅, по данным ВЭЖХ-анализа, наблюдается ~13% продуктов гидролиза после обработки CPG-связанного олигонуклеотида метанольноаммиачной смесью в течение первых двух часов при комнатной температуре (рис. 9а, точка 0). Видно, что вплоть до 5 ч дополнительного выдерживания T*T₅ в среде NH₃/CH₃OH при 56°C значимой деградации амидофосфат-содержащего аналога не происходило. Лишь спустя сутки при 56 °C уровень деградации целевого продукта приближался к 50% (рис. 9а, точка 23 ч). Напротив, в случае дополнительного выдерживания в среде NH₃/H₂O при 56°C уже спустя 1 ч заметна серьезная деградация амидофосфатной группы. Следует отметить, что в случае использования в автоматическом синтезе коммерчески доступных мономеров (фосфитаминов) со стандартными защитными группами рекомендованное время деблокирования олигонуклеотидов концентрированным водным аммиаком не превышает 40 ч при комнатной температуре [41]. В случае использования насыщенного раствора аммиака в метаноле достаточно 18 ч при комнатной температуре, что было подтверждено экспериментально (рис. 9б). Поскольку (–P^(V)–NH₂–)-группа устойчива в насыщенном растворе аммиака в метаноле в широком диапазоне времени, следовательно “исходная” степень деструкции (–P^(V)(NH₂)–)-содержащего олигонуклеотида, полученная после первых двух часов деблокирования при комнатной температуре и

превышающая 10% по данным офВЭЖХ, не может быть вызвана гидролизом модифицированного звена в ходе деблокирования.

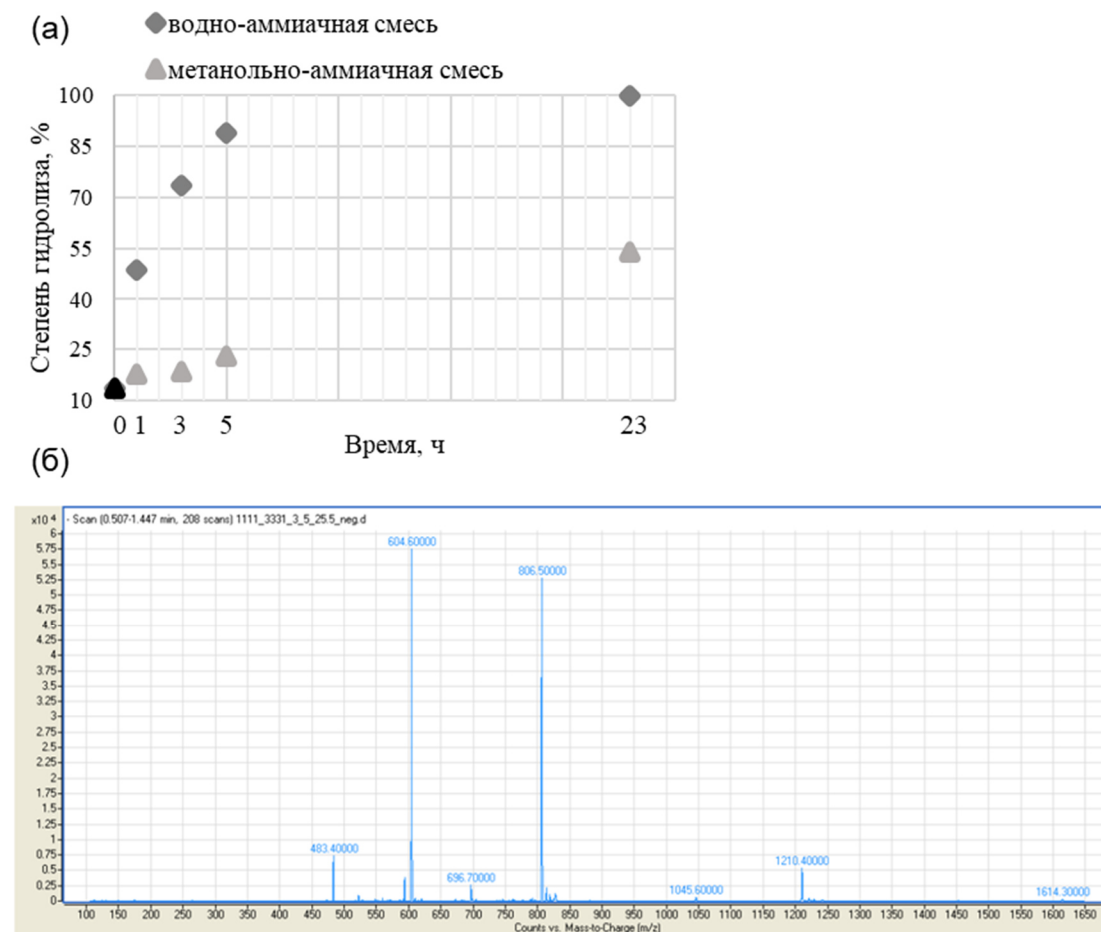


Рис. 9. а) Устойчивость P-NH₂ олигонуклеотидов к деблокированию насыщенным раствором аммиака в метаноле по сравнению со стандартным удалением защитных групп с использованием концентрированного водного аммиака (по данным офВЭЖХ); б) результат ESI-MS-анализа для олигонуклеотида N₄*1*3 (табл. 1), полученного после деблокирования насыщенным раствором аммиака в метаноле (18 ч, 25°C) и очистки гель-электрофорезом (пункт 2.2.7 б), (*m*(теор) = 2423.7 г/моль, *m*(эксп) = 2422.8 г/моль).

3.1.4 Выявление факторов, влияющих на снижение выхода P-NH₂-аналогов в условиях автоматического синтеза

Последующие эксперименты были направлены на выяснение других причин, влияющих на выход целевого *N*-незамещенного амидофосфатного олигонуклеотидного продукта. Для этого мы поставили задачи установить, зависит ли степень гидролиза амидофосфатной связи от следующих факторов:

- 1) места расположения одиночной P-NH₂-модификации в цепи олигонуклеотида,

2) типа прилегающих к ней нуклеозидов,

3) стадий синтетического цикла.

1. Для оценки влияния места расположения модификации были синтезированы гексатимидилаты, содержащие одиночную $(-P^{(V)}(NH_2)-)$ -группу в каждом из пяти межнуклеозидных положений (T_5^*T , $T_4^*T_2$, $T_3^*T_3$, $T_2^*T_4$, T^*5). Данный прием должен был показать, является ли увеличение числа циклов синтеза нативных фосфодиэфирных звеньев, последовавших за введением $(-P^{(V)}(NH_2)-)$ -остатков, фактором, определяющим степень гидролиза амидофосфатного фрагмента цепи ON. Было установлено, что вне зависимости от локализации в цепи одиночной амидофосфатной модификации $((-P^{(V)}(NH_2)-)$ -группы) конверсия в целевой гексатимидилатный продукт, по данным офВЭЖХ, составляет в среднем 72% (табл. 6, фактор А).

Таблица 6. Степень полноты протекания реакции Штаудингера (по данным офВЭЖХ) в зависимости от факторов, влияющих на устойчивость связи $(-P^{(V)}(NH_2)-)$, таких как: А) число стандартных циклов амидофосфитного синтеза, следующих после стадии модификации; Б) химическое строение динуклеотида в составе модифицированного звена

А		Б			
ON	Доля целевого ON, %	ON	Доля целевого ON, %	ON	Доля целевого ON, %
T_5^*T	79	G^*T_3	60	T_2G^*T	70
$T_4^*T_2$	73	C^*T_3	64	T_2G^*T	69
$T_3^*T_3$	73	A^*T_3	48	T_2A^*T	69
$T_2^*T_4$	64	T^*T_3	74	T_3^*T	75
T^*T_5	72				

2. Для ответа на вопрос, поставленный следующей задачей, мы провели синтез двух серий тетрамерных олигонуклеотидов, содержащих вблизи либо 5'-, либо 3'-конца цепи одиночную модификацию динуклеотидного звена $X(-P^{(V)}(NH_2)-)T$, где $X = G, C, A$ или T (табл. 6, фактор Б). Установлено, что, по данным количественного анализа профилей ВЭЖХ, выход целевых $P-NH_2$ -аналогов составляет в среднем ~68% и не зависит от химического строения динуклеотида в составе модифицированного звена.

3) Для выявления стадии синтетического цикла, оказывающей превалирующее влияние на устойчивость $(-P^{(V)}(NH_2)-)$ -связи, был проведен скрининг стадий и условий получения T_5^*T . После стадии окисления промежуточного фосфиттриэфира олигонуклеотида раствором $FmocN_3$ (0.25 M) мы последовательно исключали все стадии технологического цикла, обрабатывая затем твердофазный носитель насыщенном раствором аммиака в метаноле и оценивая состав реакционных смесей методом офВЭЖХ. Гомогенность реакционных смесей PNH_2 -

олигонуклеотидов, получаемых по разработанному протоколу, напрямую зависит от полноты протекания реакции Штаудингера и практически не обусловливается используемыми в синтетическом цикле реагентами и деблокирующими смесями. При синтезе T_5^*T с использованием дополнительного окисления йодом после стадии удаления Fmoc-защитной группы, мы получили прирост к содержанию T_6 в сравнении с синтезом без дополнительной стадии окисления (рис. 10).

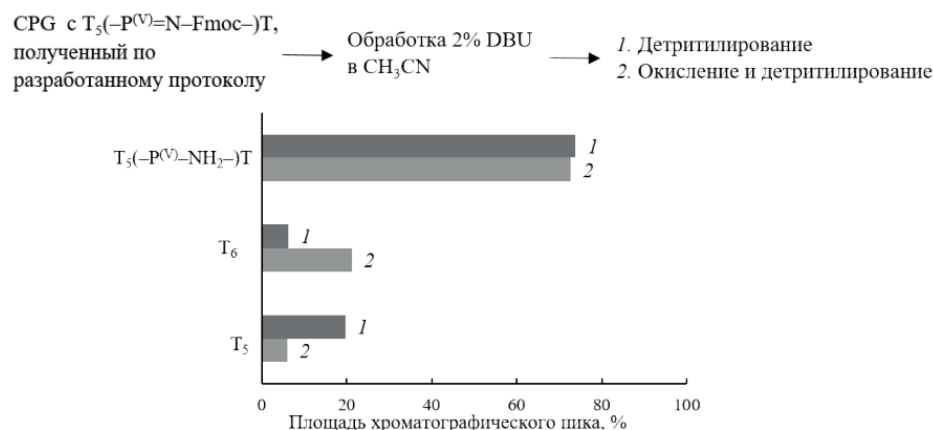


Рис. 10. Схема эксперимента по оценке влияния стадии дополнительного окисления смесью $I_2/Py/H_2O$ на соотношение побочных продуктов при синтезе $P-NH_2$ -олигонуклеотида

При попытке достигнуть полного протекания реакции Штаудингера мы провели синтез T_5^*T с использованием насыщенного раствора $FmocN_3$ (~0.63 M). К сожалению, используя повышенную концентрацию, также не удалось добиться полной конверсии (содержание побочных продуктов составило ~10%). Особенно остро проблема неполной конверсии в целевой амидофосфатный олигонуклеотид встает при переходе к множественной модификации олигонуклеотидной цепи. Причину частичного окисления с использованием $FmocN_3$ в ходе твердофазного синтеза предстоит выяснить в будущих экспериментах.

3.1.5 Гибридационные свойства $P-NH_2$ -аналогов

К настоящему времени имеется лишь крайне ограниченный набор данных, описывающих способность $P-NH_2$ -аналогов олигонуклеотидов образовывать комплексы с НК-матрицами [22, 23, 26, 42]. Именно поэтому мы исследовали способность серии октамерных ДНК, нативного (N_8) и модифицированных олигонуклеотидов (N_{x*y*z} , где x, y, z – порядковые числа нуклеозидов в составе модифицированного звена) к формированию комплементарных комплексов с матричным октамером M_8 . Отдельной задачей была попытка определить роль влияния $P-NH_2$ -модификации на зависимость температуры плавления ($T_{пл}$) от ионной силы раствора (табл. 7, рис. 11).

Важно отметить, что именно данный фактор – электронейтральность модификации – это ключевое свойство, определяющее фундаментальный потенциал использования

рассматриваемых изоструктурных Р-NH₂-аналогов нативных олигонуклеотидов. В табл. 7 представлены термодинамические параметры комплексообразования нативной ДНК-матрицы с набором модельных октануклеотидов (N_{x*y*z}) в стандартных буферных условиях (пункт 2.1.3, буфер А₃). Данные были получены методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала во многоволновом режиме [43]. Представленные данные – результат анализа как профилей кривых термической денатурации, так и ренатурации анализируемых дуплексов. Следует отметить, что взаимодействие всех модельных олигомеров с ДНК-матрицей демонстрирует строго равновесный характер комплексообразования. С учетом погрешности определения величины температуры плавления исследуемых комплексов (~0.2°C) [44] установлено, что введение амидофосфатных остатков в структуру октануклеотидов незначительно влияет на их сродство к мишени ДНК в условиях высокой ионной силы раствора (1 М NaCl) (табл. 7). Вне зависимости от позиции введения модификации в структуре олигомера и числа модифицированных звеньев в среднем наличие одного (–P^(V)(NH₂)–)-звена приводит к снижению термической стабильности ДНК-комплексов на 1.0–2.0°C. Этот факт согласуется с данными работ французских исследователей [22]. Следует отметить, что термостабильность комплексов, формируемых различными фракциями диастереомеров олигомера N_{1*6*1}, разделенных с помощью ВЭЖХ, в условиях высокой ионной силы раствора практически не отличается (табл. 7, (1) N_{1*6*1} и (2) N_{1*6*1}).

Таблица 7. Результаты исследования термической стабильности олигонуклеотидных комплексов M₈/N_{x*y*z} с разным числом и расположением *N*-незамещенных амидофосфатных групп в олигонуклеотиде N_{x*y*z} в условиях высокой ионной силы (1 М NaCl)

Дуплекс M ₈ с:	Выход ОН, %	ΔS°, кал/(К·моль)	ΔH°, ккал/моль	ΔG° ₃₇ , ккал/моль	T _{пл} , °C	ΔT, °C	ΔT/mod, °C
N ₈		-142±1	-51.5±3.9	-7.4±0.2	39±1		
N _{1*7}	23	-162±2	-57.3±0.7	-7.0±0.1	36±1	-3	
N _{4*4}	29	-175±3	-61.4±0.9	-7.2±0.1	38±1	-1	
N _{7*1}	49	-157±4	-56.0±1.3	-7.3±0.1	38±1	-1	
(1) N _{1*6*1}	15	-157±3	-55.9±0.9	-7.1±0.1	37±1	-2	-1
(2) N _{1*6*1}	23	-132±1	-48.2±0.3	-7.2±0.1	37±1	-2	-1
N _{6*1*1}	33	-146±4	-52.5±1.3	-7.2±0.1	38±1	-1	-1
N _{4*1*3}	22	-165±4	-58.1±1.3	-6.9±0.1	36±1	-3	-2
N _{1*1*6}	28	-142±9	-51.0±2.9	-7.0±0.1	37±1	-3	-1

Примечание: для последовательности N_{1*6*1} удалось разделить две смеси диастереомеров (1) и (2).

Снижение ионной силы буферного раствора (при дискретном переходе от 1 к 0.1 и до 0.01 М раствора NaCl) показало, что для рассмотренных бисмодифицированных октануклеотидов явно выражен эффект введения электронейтральной Р-NH₂-модификации (рис. 11). При исследовании мономодифицированных комплексов не удалось обнаружить статистически

значимую зависимость от ионной силы раствора. Очевидно, что наличие P-NH₂-модификации в цепи олигомера приводит к достоверно значимому снижению зарядобусловленной компоненты энергии взаимодействия комплементарных цепей.

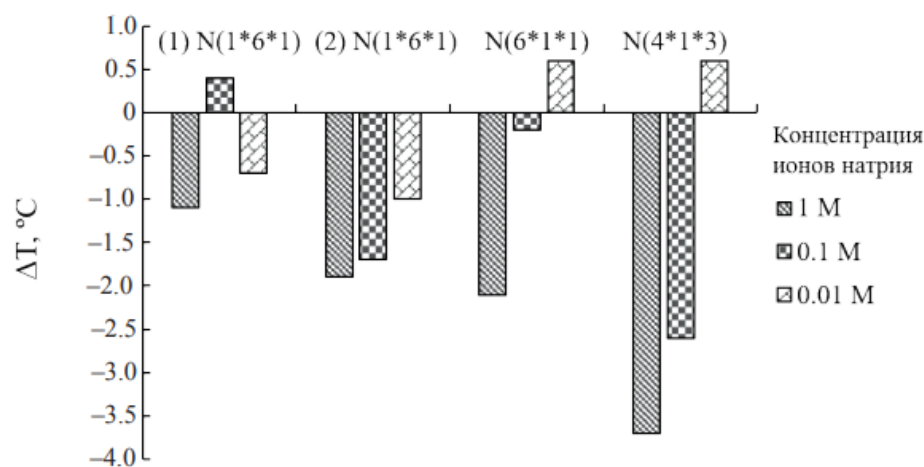


Рис. 11. Вклад P-NH₂-модификации в термическую стабильность (ΔT) комплементарных комплексов бисмодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов с матрицей M₈ в зависимости от ионной силы раствора относительно немодифицированного комплекса

Заметим, что в ряде случаев при пониженной ионной силе (0.01 M NaCl) (P^(V)(NH₂)–)-содержащие аналоги демонстрируют даже несколько большую термостабильность комплементарных комплексов с ДНК-матрицей относительно таковых с участием нативных олигонуклеотидов. При этом, по-видимому, наблюдается некоторая зависимость термодинамического эффекта от локализации, нуклеотидной последовательности сайта модификации, а также его диастереомерного состояния.

3.2 Рационализация протокола синтеза олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, проявляющих РНК-расщепляющую активность

Класс РНК-расщепляющих олигонуклеотид-пептидных конъюгатов (ОПК) возник порядка 30 лет назад [45] и принадлежит к большой группе РНК-направленных агентов – искусственных РНКаз. За счёт олигонуклеотидной части конъюгат обеспечивает комплементарное узнавание РНК-мишени, в свою очередь наличие положительно заряженного пептида регулярного пептида (например, Ac-[(LR)₂G]₂) приводит к её расщеплению. Они уже показали свой “мультифункциональный характер действия, включающий физическое блокирование миРНК, её вытеснение из RISC-комплекса, прямое каталитическое расщепление, разрушение с привлечением РНКазы H1 и активацию эндогенных путей деградации миРНК, что обеспечивает их высокую миРНК-ингибирующую активность и принципиально отличает данный

класс соединений от классических стерических ингибиторов” [46]. Несмотря на то, что класс расщепляющих ОПК появился практически одновременно с ОПК, обеспечивающими другой биологический функционал (например, конъюгаты с клеточно-проникающими пептидами) [47], походы к их синтезу гораздо менее разнообразны и представлены двумя основными реакциями. Первые представители РНК-расщепляющих ОПК синтезировали по реакции окислительно-восстановительной конденсации с использованием редокс-пары трифинилфосфин– 2,2'-дипиридилдисульфид и катализатора DMAP [45, 48–50]. Позднее для возможности варьирования места присоединения пептидного фрагмента схему синтеза сменили на метод активированных эфиров с использованием DCC/DMAP (рис. 12, I) [12, 13, 51]. Оба метода в своём текущем исполнении предполагают использование абсолютных органических растворителей и достаточно высоких избытков реагирующих компонентов, что сильно сказывается на итоговой стоимости всей будущей терапевтической конструкции.

Поскольку функциональность ОПК зависит от структуры линкерного фрагмента между функциональными частями конъюгата в рамках настоящей работы было решено не переходить к принципиально новой химии конъюгации и оптимизировать существующий подход, основанный на методе активированных эфиров.

3.2.1 Оптимизация синтетической стратегии

Для оптимизации протокола конъюгации мы исследовали несколько альтернативных подходов с использованием водорастворимого 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) (рис.12, IIIa) или представителя аминиевых/урониевых солей, широко используемого в пептидной химии, а именно 2-(7-азабензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилурония гексафторфосфата (HATU) (рис. 12, II). HATU обладает высокой эффективностью активации карбоксильной группы, требуя лишь небольшого избытка и демонстрируя значительно сниженную склонность к изомеризации карбоновой кислоты в неактивную форму [52]. Однако использование HATU по-прежнему требует органических растворителей. Среди альтернативных активирующих агентов EDCI обладает явным преимуществом, а именно, способностью эффективно «работать» в водно-органических смесях растворителей. Как и другие производные карбодиимида, EDCI может способствовать побочным реакциям изомеризации; однако эти ограничения можно минимизировать за счет контроля температуры и использования катализаторов, таких как *N*-гидроксисукцинимид (NHS) (рис. 12, IIIб) [53].

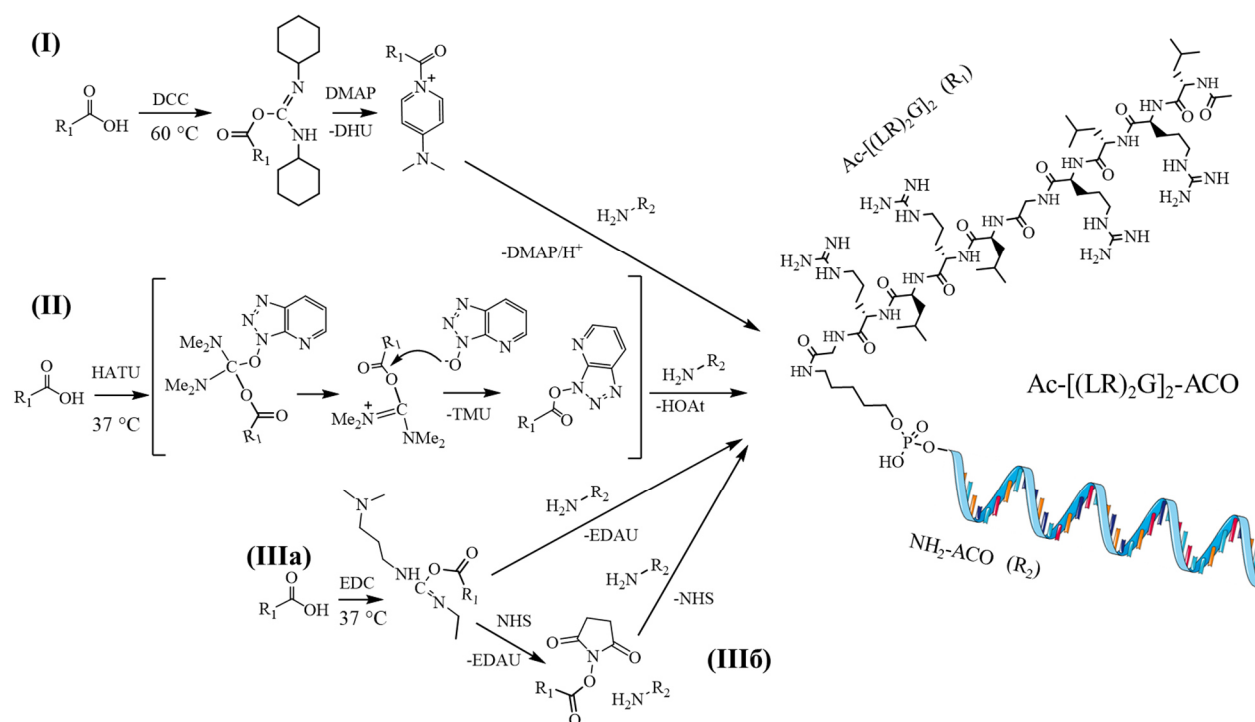


Рис. 12. Схема синтеза РНК-расщепляющего олигонуклеотид-пептидного конъюгата $\text{Ac}-[(\text{LR})_2\text{G}]_2\text{-ACO}$ с использованием ранее описанного протокола (I) [12, 51] и протоколов, описанных в настоящей работе (II, IIIa, IIIб). N,N' -Дициклогексилмочевина (DHU), 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилмочевина (EDAU) и N,N,N',N' -тетраметилмочевина (TMU) являются соответствующими побочными продуктами мочевины.

3.2.1.1 HATU протокол

Условия работы [19] были выбраны в качестве эталонных условий из нескольких вариантов, найденных в литературе по использованию солей аммония/урония в пептидной химии и синтезе олигонуклеотидных конъюгатов [19, 54–56]. В выбранном протоколе [19] было показано, что 10% избыток кислотного компонента относительно аминокислотного компонента и 3.5-кратный избыток активирующего реагента по отношению к кислотному компоненту в присутствии третичного основания (Et_3N или DIPEA) достаточны для достижения высокого выхода целевого ОПК. В ходе проверки описанных условий (Таблица 3, протокол B₁) на 16-ти и 30-ти звенном олигонуклеотидах ($5'\text{-NH}_2\text{-16nt}$ и $5'\text{-NH}_2\text{-30nt}$ соответственно) с использованием пептида $\text{Ac}-[(\text{LR})_2\text{G}]_2$ в виде ацетатной соли мы столкнулись с протеканием конкурентной реакции присоединения избытка уксусной кислоты в составе пептида по алифатической аминогруппе олигонуклеотида (рис. 13, дор. 2, 4). С целью решения проблемы протекания побочной реакции была проведена смена противоиона в исходном пептиде на хлорид (пункт 2.3.8). Смена противоиона полностью решила проблему конкурентного ацетилирования алифатической аминогруппы в условиях конъюгации. Позднее был приобретён коммерчески доступный пептид в виде хлоридной соли.

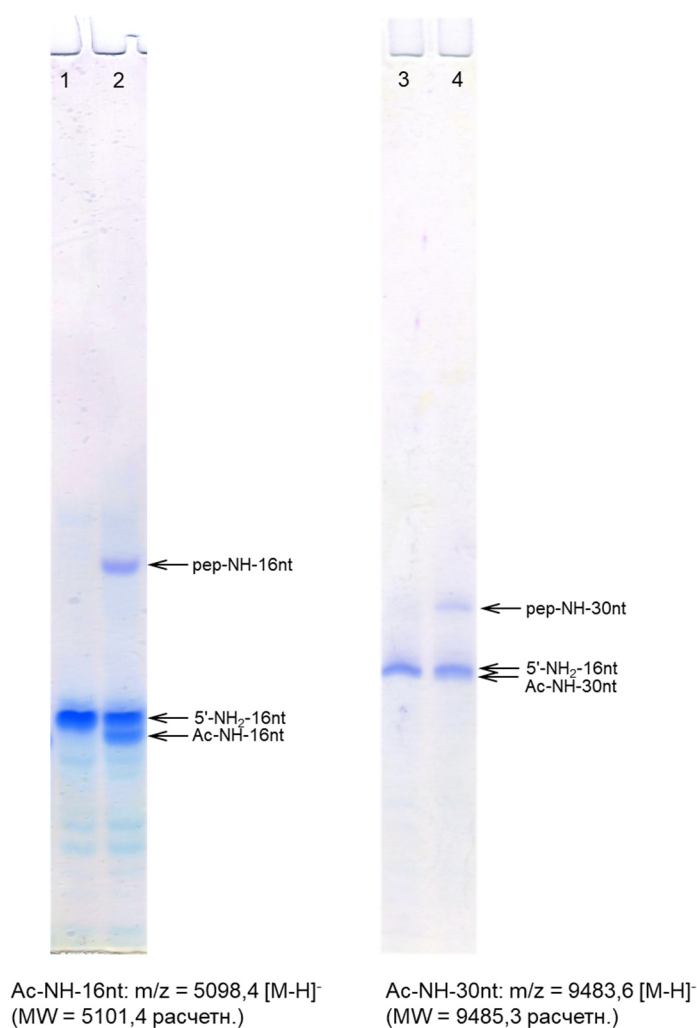


Рис. 13. Электрофоретический анализ (пункт 2.2.7 а) реакционных смесей ОПК, полученных по протоколу В₁ (Таблица 3): дор. 1, 3 – контрольные олигонуклеотиды 5'-NH₂-16nt и 5'-NH₂-30nt, соответственно; дор. 2, 4 – олигонуклеотиды 5'-NH₂-16nt и 5'-NH₂-30nt после реакции конъюгирования, соответственно

Для синтеза ОПК из целевого 30-ти звенного 5'-NH₂-30nt мы решили увеличить в 5 раз избытки пептида по отношению к олигонуклеотиду, сохраняя при этом соотношение активирующего агента, основания и пептида на уровне 3.5:3.5:1 (Таблица 3, протокол В₂). Увеличение количества пептида, используемого в реакции, объясняется размерными характеристиками исходных реагентов и потенциальными нековалентными взаимодействиями между довольно протяженной молекулой олигонуклеотида и пептидом, которые помогают сохранить доступность активированной карбоксильной группы для нуклеофильной атаки 5'-концевой алифатической аминогруппой олигонуклеотида.

В результате использование увеличенных избытков реагентов с хроматографически чистым аминоксодержащим олигонуклеотидом привело к почти полному превращению олигонуклеотида 5'-NH₂-30nt в продукты присоединения пептида (рис. 14а; б, дор. 2, зеленая

стрелка), о чем свидетельствует исчезновение полосы 5'-NH₂-30nt (рис. 14б, дор. 2, черная стрелка).

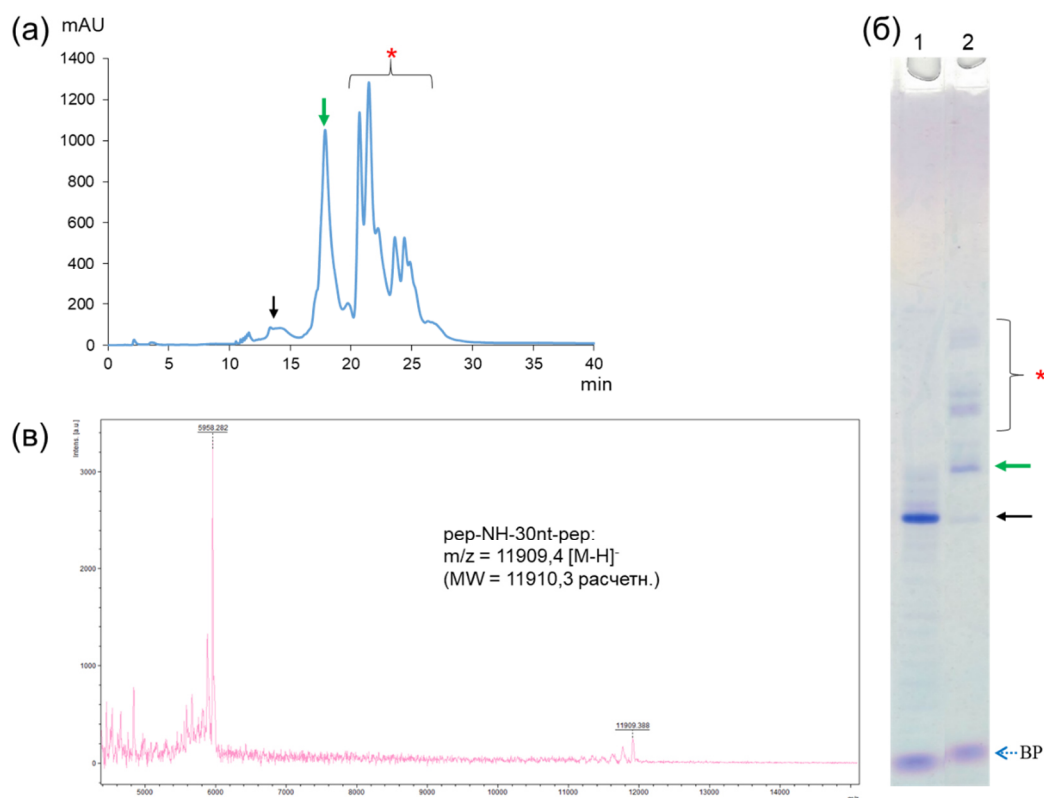


Рис. 14. Анализ реакционной смеси ОПК, полученного с использованием протокола В₂ (Таблица 3). (а) офВЭЖХ анализ (пункт 2.2.6 в, градиент IV); (б) электрофоретический анализ (пункт 2.2.7 а): дор. 1 – контрольный олигонуклеотид 5'-NH₂-30nt, дор. 3 – реакционная смесь для протокола В₂ (Таблица 3). ВР – бромфеноловый синий; (в) результат MALDITOF-MS-анализа для хроматографически выделенного ОПК пер-NH-30nt-пер, содержащего два пептидных фрагмента в составе одной молекулы олигонуклеотида 5'-NH₂-30nt. Черные и зеленые стрелки указывают на олигонуклеотид 5'-NH₂-30nt и его конъюгат соответственно. Красная звездочка отмечает побочные продукты реакции

Однако неожиданным открытием стало высокое содержание побочных продуктов (до 70% от общей конверсии). Эти побочные продукты представляют собой молекулы, которые более гидрофобны, чем целевой конъюгат, и обладают более высоким отношением массы к заряду (рис. 14а, б, красная звездочка). В совокупности эти наблюдения позволяют предположить, что побочная реакция включает присоединение нескольких молекул пептида к одной олигонуклеотидной цепи с образованием мультikonъюгатов. Этот вывод был подтвержден MALDITOF-MS-анализом после успешного хроматографического выделения молекулы, предположительно являющейся бис-конъюгатом (рис. 14в, $m/z = 11909.4 [M-H]^-$; $MW_{\text{расч.}} = 11910.3$). Однако, поскольку метод масс-спектрометрического анализа не предоставляет

подробной структурной информации, невозможно определить точные места присоединения дополнительных молекул пептида по олигонуклеотидной цепи. Первоначально мы предложили несколько возможных путей присоединения: 1) деблокирование *N*-концевой аминокислоты и линейное присоединение нескольких пептидных фрагментов с увеличением общей длины пептида; 2) реакция присоединения по гуанидиновым группам боковой цепи пептида [57]; 3) реакция присоединения по экзоциклическим аминогруппам азотистых оснований. Для исключения первых двух гипотез параллельно была проведена конъюгация пептида с использованием протокола В₂ (Таблица 3) на олигонуклеотиде, содержащем (5'-NH₂-30nt) или не содержащем (30nt) 5'-алифатическую аминогруппу.

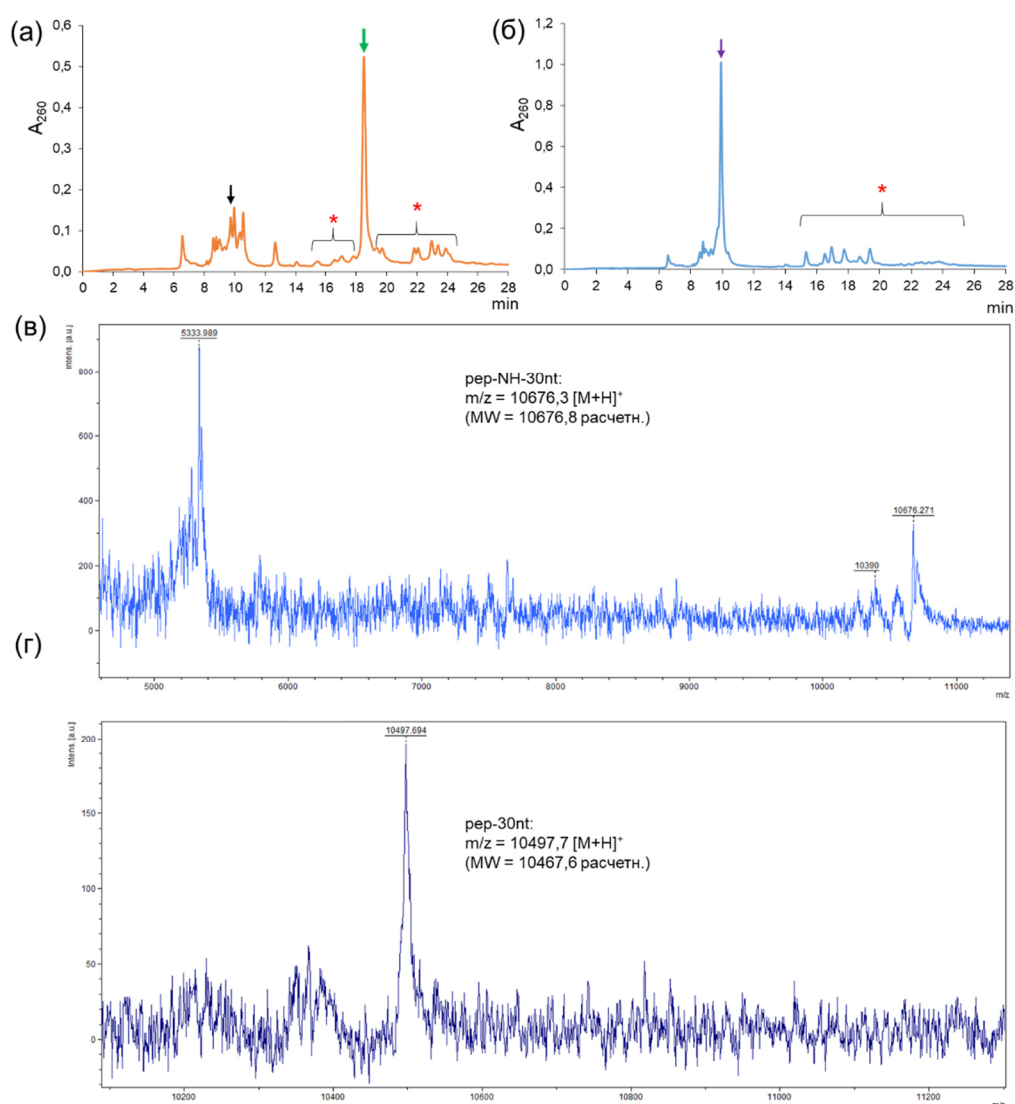


Рис. 15. офВЭЖХ анализ (пункт 2.2.6 в, градиент III) реакционных смесей ОПК, полученных с использованием протокола В₂ (Таблица 3) для а) олигонуклеотида 5'-NH₂-30nt и б) олигонуклеотида 30nt. Результат MALDITOF-MS-анализа для хроматографически выделенных моноконъюгатов с в) 5'-NH₂-30nt и г) 30nt. Фиолетовая, черная и зеленая стрелки указывают на

олигонуклеотиды 30nt, 5'-NH₂-30nt и конъюгат с 5'-NH₂-30nt, соответственно. Красная звездочка отмечает побочные продукты реакции

Результаты (рис. 15а, б) подтвердили, что дополнительные пептидные фрагменты присоединяются через экзоциклические аминогруппы азотистых оснований, при этом степень конверсии побочной реакции составляет около 30% (рис. 15б). Попытки контролировать побочную реакцию путем уменьшения избытков активирующих агентов, использования других соотношений пептид/НАТУ (1:1) [58] или добавления хаотропных агентов, таких как хлорид лития [59], привели к резкому снижению конверсии, вплоть до полного подавления (рис. 16).

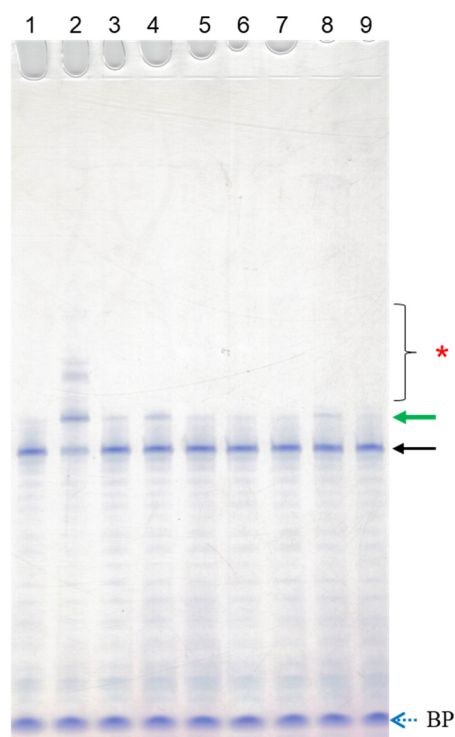


Рис. 16. Электрофоретический анализ (пункт 2.2.7 а) реакционных смесей ОПК, полученных по разным вариантам протокола В (Таблица 3): дор. 1 – контрольный олигонуклеотид 5'-NH₂-30nt; дор. 2 – протокол В₂; дор. 3 – протокол В₂ с добавлением 0.5 М LiCl; дор. 4 – протокол В₁; дор. 5 – протокол В₁ с добавлением 0.5 М LiCl; дор. 6 – протокол В₃; дор. 7 – протокол В₃ с добавлением 0.5 М LiCl; дор. 8 – протокол В₄; дор. 9 – протокол В₄ с добавлением 0.5 М LiCl. Черная и зеленая стрелки указывают на олигонуклеотид 5'-NH₂-30nt и его конъюгат, соответственно. Красная звездочка отмечает побочные продукты реакции

Протекание побочной реакции может серьёзно сказываться на итоговой функциональности конъюгата, а смеси целевого и нецелевых моноконъюгатов невозможно разделить. Однако высокая эффективность НАТУ потенциально может быть использована в твердофазном режиме синтеза при использовании защищенных олигонуклеотидов, присоединенных к твёрдому носителю.

3.2.1.2 EDCI протокол

Поскольку протокол на основе HATU, обеспечивающий хорошую степень конверсии при сравнительно низких избытках реагентов, имеет такие недостатки, как высокий уровень образования нецелевых конъюгатов, а также необходимость использования безводных органических растворителей, мы решили переключить внимание на реакцию с водорастворимым карбодиимидом EDCI.

Протокол EDCI основан на условиях, описанных ранее в [20]. Главное преимущество EDCI заключается в возможности использования водно-органической смеси с соотношением воды и ДМСО 1:1 и фосфатного буфера (pH 7.0), который поддерживает оптимальный диапазон pH для активности карбодиимида и эффективного депротонирования реагирующих amino- и карбоксильных групп. Соотношения реагентов, описанные в работе [20], предполагают использование больших избытков пептида (приблизительно 100-кратных), поэтому мы сосредоточились на рациональном использовании исходных реагентов для минимизации побочных эффектов, связанных с большим избытком пептида. Также были учтены амфифильная природа олигонуклеотида и поликатионный характер пептида, которые могут приводить к агрегации. Первоначально избыток пептида был уменьшен до 20-кратного, а соотношение EDCI/пептид было установлено на уровне 3:1 (пункт 2.3.9, протокол C). Используя эти соотношения реагентов и хроматографически чистый олигонуклеотид 5'-NH₂-30nt, был достигнут достаточно высокий уровень конверсии (приблизительно 56%, согласно профилю офВЭЖХ, рис. 17а, б).

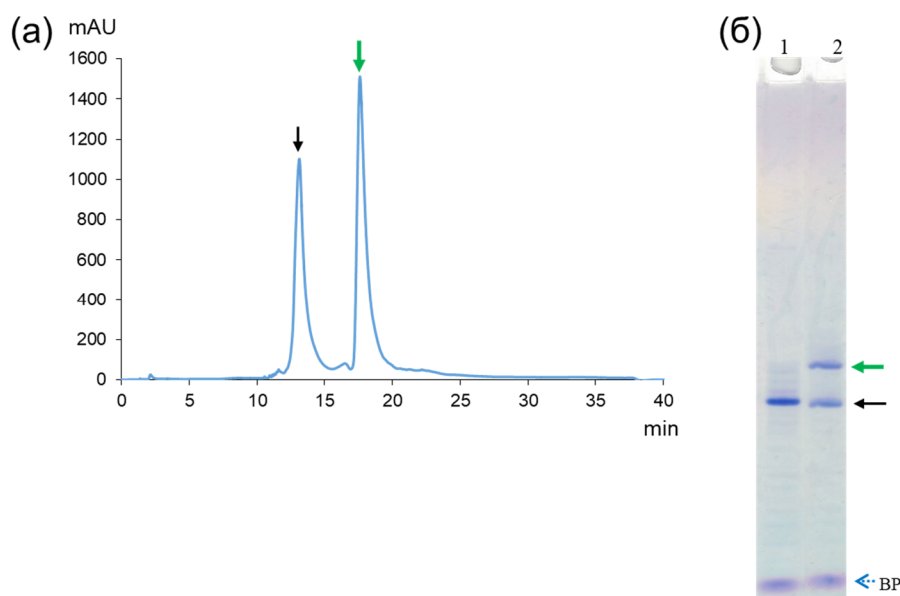


Рис. 17. Анализ реакционной смеси ОПК, полученного с использованием протокола C₁ (Таблица 3). (а) офВЭЖХ анализ (пункт 2.2.6 в, градиент IV); (б) электрофоретический анализ (пункт 2.2.7 а): дор. 1 – контрольный олигонуклеотид 5'-NH₂-30nt, дор. 2 – реакционная смесь для протокола

C₁ (Таблица 3). Черные и зеленые стрелки указывают на олигонуклеотид 5'-NH₂-30nt и его конъюгат соответственно. Красная звездочка отмечает побочные продукты реакции

В ходе реакции сразу после добавления раствора олигонуклеотида к активированному пептиду наблюдалось образование осадка. Учитывая амфифильную природу соединяемых молекул, образование осадка можно объяснить межмолекулярным электростатическим взаимодействием отрицательно заряженного олигонуклеотида с положительно заряженным пептидом и их последующей агрегацией в водно-органическом растворителе. Переход реакции из гомогенного в гетерогенный режим затрудняет доступ активированных карбоксильных групп пептида для атаки 5'-концевой алифатической аминогруппой. Основываясь на литературных данных о стабильности EDCI в водных буферных растворах ($t_{1/2}$ 36 ч, pH 7.0, 25 °C) [60], мы решили воспользоваться этими преимуществами химии EDCI. Использование водного раствора без органического компонента предотвратило образование осадка, но не привело к значительному увеличению (не более чем на 5%) степени превращения в реакциях, проводимых по протоколу C.

Недостаточная стабильность соответствующей *O*-ацилмочевины или ее возможная изомеризация в неактивную *N*-ацилмочевину может быть еще одной возможной причиной неполной конверсии. За счёт добавления катализатора *N*-гидроксисукцинимид (NHS) синтетический процесс получения ОПК был улучшен (рис. 18а, протокол D), что позволило увеличить конверсию в целевой конъюгат на 20%, достигнув уровня свыше 90% (рис. 18б, протокол D₂).

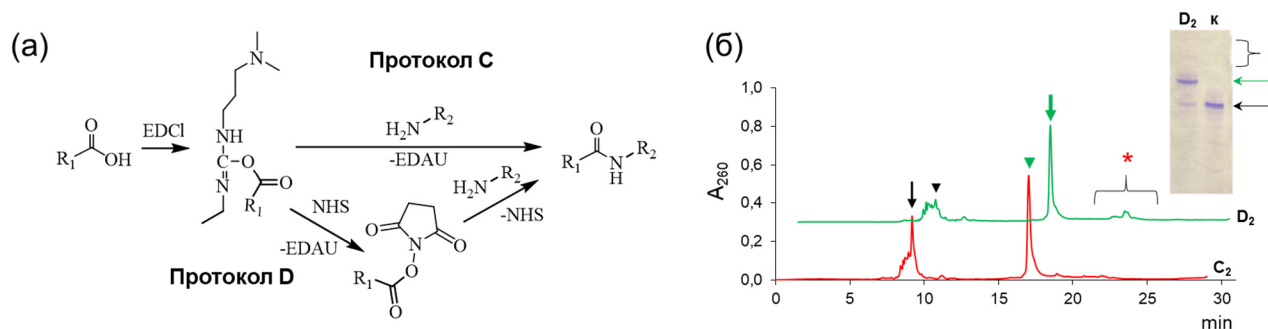


Рис. 18. Оптимизация протокола синтеза ОПК на основе EDCI. (а) Схема реакции и б) офВЭЖХ анализ (пункт 2.2.6 в, градиент III) реакционных смесей, соответствующих синтезу ОПК по протоколу на основе EDCI в отсутствие (Таблица 3, протокол C₂) и в присутствии катализатора NHS (Таблица 3, протокол D₂). Черная и зеленая стрелки указывают на олигонуклеотид 5'-NH₂-30nt и его конъюгат соответственно. Красная звездочка отмечает побочные продукты реакции

Однако использование по-прежнему высокого избытка пептида (в 20 раз) привело к накоплению продуктов присоединения дополнительных пептидных фрагментов, как и в случае с протоколом на основе HATU, также большие избытки пептида могут значительно затруднить масштабируемость синтеза в будущем из-за нековалентных взаимодействий между пептидом и олигонуклеотидом [61]. На основании этого протокол D (рисунок 19а, б) был оптимизирован путем уменьшения избытка пептида с 20-кратного до 5-кратного, аналогично активации HATU. Варьируя соотношение пептида и EDCI, а также изучая влияние состава смеси растворителя, в частности, процентного содержания ДМСО в реакционной смеси, были получены оптимальные границы условий синтеза конъюгата $\text{Ac}-[(\text{LR})_2\text{G}]_2\text{-NH-30nt}$ с использованием химии EDCI/NHS. Было показано, что высокая степень конверсии (более 90%) может быть достигнута с использованием строго водных растворов с увеличенным избытком EDCI по отношению к пептиду (до 50-кратного) и низким избытком пептида по отношению к олигонуклеотиду (5-кратным). Кроме того, водно-органический растворитель (50% ДМСО в воде) позволяет использовать низкие избытки как пептида (до 5-кратного по отношению к олигонуклеотиду), так и EDCI (до 3-кратного по отношению к пептиду), поддерживая высокий уровень конверсии.

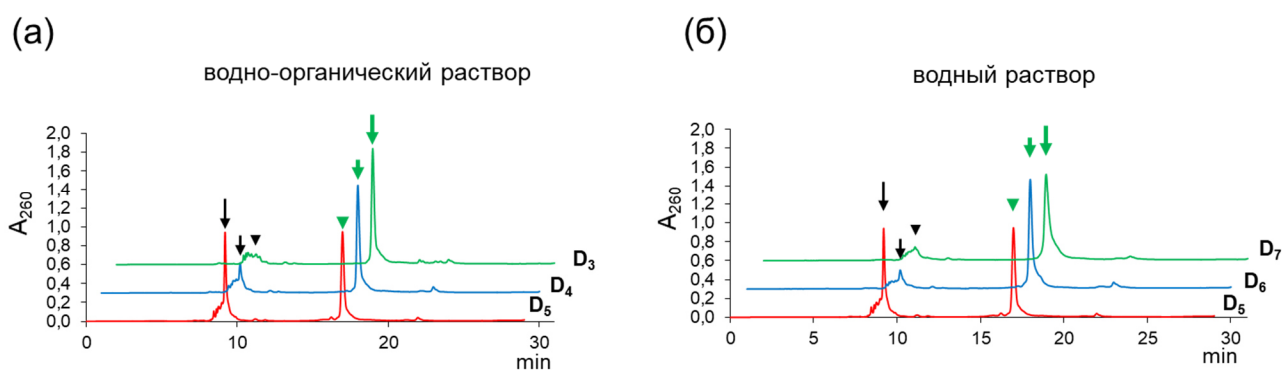


Рис. 19. Оценка вариативности протокола D. офВЭЖХ анализ реакционных смесей конъюгатов $\text{Ac}-[(\text{LR})_2\text{G}]_2\text{-NH-30nt}$, полученных в зависимости от а) состава растворителя; б) от соотношения пептид/EDCI. Черная и зеленая стрелки указывают на олигонуклеотид 5'-NH₂-30nt и его конъюгат соответственно

3.2.2 Оценка РНК-расщепляющей активности, полученными конъюгатами

Сохранение рибонуклеазной активности целевого конъюгата является критически важным фактором при оптимизации протокола синтеза. Анализ кинетики расщепления 3'-FAM-miR-21 показал, что конъюгаты, синтезированные с использованием протоколов B_2 и C_1 и электрофоретически выделенные, продемонстрировали высокую каталитическую активность в течение 24 часов инкубации. Конъюгат, синтезированный с использованием протокола C_1 , продемонстрировал 61% расщепления целевого фрагмента, в то время как конъюгат, приготовленный по протоколу B_2 , уже 93% расщепления к этому моменту времени (рисунок 20а,

б). К 72 часам оба конъюгата достигли сопоставимого и почти полного расщепления целевого фрагмента (89% и 100% для протокола С₁ и протокола В₂, соответственно). Оба конъюгата продемонстрировали идентичную специфичность последовательности. Расщепление происходило преимущественно в UX-мотивах в пределах одноцепочечной области 3'-FAM-miR-21, при этом основные сайты расщепления были идентифицированы в позициях U₁₄G₁₅ и U₁₇G₁₈ (рис. 20а). Наблюдаемая разница в эффективности расщепления полученными конъюгатами может быть объяснена наличием нецелевых моноконъюгатов, образующихся в результате синтеза с помощью В₂.

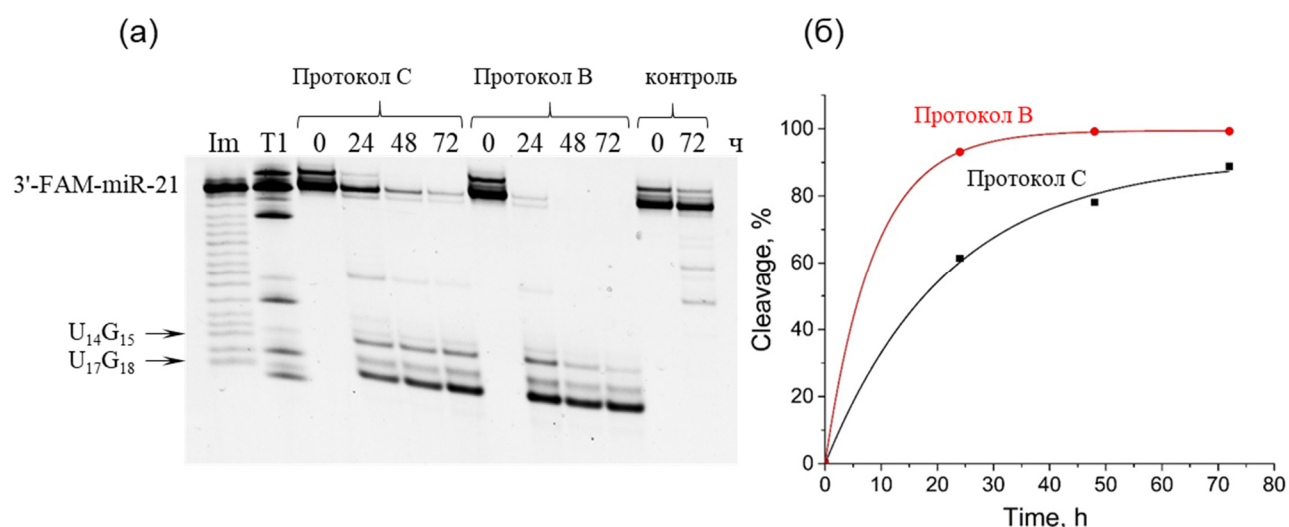


Рис. 20. Анализ расщепления 3'-FAM-miR-21 с помощью ОПК, полученных с использованием различных протоколов синтеза. (а) Электрофоретический анализ (пункт 2.2.7 в), показывающий продукты расщепления 3'-FAM-miR-21 (пункт 2.3.10). Дорожки Im и T1, соответственно, статистический гидролиз 3'-FAM-miR-21 в 2 М имидазоле (пункт 2.3.11 а) и частичное расщепление РНК РНКазой T1 (пункт 2.3.11 б). Контроль – 3'-FAM-miR-21, инкубированная в отсутствие ОПК в течение 0 и 72 ч. Типы конъюгатов и время инкубации указаны в верхней части геля. (б) Кинетические кривые расщепления 3'-FAM-miR-21 конъюгатами.

При последующем сравнении РНК-расщепляющей активности ОПК, синтезированных по протоколам, оптимизированным в настоящей работе, с ОПК, полученным по эталонному протоколу с использованием DCC/DMAP (Таблица 3, протокол А), были также выявлены расхождения в степени эффективности (рис. 21а, б). Степень расщепления электрофоретически чистых конъюгатов напрямую зависит от степени протекания конкурентной реакции ацилирования азотистых оснований при сохранении сайт-специфичности. Поскольку реакция ацилирования азотистых оснований конкурента и может протекать одновременно с

ацилированием алифатической аминогруппы, то смеси моноконъюгатов не могут быть разделены на индивидуальные конъюгаты.

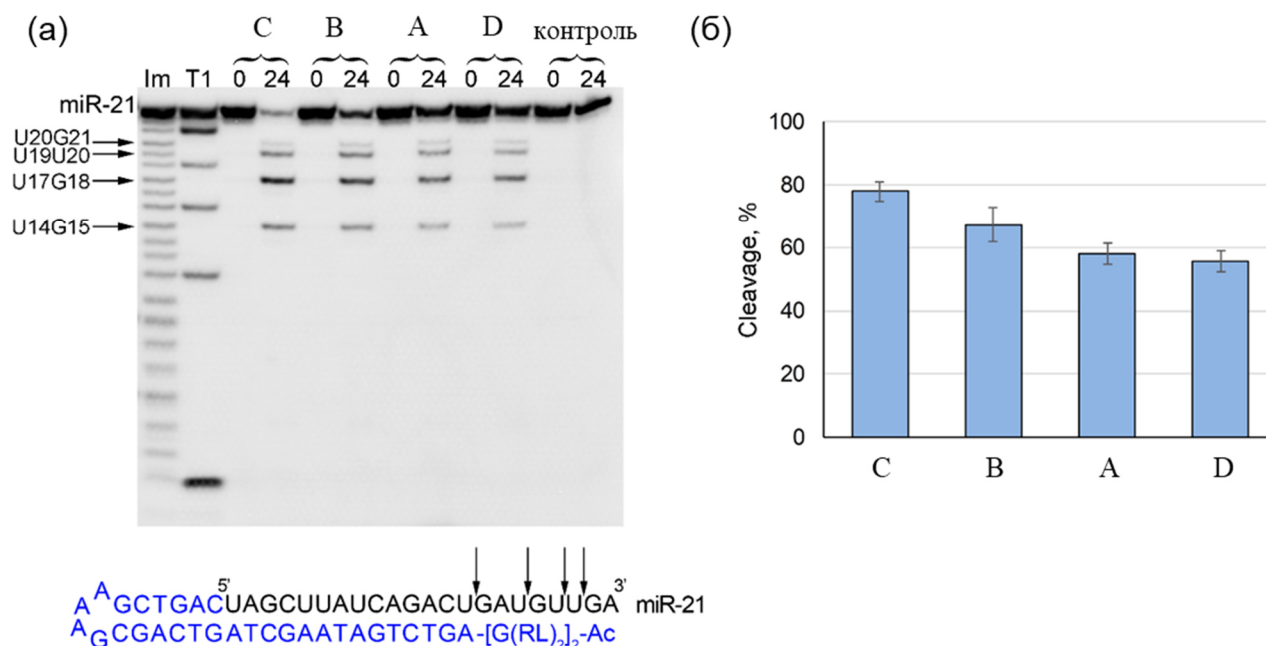


Рис. 21. Анализ расщепления 5'-[³²P]-miR-21 с помощью ОПК, полученных с использованием различных протоколов синтеза. (а) Электрофоретический анализ (пункт 2.2.7 в), показывающий продукты расщепления 5'-[³²P]-miR-21 (пункт 2.3.10). Дорожки Im и T1, соответственно, статистический гидролиз 5'-[³²P]-miR-21 в 2 М имидазоле (пункт 2.3.11 а) и частичное расщепление РНК РНКазой T1 (пункт 2.3.11 б). Контроль – 5'-[³²P]-miR-21, инкубированная в отсутствие ОПК в течение 0 и 72 ч. Типы конъюгатов и время инкубации указаны в верхней части геля. (б) Диаграмма степени расщепления (для трёх независимых повторов) 5'-[³²P]-miR-21 от способа получения конъюгата

Полученные расхождения в эффективности расщепления в зависимости от степени протекания побочной реакции, побудили нас исследовать продукты ацилирования азотистых оснований как отдельные ОПК.

3.2.3 Исследование побочной реакции ацилирования азотистых оснований

Несмотря на распространенность метода активированных эфиров [62–64] для синтеза олигонуклеотид-пептидных конъюгатов в литературе практически отсутствуют систематические исследования конкурентных реакций ацилирования экзоциклических аминогрупп азотистых оснований пептидными молекулами. При этом (по аналогии с синтезом ОПК) в ряде исследований по получению пролекарств для *N*⁴-ацилирования цитидина и его производных используют те же активирующие агенты на основе карбодиимидов (DCC, EDCI) [65–67] и

урониево/аминиевых солей (НВТУ) [68], что позволяет предположить возможность протекания данной побочной реакции при синтезе ОПК.

На примере модельных олигонуклеотидов T₅A, T₅G, T₅C, T₆, отличающихся одним нуклеотидом, мы попытались определить азотистые основания, по которым идёт присоединение пептидного фрагмента в условиях формирования ОПК. После проведения реакции по протоколу В₂ видно (рис. 22), что ацилирование пептидом происходит только по цитидиновому нуклеозиду в составе олигонуклеотида, в соответствии с литературными данными [65–68].

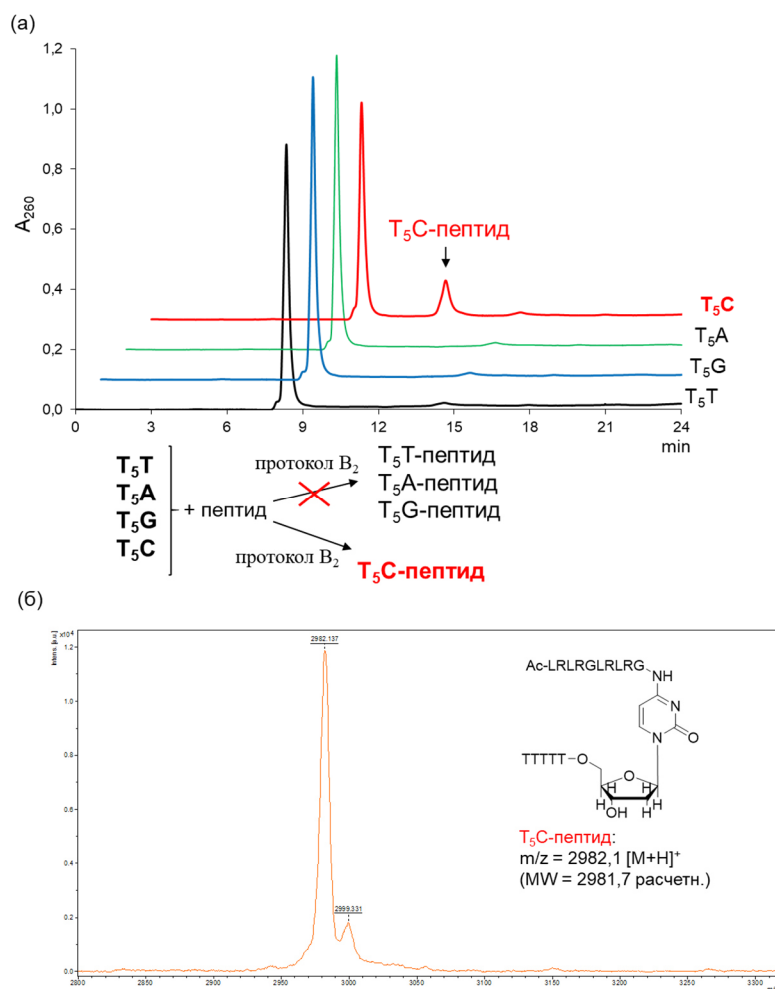


Рис. 22 а) офВЭЖХ анализ (пункт 2.2.6 в, градиент III) реакционных смесей ОПК, полученных с использованием протокола В₂ (Таблица 3) для олигонуклеотидов T₅A, T₅G, T₅C, T₆. б) Результат MALDI-TOF-MS-анализа для хроматографически выделенного конъюгата с T₅C

Таким образом по совокупности экспериментальных и литературных данных можно утверждать, что продуктами конкурентного присоединения пептидных фрагментов являются продукты *N*⁴-ацилирования цитидина. Для более полного исследования свойств описываемых побочных продуктов по аналогии с 5'-аминомодифицированным 16-звенным олигонуклеотидом, несущим в своём составе 3 цитидиновых звена (5'-NH₂-16nt) был синтезирован его 5'-немодифицированный аналог (Таблица 1, 16nt), а для контролируемого присоединения

пептидных молекул были получены олигонуклеотиды, содержащие замены С/Т таким образом, чтобы в составе олигонуклеотидов присутствовал только один остаток цитидина (Таблица 1, 16C3, 16C11, 16C15). Для контроля при синтезе ОПК была выбрана последовательность, не содержащая цитидин (Таблица 1, 16C0). В качестве активирующего агента целенаправленно был выбран более активный (в сравнении с DCC) агент HATU с целью снижения концентрационных избытков пептида. Таким образом, с использованием последовательностей олигодезоксирибонуклеотидов, представленных в Таблице 1, был получен ряд олигонуклеотид-пептидных конъюгатов. Для олигонуклеотида 16nt наряду с конъюгатами, содержащими один остаток пептида на одну молекулу олигонуклеотида (рис. 23а, б, Conj mono) наблюдали продукты, имеющие меньшую электрофоретическую подвижность и большее время удерживания на офВЭЖХ (рис. 23а, Conj multi) и предположительно содержащие два или три пептидных остатка. В ряде случаев такие конъюгаты можно выделить в количестве достаточном для анализа (рис. 23б, дор. 3). Для всех рассмотренных олигонуклеотидов монопептидные продукты были электрофоретически выделены и охарактеризованы (в качестве примера на рис. 23в, г приведены масс-спектры конъюгатов с 16nt и 16C11).

Таблица 8. Конверсия реакции N^4 -ацилирования цитидина в составе олигонуклеотидов пептидом Ac-[(LR)₂G]₂ в условиях синтеза ОПК (Таблица 3, протокол В₂)

ON	Конверсия реакции присоединения, % ^a
16nt	42 (общий) ^б
16C0	0
16C3	29 ^c
16C11	19 ^c
16C15	20 ^c

^a рассчитана по офВЭЖХ профилю реакционной смеси, полученной в ходе реакции соответствующего олигонуклеотида с пептидом Ac-[(LR)₂G]₂ по протоколу В₂ (Таблица 3)

^б по офВЭЖХ профилю, включая только моноконъюгаты

Эффективности присоединения пептида по экзоциклическим аминогруппам цитидина в условиях формирования ОПК представлены в Таблице 8 и определены по хроматографическим профилям реакционных смесей (рис. 23а). Для последовательности 16nt определена общая конверсия статистического присоединения одной молекулы пептида на одну молекулу олигонуклеотида без учёта мультимерных конъюгатов. Согласно хроматографическим данным (рис. 23а) не наблюдается зависимость степени конверсии от нуклеотидного окружения и положения остатка цитидина в цепи олигонуклеотида. Видно, что величина конверсии для олигонуклеотида 16nt не аддитивна конверсиям для олигонуклеотидов 16C3, 16C11 и 16C15.

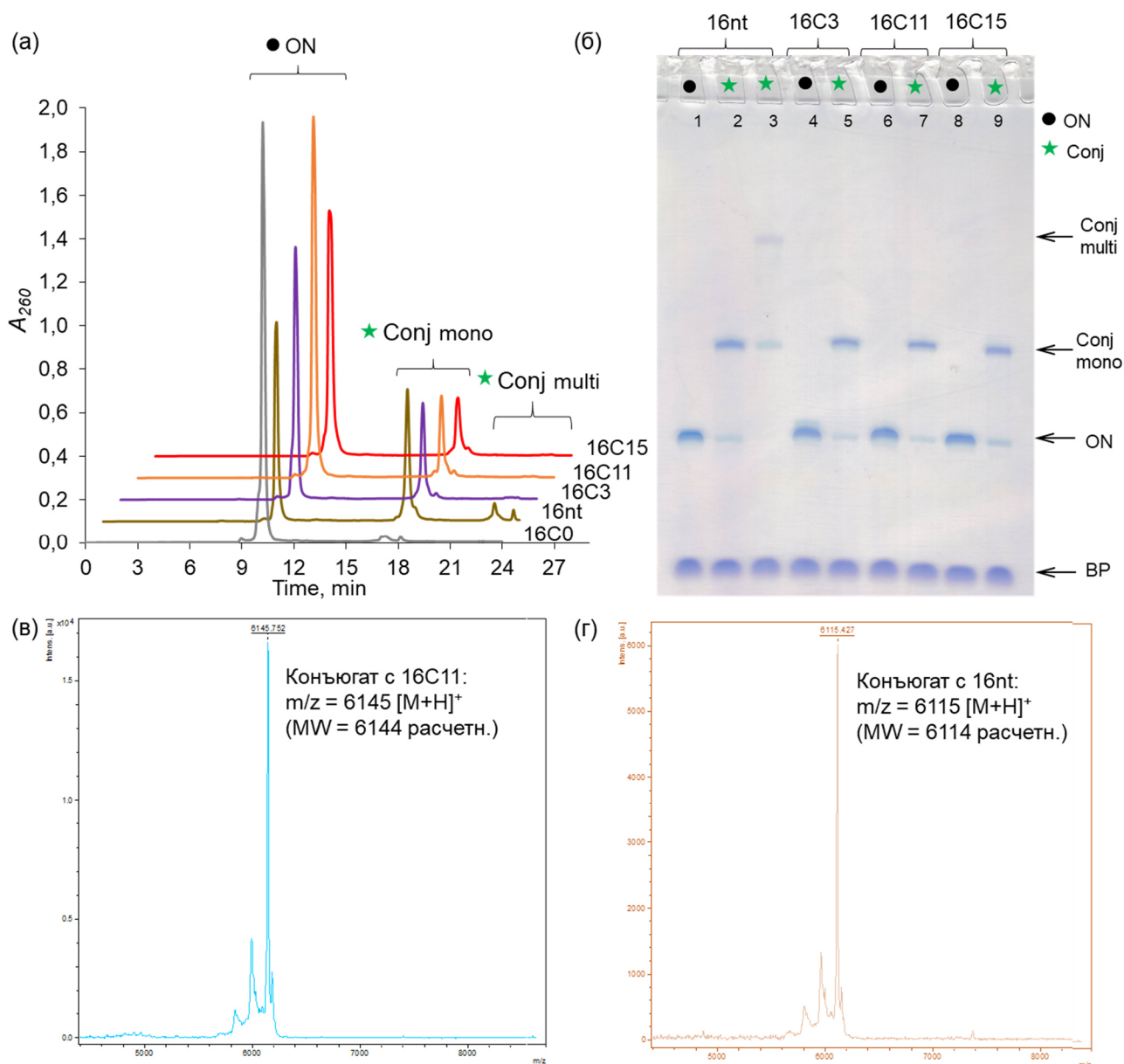


Рис. 23. Анализ степени присоединения пептида в ходе N^4 -ацилирования цитидина с использованием протокола B₂; (а) офВЭЖХ-анализ (пункт 2.2.6 в, градиент III) продуктов реакционных смесей пептидных конъюгатов незащищенных олигонуклеотидов, содержащих цитидин в разных количестве и положениях; (б) электрофоретический анализ (пункт 2.2.7 а) очищенных олигонуклеотидов и соответствующих конъюгатов с пептидом (BP – бромфеноловый синий); (в) MALDI-TOF спектр очищенного конъюгата 16C11; (г) MALDI-TOF спектр очищенного конъюгата 16nt

При оценке гомогенности выделенных фракций конъюгатов методом гель-электрофореза (рис. 23б, дорожки 2, 5, 7, 9) наряду с полосой, соответствующей моно-конъюгату, во всех образцах присутствовала полоса, соответствующая исходному олигонуклеотиду, что можно объяснить его регенерацией, вероятно протекающей при элюции олигонуклеотидного материала из ПААГ в буферных условиях (pH 8.3) после электрофоретического разделения.

3.2.3.1 Анализ способности конъюгатов, полученных через N^4 -ацилирование цитидина, формировать комплексы с РНК-мишенью и их РНК-расщепляющая активность

Влияние остатка пептида в составе конъюгата на способность последних образовывать комплементарный комплекс с РНК была исследована методом задержки в геле в условиях, использованных в работе [12] и близких к физиологическим (пункт 2.3.12). Эти же условия были затем использованы для исследования РНК-расщепляющей активности конъюгатов (пункт 2.3.10). Предварительно мы оценили энергию комплексообразования всех комплексов, не содержащих остаток пептида. Согласно расчётным данным (по IDT DNA OligoAnalyzer) введение двух нуклеотидных несоответствий G/T в комплементарный комплекс 16-звенного олигонуклеотида с микроРНК-21 приводит к снижению $\Delta\Delta G$ до значений в диапазоне от -9 ккал/моль до -15 ккал/моль в зависимости от взаимного расположения несоответствий, что свидетельствует о значительной дестабилизации комплекса. Наши данные подтверждают дестабилизирующий эффект двух нуклеотидных несоответствий вплоть до полного отсутствия комплексообразования с исходным олигонуклеотидом (рис. 24, дор. 4, 6, 8).

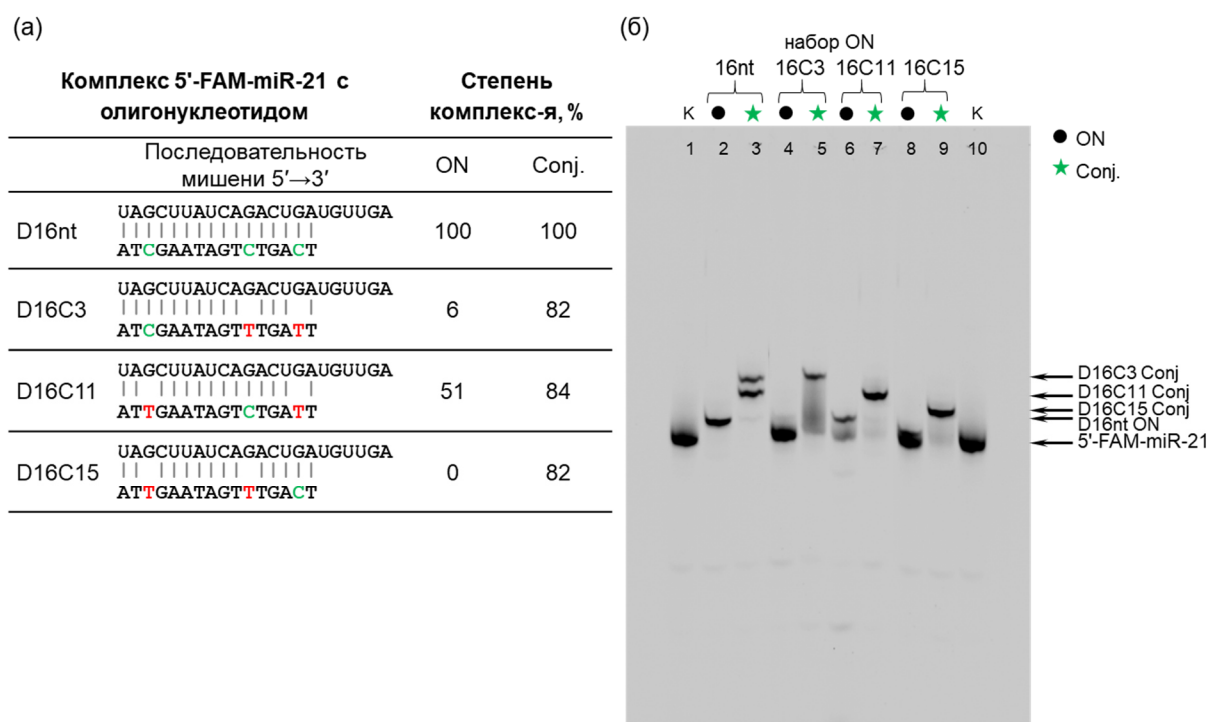


Рис. 24. Анализ формирования комплексов 5'-FAM-miR-21 с полностью и частично комплементарными олигонуклеотидами и их ОПК; (а) структура комплексов и степень комплексообразования (зеленым цветом – обозначено возможное место присоединения пептида, красным – однонуклеотидное несоответствие G/T); (б) электрофореграмма (пункт 2.2.7 г) разделения комплексов, образованных 5'-FAM-miR-21 с нативными олигонуклеотидами (дор. 2, 4, 6, 8) или с их пептидными конъюгатами (дор. 3, 5, 7, 9). Дор. 1 и 10 – контроль (5'-FAM-miR-21)

Известно, что присутствие в составе несовершенного комплекса положительно-заряженного пептида увеличивает степень комплексообразования с мишенью [45, 69]. Это же событие мы наблюдали при анализе комплексов РНК-мишени с конъюгатами всех трех олигонуклеотидов 16C3, 16C11 и 16C15 в условиях нативного гель-электрофореза (пункт 2.2.7 г). Видно (рис. 24б, дор. 5, 7, 9), что подвижность в геле зависит от места присоединения пептида. Это свидетельствует о структурных/конформационных различиях комплексов РНК-мишени с конъюгатами 16C3, 16C11 и 16C15 и в нашем случае может вполне достоверно определить положение присоединения пептидного фрагмента в цепи олигонуклеотида 16nt, содержащего уже три остатка цитидина. Мы получили, что в составе конъюгата с 16nt преобладает конъюгат с 16C11 (~57%), на долю конъюгата с 16C3 приходится порядка 38% и лишь 4% на конъюгат с 16C15. Несоответствие процентного состава конъюгата 16nt значениям конверсий для конъюгатов с 16C3, 16C11, 16C15 может дополнительно свидетельствовать о случайном характере присоединения пептидного фрагмента по цитидинам в последовательности олигонуклеотида.

Для ранее описанного конъюгата 5'NH₂-16nt была показана РНК-расщепляющая активность преимущественно в одноцепочечной области микроРНК-21 [12, 70]. По этой причине при рассмотрении расщепляющей активности конъюгатов, полученных через *N*⁴-ацилирование цитидина, стоило ожидать расщепления только конъюгатом с 16C15, поскольку пептид расположен в непосредственной близости к одноцепочечному участку. Однако в результате инкубации 5'-FAM-miR-21 в присутствии исследуемых конъюгатов не было получено значимой степени расщепления за 24 ч (рис. 25) вне зависимости от расположения пептидного фрагмента в цепи олигонуклеотида. Это говорит о том, что полученные рассматриваемые нецелевые конъюгаты, по сути, не являются реакционноспособными производными, а их возможное присутствие в составе хроматографически/электрофоретически-неразделяемого конъюгата может привести к некорректной активности целевого ОПК.



Рис. 25. Электрофореграмма (пункт 2.2.7 в) разделения продуктов расщепления 5'-FAM-miR-21 пептидными конъюгатами олигонуклеотидов 16nt, 16C3, 16C11, 16C15. Дор. 1, 2 – контроль (5'-FAM-miR-21); дор. 3, 4 – (5'-FAM-miR-21 + 16nt-Conj); дор. 5 – гидролиз 5'-FAM-miR-21 в 2 М имидазоле (пункт 2.3.11 а); дор. 6 – гидролиз 5'-FAM-miR-21 в присутствии РНКазы T1 (пункт 2.3.11 б); дор. 7, 8 - (5'-FAM-miR-21 + 16C3-Conj); дор. 9, 10 - (5'-FAM-miR-21 + 16C11-Conj); дор. 11, 12 - (5'-FAM-miR-21 + 16C15-Conj). Время инкубации в часах указано сверху

3.2.3.2 Исследование стабильности амидной связи в составе конъюгатов, полученных через N^4 -ацилирование цитидина

Поскольку отсутствие целевой активности у конъюгатов, полученных через N^4 -ацилирование цитидина, а также их способность усиливать некомплементарные взаимодействия может существенно влиять на расщепление РНК-мишени, возникает потребность в контролируемом синтезе 5'-концевых конъюгатов, не содержащих в своём составе продуктов N^4 -ацилирования цитидина. Частичная деструкция нецелевых конъюгатов с регенерацией исходного олигонуклеотида (рис. 23б, дорожки 2, 5, 7, 9) в условиях элюции из ПААГ говорит о нестабильности амидной связи между пептидом и азотистым основанием уже при слабощелочных значениях pH. Структурно пептид, присоединенный по экзоциклической аминогруппе цитидина, схож с защитными группами, используемыми в ходе автоматического олигонуклеотидного синтеза, которые, в свою очередь, удаляют в щелочных условиях при обработке, в частности, концентрированным водным аммиаком [38, 71]. В связи с этим в схему синтеза 5'-концевых конъюгатов было предложено добавить дополнительную стадию щелочного гидролиза в растворе концентрированного водного аммиака. Для конъюгатов олигонуклеотидов 16nt и 5'-NH₂-16nt было показано, что короткой обработки аммиаком (55°C, 30 мин) достаточно для полного удаления продуктов N^4 -ацилирования цитидина, при этом в случае 16nt (рис. 26а) наблюдается полная регенерация исходного олигонуклеотида, а для 5'-NH₂-16nt из общей

конверсии конъюгации в 67% (рис. 26б) на долю нецелевых конъюгатов приходится 43%. Схематическая хроматограмма, иллюстрирующая перераспределение олигонуклеотидного материала при обработке аммиаком реакционной смеси ОПК, содержащей нецелевые продукты, представлена на рис. 26в).

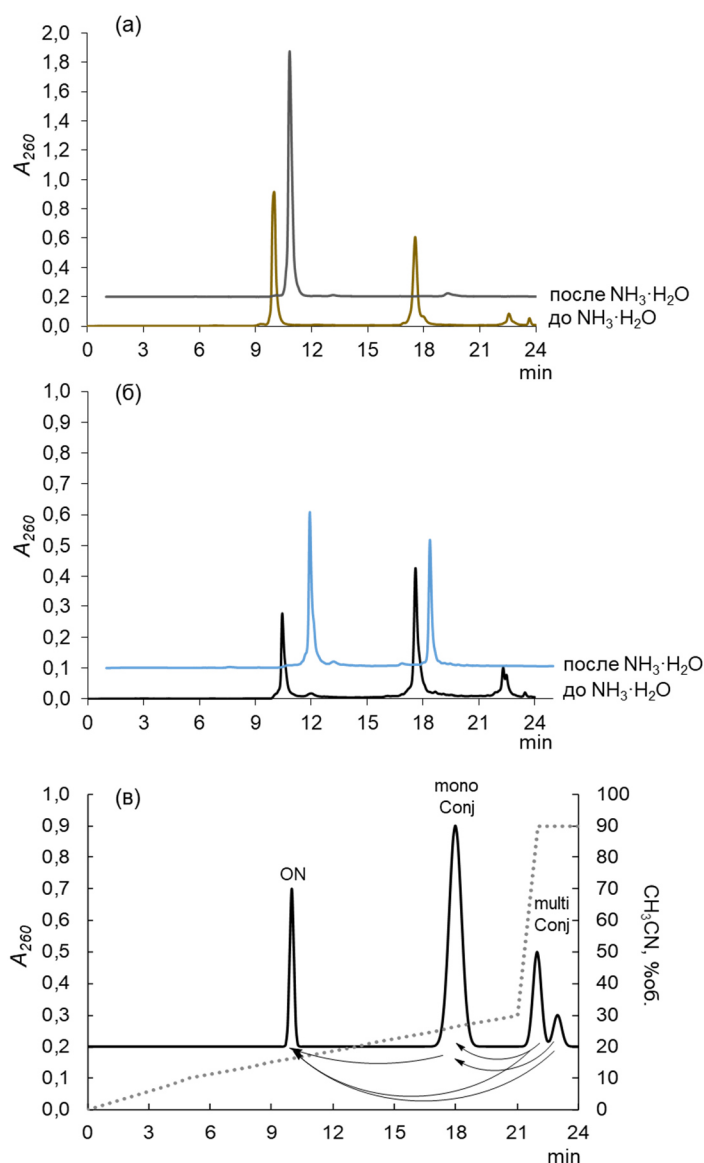


Рис. 26. Удаление продуктов N^4 -ацилирования цитидина из смеси ОПК: (а) офВЭЖХ-анализ (пункт 2.2.6 в, градиент III) реакционных смесей конъюгатов для олигонуклеотида 16nt до (коричневая линия) и после (серая линия) обработки концентрированным водным аммиаком в течение 30 мин при 55°C; (б) офВЭЖХ-анализ (пункт 2.2.6 в, градиент III) реакционных смесей конъюгатов для олигонуклеотида 5'-NH₂-16nt до (черная линия) и после (синяя линия) обработки концентрированным водным аммиаком в течение 30 мин при 55°C; (в) схематическая хроматограмма, иллюстрирующая перераспределение олигонуклеотидного материала при обработке аммиаком реакционной смеси ОПК, содержащей нецелевые конъюгаты

3.3 Перспективы продолжения исследований

В контексте разработки рутинного синтеза Р-NH₂-аналогов олигодезоксирибонуклеотидов по-прежнему требуется более точное установление причин неполной конверсии на каждом шаге окисления по Штаудингеру. При достижении высоких выходов бис- и более модифицированных Р-NH₂-аналогов с использованием разработанного подхода будут открыты возможности планомерного исследования данного класса модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов.

Синтез РНК-расщепляющих олигонуклеотид-пептидных конъюгатов требует масштабирования протоколов с возможностью наработки полупрепаративных количеств с целью *in vivo* исследований. Также перспективным является синтез пептидных конъюгатов модифицированных по углеводо-фосфатному остову (в том числе Р-NH₂-аналоги) олигонуклеотидного фрагмента с использованием оптимизированных протоколов, для исследования синергетического эффекта модификаций в составе олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, в настоящее время в литературе такого рода исследования представлены лишь редкими примерами [72–74].

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе описан новый подход к синтезу олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих одну или несколько *N*-незамещенных амидофосфатных $P-NH_2$ -модификаций, основанный на использовании 9-(флуоренил)-метоксикарбонилзида (FmocN₃) в рамках реакции окисления P(III) по классической реакции Штаудингера. Основное преимущество разрабатываемого синтетического подхода – его совместимость с протоколом автоматического твердофазного амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов, основанного на использовании стандартных защитных групп и линкеров на поверхности CPG-носителя. На данный момент, не удалось осуществить высокоэффективный синтез электронейтральных, изоструктурных фосфодиэфирному остатку, производных олигонуклеотидов. При этом предложены условия к получению любых мономодифицированных олигодезоксирибонуклеотидов (с выходами ~80%). Это дало возможность детально описать влияние модификации на комплексообразование ($-P(V)-NH_2-$)-содержащих производных с ДНКматрицей с точки зрения термодинамических свойств. Важным аспектом исследования стал тот факт, что амидофосфатная группа, находясь внутри олигонуклеотидной цепи, по-видимому, имеет возможность формировать неканонические водородные связи, влияя тем самым на распределение структурных форм свободного олигомера и/или его дуплексной формы. При этом такие неканонические взаимодействия с участием Н-донорного ($-P(V)-NH_2-$)-остатка не во всех случаях могут содействовать стабилизации комплементарных комплексов ДНК. Кроме того, электронейтральность $P-NH_2$ -группы оказывается обоснованно значимым параметром, определяющим перспективность использования соответствующих изоструктурных аналогов нативных олигонуклеотидов в молекулярно-биологических исследованиях. Значимость экспериментально наблюдаемых эффектов, достигаемых при использовании *N*-незамещенных амидофосфатных производных олигонуклеотидов, очевидно, должна возрастать со снижением ионной силы буферной среды, т.е. в условиях роста значимости электростатических взаимодействий биомолекул. В таких условиях $P-NH_2$ -модификация даже может способствовать формированию ДНК-дуплексов.

Также работе представлена оптимизированная методология синтеза олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, проявляющих рибонуклеазную активность, основанная на методе активированных эфиров. Рационализированный синтетический подход обладает рядом ключевых преимуществ: (1) совместимость с водными реакционными средами; (2) работа в условиях умеренной температуры с минимально-возможным избытком пептида и активирующих реагентов; (3) достижение высокой конъюгации, превышающей 90%. Путем систематической оптимизации молярного соотношения пептида к EDCI и оценки состава растворителя, в

частности содержания ДМСО в реакционной смеси, мы установили оптимальные параметры синтеза для получения ОПК с помощью химии EDCI/NHS. Кроме того, мы демонстрируем высокую эффективность конъюгации, опосредованной HATU, что обеспечивает основу для адаптации к платформам твердофазного синтеза. Важно отметить, что предложенные протоколы синтеза не оказывают критического влияния на рибонуклеазную активность получаемых конъюгатов, которая остается сопоставимой с активностью конъюгатов, полученных с использованием ранее описанных методов. Однако в ходе оптимизации протоколов была выявлена принципиальная возможность протекания конкурентной реакции N^4 -ацилирования цитидина. Продукты N^4 -ацилирования цитидина в значительной степени стабильны при физиологических условиях, выдерживают хроматографическую и электрофоретическую очистку. Олигонуклеотид-пептидные конъюгаты такого строения не проявляют собственной РНК-расщепляющей активности, однако стабилизируют комплексообразование как с полностью комплементарной, так и с несовершенной мишенью, что может обеспечивать не специфическое связывание при изучении биологического действия исследуемых ОПК. Предложен простой способ удаления продуктов N^4 -ацилирования цитидина из смеси с целевым конъюгатом с помощью короткой обработки концентрированным водным аммиаком при нагревании. При выборе стратегии синтеза олигонуклеотид-пептидных конъюгатов следует учитывать возможность образования лабильных в щелочных условиях N^4 -ацилированных (пептидных) производных цитидина, способных вызывать неспецифическое связывание мишени, но не проявляющих целевую активность.

5. ВЫВОДЫ

1. Предложен новый метод синтеза олигодезоксирибонуклеотидов с *N*-незамещенными амидофосфатными (P-NH₂) модификациями, основанный на использовании Fmoc-азида в реакции Штаудингера. Показано, что:

- предложенный вариант полностью совместим со стандартным автоматическим твердофазным амидофосфитным протоколом синтеза олигонуклеотидов;
- эффективность введения модификации на один синтетический цикл составляет 80% и не зависит от нуклеотидного окружения модифицированного звена.

2. Изучены термодинамические свойства P-NH₂-содержащих олигонуклеотидов. Продемонстрирована:

- тенденция к стабилизации их комплементарных комплексов с ДНК-матрицей по сравнению нативными олигонуклеотидами;
- слабая зависимость термодинамического эффекта от места расположения и нуклеотидного окружения модифицированного звена.

3. Проведено сравнение протоколов синтеза олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, проявляющих РНК-расщепляющую активность, использующих активирующие агенты на основе карбодиимидов (*N,N'*-дициклогексилкарбодиимид, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид) и урониево/аминиевой соли (гексафторфосфат азабензотриазолтетраметилуроний):

- определены оптимальные соотношения компонентов реакционной смеси, обеспечивающих высокую (свыше 90%) конверсию в целевой конъюгат;
- показано образование лабильных в щелочных условиях N⁴-ацилированных (пептидных) производных цитидина, в виде моно- и мультимерных конъюгатов (нецелевые конъюгаты);
- установлено, что нецелевые моноконъюгаты стабилизируют комплексообразование как с полностью комплементарной, так и с несовершенной РНК-мишенью.

4. При изучении РНК-расщепляющей активности олигонуклеотид-пептидных конъюгатов продемонстрировано, что:

- степень расщепления РНК-мишени смесью моноконъюгатов составляет от 55% до 78% (за 24 ч) и зависит от количества нецелевых конъюгатов в этой смеси;
- нецелевые конъюгаты не проявляют собственную РНК-расщепляющую активность.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Земцов, Д. С., Есимбекова, А. Р., Зинченко, И. С., Рукша, Т. Г. Антисмысловые олигонуклеотиды в онкологии: перспективы и ограничения использования в клинической практике // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2021. – Vol. 10. – N. 4. – P. 59–65.
2. Петров, А. А., Лебедев, В. Н., Сизикова, Т. Е., Плеханова, Т. М., Борисевич, С. В. Анализ применения антисмысловых олигонуклеотидов для профилактики и лечения опасных и особо опасных вирусных инфекционных заболеваний // Антибиотики и химиотерапия. – 2019. – Vol. 64. – N. 7–8. – P. 56–62.
3. Crooke, S. T. Antisense: Progress toward Gene-Directed Cancer Therapy // *Encycl. Cancer.* – 2002. – P. 127–134.
4. Iannitti, T., Morales-Medina, J., Palmieri, B. Phosphorothioate Oligonucleotides: Effectiveness and Toxicity // *Curr. Drug Targets.* – 2014. – Vol. 15. – N. 7. – P. 663–673.
5. Duffy, K., Arangundy-Franklin, S., Holliger, P. Modified nucleic acids: replication, evolution, and next-generation therapeutics // *BMC Biol.* – 2020. – Vol. 18. – N. 1. – P. 112.
6. Clavé, G., Reverte, M., Vasseur, J.-J., Smietana, M. Modified internucleoside linkages for nuclease-resistant oligonucleotides // *RSC Chem. Biol.* – 2021. – Vol. 2. – N. 1. – P. 94–150.
7. Benizri, S., Gissot, A., Martin, A., Vialet, B., Grinstaff, M. W., Barthélémy, P. Bioconjugated Oligonucleotides: Recent Developments and Therapeutic Applications // *Bioconjug. Chem.* – 2019. – Vol. 30. – N. 2. – P. 366–383.
8. Мещанинова, М. И., Пышная, И. А., Пышный, Д. В. Рациональный синтез конъюгатов олигонуклеотидов с функциональными молекулами: от простых подходов к комплексным стратегиям // *Успехи химии.* – 2026. – Vol. 95. – N. 4. – P. RCR5207.
9. Winkler, J. Oligonucleotide Conjugates for Therapeutic Applications // *Ther. Deliv.* – 2013. – Vol. 4. – N. 7. – P. 791–809.
10. Peyrottes, S., Vasseur, J. J., Imbach, J. L., Rayner, B. Replacement of the phosphodiester backbone of oligodeoxynucleotide analogues by non-ionic phosphoramidate (P-NH₂) // *Nucleosides and Nucleotides.* – 1997. – Vol. 16. – N. 7–9. – P. 1551–1554.
11. Peyrottes, S. Oligodeoxynucleoside phosphoramidates (P-NH₂): synthesis and thermal stability of duplexes with DNA and RNA targets // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – Vol. 24. – N. 10. – P. 1841–1848.
12. Patutina, O. A., Bichenkova, E. V., Miroshnichenko, S. K., Mironova, N. L., Trivoluzzi, L. T., Burusco, K. K., Bryce, R. A., Vlassov, V. V., Zenkova, M. A. miRNases: Novel peptide-oligonucleotide bioconjugates that silence miR-21 in lymphosarcoma cells // *Biomaterials.* – 2017. – Vol. 122. – P. 163–178.
13. Staroseletz, Y., Gaponova, S., Patutina, O., Bichenkova, E., Amirloo, B., Heyman, T., Chiglintseva, D., Zenkova, M. Site-Selective Artificial Ribonucleases: Renaissance of Oligonucleotide Conjugates for Irreversible Cleavage of RNA Sequences. // *Molecules.* – 2021. – Vol. 26. – N. 6. – P. 1732.
14. Liang, X.-H., Sun, H., Nichols, J. G., Crooke, S. T. RNase H1-Dependent Antisense Oligonucleotides Are Robustly Active in Directing RNA Cleavage in Both the Cytoplasm and the Nucleus // *Mol. Ther.* – 2017. – Vol. 25. – N. 9. – P. 2075–2092.
15. Преч, Э., Бюльманн, Ф., Аффольтер, К. Определение строения органических соединений. Таблицы спектральных данных / Преч, Э., Бюльманн, Ф., Аффольтер, К. – Мир: Москва, 2006.
16. Cavaluzzi, M. J., Borer, P. N. Revised UV extinction coefficients for nucleoside-5'-monophosphates and unpaired DNA and RNA // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – N. 1. – P. 1–9.
17. Cegielska, B., Kacprzak, K. M. Simple and convenient protocol for staining of organic azides on TLC plates by ninhydrin. A new application of an old reagent // *Chem. Analityczna.* – 2009. – Vol. 54. – N. 4. – P. 807–812.
18. Sikora, K., Neubauer, D., Jaśkiewicz, M., Kamysz, W. Citropin 1.1 Trifluoroacetate to

- Chloride Counter-Ion Exchange in HCl-Saturated Organic Solutions: An Alternative Approach // *Int. J. Pept. Res. Ther.* – 2018. – Vol. 24. – N. 2. – P. 265–270.
19. Dourtoglou, V., Ziegler, J.-C., Gross, B. L'hexafluorophosphate de O-benzotriazolyl-N,N-tetramethyluronium: Un reactif de couplage peptidique nouveau et efficace // *Tetrahedron Lett.* – 1978. – Vol. 19. – N. 15. – P. 1269–1272.
 20. Viladkar, S. M. Guanine rich oligonucleotide–amino acid/peptide conjugates: preparation and characterization // *Tetrahedron.* – 2002. – Vol. 58. – N. 3. – P. 495–502.
 21. Froehler, B. C. Deoxynucleoside H-Phosphonate diester intermediates in the synthesis of internucleotide phosphate analogues // *Tetrahedron Lett.* – 1986. – Vol. 27. – N. 46. – P. 5575–5578.
 22. Peyrottes, S., Vasseur, J. J., Imbach, J. L., Rayner, B. Dramatic effect of the anomeric configuration on the thermal stability of duplex formed between novel dodecathymidine phosphoramidate (P-NH₂) and complementary DNA and RNA strands // *Tetrahedron Lett.* – 1996. – Vol. 37. – N. 33. – P. 5869–5872.
 23. Devlin, T., Iyer, R. P., Johnson, S., Agrawal, S. Mixed backbone oligonucleotides containing internucleotidic primary phosphoramidate linkages // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 1996. – Vol. 6. – N. 22. – P. 2663–2668.
 24. Iyer, R. P., Devlin, T., Habus, I., Yu, D., Johnson, S., Agrawal, S. Oligonucleoside phosphoramidates from N-pent-4-enoyl nucleoside H-phosphonates // *Tetrahedron Lett.* – 1996. – Vol. 37. – N. 10. – P. 1543–1546.
 25. Iyer, R. P., Yu, D., Devlin, T., Ho, N.-H., Johnson, S., Agrawal, S. Synthesis, Biophysical Properties, and Stability Studies of Mixed Backbone Oligonucleotides Containing Novel Non-Ionic Linkages // *Nucleosides and Nucleotides.* – 1997. – Vol. 16. – N. 7–9. – P. 1491–1495.
 26. Laurent, A., Debart, F., Rayner, B. A new route to oligodeoxynucleoside phosphoramidates (P-NH₂) // *Tetrahedron Lett.* – 1997. – Vol. 38. – N. 30. – P. 5285–5288.
 27. Стеценко, Д. А., Купрюшкин, М. С., Пышный, Д. В. Производные олигонуклеотидов, содержащие одну или более модифицированных фосфатных групп, и способ их получения // 2014.
 28. Paul, S., Roy, S., Monfregola, L., Shang, S., Shoemaker, R., Caruthers, M. H. Oxidative Substitution of Boranephosphonate Diesters as a Route to Post-synthetically Modified DNA // *J. Am. Chem. Soc.* – 2015. – Vol. 137. – N. 9. – P. 3253–3264.
 29. Kupryushkin, M. S., Pyshnyi, D. V., Stetsenko, D. A. Phosphoryl Guanidines: A New Type of Nucleic Acid Analogues // *Acta Naturae.* – 2014. – Vol. 6. – N. 4. – P. 116–118.
 30. 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. Methyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2019. – Vol. 116. – N. 4. – P. 1229–1234.
 31. Kupryushkin, M. S., Zharkov, T. D., Ilina, E. S., Markov, O. V., Kochetkova, A. S., Akhmetova, M. M., Lomzov, A. A., Pyshnyi, D. V., Lavrik, O. I., Khodyreva, S. N. Triazinylamidophosphate Oligonucleotides: Synthesis and Study of Their Interaction with Cells and DNA-Binding Proteins // *Russ. J. Bioorganic Chem.* – 2021. – Vol. 47. – N. 3. – P. 719–733.
 32. Vasilyeva, S. V., Baranovskaya, E. E., Dyudeeva, E. S., Lomzov, A. A., Pyshnyi, D. V. Synthesis of Oligonucleotides Carrying Inter-nucleotide N -(Benzoazole)-phosphoramidate Moieties // *ACS Omega.* – 2023. – Vol. 8. – N. 1. – P. 1556–1566.
 33. Carpino, L. A., Han, G. Y. The 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group // *J. Org. Chem.* – 1972. – Vol. 37. – N. 22. – P. 3404–3409.
 34. 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.
 35. Jiménez, E. I., Gibard, C., Krishnamurthy, R. Prebiotic Phosphorylation and Concomitant Oligomerization of Deoxynucleosides to form DNA // *Angew. Chemie Int. Ed.* – 2021. – Vol. 60. – N. 19. – P. 10775–10783.

36. Preobrazhenskaya, N. N. Reactions of Phosphoramidic Acids // *Russ. Chem. Rev.* – 1972. – Vol. 41. – N. 1. – P. 54–65.
37. Stetsenko, D., Pyshnyi, D., Kupryushkin, M. Modified oligonucleotides and methods for their synthesis // 2016. – P. 106.
38. Johnsson, R. A., Bogojeski, J. J., Damha, M. J. An evaluation of selective deprotection conditions for the synthesis of RNA on a light labile solid support // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2014. – Vol. 24. – N. 9. – P. 2146–2149.
39. Gololobov, Y. G., Zhmurova, I. N., Kasukhin, L. F. Sixty years of staudinger reaction // *Tetrahedron.* – 1981. – Vol. 37. – N. 3. – P. 437–472.
40. Jones, A. S. Synthetic analogues of nucleic acids — a review // *Int. J. Biol. Macromol.* – 1979. – Vol. 1. – N. 5. – P. 194–207.
41. Boal, J. H., Wilk, A., Harindranath, N., Max, E. E., Kempe, T., Beaucage, S. L. Cleavage of Oligodeoxyribonucleotides from Controlled-Pore Glass Supports and Their Rapid Deprotection by Gaseous Amines // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – Vol. 24. – N. 15. – P. 3115–3117.
42. Kuznetsov, N. A., Kupryushkin, M. S., Abramova, T. V., Kuznetsova, A. A., Miroshnikova, A. D., Stetsenko, D. A., Pyshnyi, D. V., Fedorova, O. S. New oligonucleotide derivatives as unreactive substrate analogues and potential inhibitors of human apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 // *Mol. Biosyst.* – 2016. – Vol. 12. – N. 1. – P. 67–75.
43. 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.
44. Pyshnyi, D. V., Lomzov, A. A., Pyshnaya, I. A., Ivanova, E. M. Hybridization of the bridged oligonucleotides with dna: Thermodynamic and kinetic studies // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2006. – Vol. 23. – N. 5. – P. 567–579.
45. Пышный, Д. В., Репкова, М. Н., Лохов, С. Г., Иванова, Е. М., Венъяминова, А. Г., Зарытова, В. Ф. Искусственные рибонуклеазы I. Направленное расщепление РНК 5-пептидилолигодезоксирибонуклеотидами, содержащими остатки аргинина и лейцина // *Биоорганическая химия.* – 1997. – Vol. 23. – N. 6. – P. 497–504.
46. Чиглинцева, Д. А. МикроРНК-направленные олигонуклеотид-пептидные конъюгаты (миРНКазы): каталитические свойства и противоопухолевая активность // 2026.
47. Eisele, F., Owen, D. J., Waldmann, H. Peptide Conjugates as Tools for the Study of Biological Signal Transduction // *Bioorg. Med. Chem.* – 1999. – Vol. 7. – N. 2. – P. 193–224.
48. Mironova, N. L., Pyshnyi, D. V., Ivanova, E. M., Zarytova, V. F., Zenkova, M. A., Gross, H. J., Vlassov, V. V. Sequence-specific RNA cleavage by oligonucleotide-peptide conjugates // *Russ. Chem. Bull.* – 2002. – Vol. 51. – N. 7. – P. 1177–1186.
49. Williams, A., Staroseletz, Y., Zenkova, M. A., Jeannin, L., Aojula, H., Bichenkova, E. V. Peptidyl-Oligonucleotide Conjugates Demonstrate Efficient Cleavage of RNA in a Sequence-Specific Manner // *Bioconjug. Chem.* – 2015. – Vol. 26. – P. 1129–1143.
50. Staroseletz, Y., Amirloo, B., Williams, A., Lomzov, A., Burusco, K. K., Clarke, D. J., Brown, T., Zenkova, M. A., Bichenkova, E. V. Strict conformational demands of RNA cleavage in bulge-loops created by peptidyl-oligonucleotide conjugates // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – Vol. 48. – P. 10662–10679.
51. Patutina, O., Chiglintseva, D., Amirloo, B., Clarke, D., Gaponova, S., Vlassov, V., Bichenkova, E., Zenkova, M. Bulge-Forming miRNases Cleave Oncogenic miRNAs at the Central Loop Region in a Sequence-Specific Manner // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23. – N. 12. – P. 6562.
52. Carpino, L. A., Imazumi, H., El-Faham, A., Ferrer, F. J., Zhang, C., Lee, Y., Foxman, B. M., Henklein, P., Hanay, C., Mügge, C., Wenschuh, H., Klose, J., Beyermann, M., Bienert, M. The Uronium/Guanidinium Peptide Coupling Reagents: Finally the True Uronium Salts // *Angew. Chemie Int. Ed.* – 2002. – Vol. 41. – N. 3. – P. 441–445.
53. Totaro, K. A., Liao, X., Bhattacharya, K., Finneman, J. I., Sperry, J. B., Massa, M. A., Thorn, J., Ho, S. V., Pentelute, B. L. Systematic Investigation of EDC/sNHS-Mediated Bioconjugation Reactions for Carboxylated Peptide Substrates // *Bioconjug. Chem.* – 2016. – Vol. 27. – N. 4. – P. 994–

1004.

54. Bestas, B., Estupiñán, H. Y., Wang, Q., Kharazi, S., He, C., K. Mohammad, D., Gupta, D., Wiklander, O. P. B., Lehto, T., Lundin, K. E., Berglöf, A., Karlsson, M. C. I., Abendroth, F., El Andaloussi, S., Gait, M. J., Wood, M. J. A., Leumann, C. J., Stetsenko, D. A., Månsson, R., Wengel, J., Zain, R., Smith, C. I. E. Cell-penetrating peptide-conjugated, splice-switching oligonucleotides mitigate the phenotype in BTK / Tec double deficient X-linked agammaglobulinemia model // *RSC Chem. Biol.* – 2025. – Vol. 6. – N. 5. – P. 761–771.
55. Zubin, E. M., Romanova, E. A., Volkov, E. M., Tashlitsky, V. N., Korshunova, G. A., Shabarova, Z. A., Oretskaya, T. S. Oligonucleotide-peptide conjugates as potential antisense agents // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 456. – N. 1. – P. 59–62.
56. Jirka, S. M. G., 't Hoen, P. A. C., Diaz Parillas, V., Tanganyika-de Winter, C. L., Verheul, R. C., Aguilera, B., de Visser, P. C., Aartsma-Rus, A. M. Cyclic Peptides to Improve Delivery and Exon Skipping of Antisense Oligonucleotides in a Mouse Model for Duchenne Muscular Dystrophy // *Mol. Ther.* – 2018. – Vol. 26. – N. 1. – P. 132–147.
57. Jakubke, H.-D., Jeschkeit, H. Amino acids, peptides, and proteins : an introduction / Jakubke, H.-D., Jeschkeit, H. – Wiley, 1977.
58. Vrettos, E. I., Sayyad, N., Mavrogiannaki, E. M., Stylos, E., Kostagianni, A. D., Papas, S., Mavromoustakos, T., Theodorou, V., Tzakos, A. G. Unveiling and tackling guanidinium peptide coupling reagent side reactions towards the development of peptide-drug conjugates // *RSC Adv.* – 2017. – Vol. 7. – N. 80. – P. 50519–50526.
59. Marchán, V., Rodríguez-Tanty, C., Estrada, M., Pedroso, E., Grandas, A. Alternative Procedures for the Synthesis of Methionine-Containing Peptide–Oligonucleotide Hybrids // *European J. Org. Chem.* – 2000. – Vol. 2000. – N. 13. – P. 2495–2500.
60. Gilles, M. A., Hudson, A. Q., Borders, C. L. Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution // *Anal. Biochem.* – 1990. – Vol. 184. – N. 2. – P. 244–248.
61. Raman, B. Nomega-arginine dimethylation modulates the interaction between a Gly/Arg-rich peptide from human nucleolin and nucleic acids // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol. 29. – N. 16. – P. 3377–3384.
62. Tung, C.-H., Stein, S. Preparation and Applications of Peptide–Oligonucleotide Conjugates // *Bioconj. Chem.* – 2000. – Vol. 11. – N. 5. – P. 605–618.
63. Klabenkova, K., Fokina, A., Stetsenko, D. Chemistry of Peptide–Oligonucleotide Conjugates: A Review // *Molecules.* – 2021. – Vol. 26. – N. 17. – P. 5420.
64. Malinowska, A. L., Huynh, H. L., Bose, S. Peptide–Oligonucleotide Conjugation: Chemistry and Therapeutic Applications // *Curr. Issues Mol. Biol.* – 2024. – Vol. 46. – N. 10. – P. 11031–11047.
65. Jakubovska, J., Tauraitė, D., Birštonas, L., Meškys, R. N 4-acyl-2'-deoxycytidine-5'-triphosphates for the enzymatic synthesis of modified DNA // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – Vol. 46. – N. 12. – P. 5911–5923.
66. Zhen, L., Dai, L., Wen, X., Yao, L., Jin, X., Yang, X.-W., Zhao, W., Yu, S.-Q., Yuan, H., Wang, G., Sun, H. Discovery of Novel Nucleotide Prodrugs with Improved Potency Against HCV Variants Carrying NS5B S282T Mutation // *J. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 60. – N. 14. – P. 6077–6088.
67. Pulido, J., Sobczak, A. J., Balzarini, J., Wnuk, S. F. Synthesis and Cytostatic Evaluation of 4-N-Alkanoyl and 4-N-Alkyl Gemcitabine Analogues // *J. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 57. – N. 1. – P. 191–203.
68. Couvreur, P., Stella, B., Reddy, L. H., Hillaireau, H., Dubernet, C., Desmaële, D., Lepître-Mouelhi, S., Rocco, F., Dereuddre-Bosquet, N., Clayette, P., Rosilio, V., Marsaud, V., Renoir, J.-M., Cattel, L. Squalenoyl Nanomedicines as Potential Therapeutics // *Nano Lett.* – 2006. – Vol. 6. – N. 11. – P. 2544–2548.
69. Pyshnyi, D., Repkova, M., Lokhov, S., Ivanova, E., Venyaminova, A., Zarytova, V. Oligonucleotide–Peptide Conjugates for RNA Cleavage // *Nucleosides and Nucleotides.* – 1997. – Vol. 16. – N. 7–9. – P. 1571–1574.
70. Chiglintseva, D., Clarke, D. J., Sen'kova, A., Heyman, T., Miroshnichenko, S., Shan, F., Vlassov, V., Zenkova, M., Patutina, O., Bichenkova, E. Engineering supramolecular dynamics of self-

assembly and turnover of oncogenic microRNAs to drive their synergistic destruction in tumor models // *Biomaterials*. – 2024. – Vol. 309. – P. 122604.

71. Sonveaux, E. Protecting Groups in Oligonucleotide Synthesis // *Methods Mol. Biol.* – 1994. – Vol. 26. – P. 1–71.

72. Engelhardt, D., Nordberg, P., Knerr, L., Malins, L. R. Accessing Therapeutically-Relevant Multifunctional Antisense Oligonucleotide Conjugates Using Native Chemical Ligation // *Angew. Chemie Int. Ed.* – 2024. – Vol. 63. – N. 49.

73. Bestas, B., Estupiñán, H. Y., Wang, Q., Kharazi, S., He, C., K. Mohammad, D., Gupta, D., Wiklander, O. P. B., Lehto, T., Lundin, K. E., Berglöf, A., Karlsson, M. C. I., Abendroth, F., El Andaloussi, S., Gait, M. J., Wood, M. J. A., Leumann, C. J., Stetsenko, D. A., Månsson, R., Wengel, J., Zain, R., Smith, C. I. E. Cell-penetrating peptide-conjugated, splice-switching oligonucleotides mitigate the phenotype in BTK / Tec double deficient X-linked agammaglobulinemia model // *RSC Chem. Biol.* – 2025. – Vol. 6. – N. 5. – P. 761–771.

74. Jirka, S. M. G., 't Hoen, P. A. C., Diaz Parillas, V., Tanganyika-de Winter, C. L., Verheul, R. C., Aguilera, B., de Visser, P. C., Aartsma-Rus, A. M. Cyclic Peptides to Improve Delivery and Exon Skipping of Antisense Oligonucleotides in a Mouse Model for Duchenne Muscular Dystrophy // *Mol. Ther.* – 2018. – Vol. 26. – N. 1. – P. 132–147.



Отчет о проверке

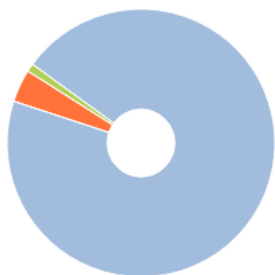
Автор: Мирошниченко Светлана Константиновна

Проверяющий: Мирошниченко Светлана Константиновна

Название документа: Научный доклад_Козырева_wg

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ

Тариф: FULL



Совпадения:
3,94%



Оригинальность:
95,68%



ИИ-контент:
0%



Цитирования:
0,38%



Самоцитирования:
0%



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

Проверено: 97,6% текста документа, исключено из проверки: 2,4% текста документа. Разделы и элементы, отключенные пользователем: Библиография, Таблицы

- 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: 5

Тип документа: Не указано

Дата проверки: 07.09.2026 12:08:56

Дата корректировки: 07.09.2026 12:50:49

Количество страниц: 59

Символов в тексте: 109015

Слов в тексте: 13232

Число предложений: 1267

Комментарий: не указано

ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да

Выполнено распознавание текста (OCR): Нет

Выполнена проверка с учетом структуры: Да

Разделы и элементы, отключенные пользователем: Библиография, Таблицы

Модули поиска: Сводная коллекция ЭБС, Цитирование, Профессиональная лексика. Медицина, Рувики, IEEE, Переводные заимствования, Переводные заимствования по Коллекции открытых публикаций международных издательств, Перефразирования по коллекции IEEE, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Перефразирования по Коллекции открытых публикаций международных издательств, Профессиональная лексика. АПК и биотех, ИПС Адилет, Коллекция открытых публикаций международных издательств, Коллекция INVENTORUS, Перефразирования по базе публикаций открытого доступа PubMed, СПС ГАРАНТ: аналитика, Медицина, Коллекция НБУ, Шаблонные фразы, СМИ России и СНГ, Сводная коллекция научных работ Беларуси, Профессиональная лексика. Юриспруденция, PubMed, Публикации eLIBRARY, Кольцо вузов, Публикации РГБ (переводы и перефразирования), Публикации РГБ, Патенты СССР, РФ, СНГ, Переводные заимствования IEEE, Переводные заимствования по базе публикаций открытого доступа PubMed, Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования), Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Кольцо вузов (переводы и перефразирования), Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Интернет Плюс Онлайн

ИСТОЧНИКИ

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	34,6%	0%	Адаптация протокола автоматич... http://elibrary.ru	01 Янв 2024	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[02]	29,96%	0%	Адаптация протокола автоматич... http://elibrary.ru	01 Янв 2024	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Другое. Формулировка взята из публикации автора данной ВКР
[03]	3,52%	3,52%	Диплом_Малова_EА	19 Мая 2022	Кольцо вузов	
[04]	3,21%	0%	Диплом_Малова_EА	19 Мая 2022	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[05]	2,02%	0%	Биоорганическая химия. Т. 47, Н... https://sciencejournals.ru	04 Фев 2025	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[06]	1,85%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	16 Фев 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[07]	1,85%	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.
[08]	1,84%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	25 Фев 2025	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[09]	1,82%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	16 Фев 2024	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[10]	1,82%	0%	исследование свойств частично ... http://niboch.nsc.ru	03 Ноя 2023	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[11]	1,82%	0%	исследование свойств частично ... http://niboch.nsc.ru	03 Ноя 2023	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[12]	1,77%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	25 Фев 2025	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[13]	1,75%	0%	Дюдеева, Евгения Сергеевна Исс... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2022	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[14]	1,6%	0%	Диплом аспиранта Данилин Н.А.	11 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[15]	1,57%	0%	https://new.ras.ru/upload/iblock/5... https://new.ras.ru	23 Фев 2025	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.

[16]	1,55%	0%	Дюдеева, Евгения Сергеевна Исс... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2022	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[17]	1,39%	0%	gaponova_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	09 Окт 2024	ПЕРЕФРАЗИРОВАННЫЕ ЗАИМСТВОВАНИЯ ПО КОЛЛЕКЦИИ ИНТЕРНЕТ В РУССКОМ СЕКТОРЕ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[18]	1,34%	0%	%D0%BD%D0%B0%D1%83%D1%8... http://niboch.nsc.ru	28 Фев 2025	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[19]	1,31%	0%	krasheninina_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	26 Май 2021	ПЕРЕФРАЗИРОВАННЫЕ ЗАИМСТВОВАНИЯ ПО КОЛЛЕКЦИИ ИНТЕРНЕТ В РУССКОМ СЕКТОРЕ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[20]	1,28%	0%	Протазанова ВРР	06 Июн 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[21]	1,26%	0%	МахаловаКИ Антиплагиат	31 Май 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[22]	1,25%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	10 Фев 2025	ПЕРЕФРАЗИРОВАННЫЕ ЗАИМСТВОВАНИЯ ПО КОЛЛЕКЦИИ ИНТЕРНЕТ В РУССКОМ СЕКТОРЕ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[23]	1,22%	0%	Диплом-Ляпин_Павел	06 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[24]	1,17%	0%	gaponova_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	14 Сен 2024	ПЕРЕФРАЗИРОВАННЫЕ ЗАИМСТВОВАНИЯ ПО КОЛЛЕКЦИИ ИНТЕРНЕТ В РУССКОМ СЕКТОРЕ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[25]	1,07%	0%	Диплом-Ляпин_Павел	06 Июн 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[26]	1,05%	0%	Гапонова, Светлана Константино... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2020	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[27]	1%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	24 Фев 2025	ПЕРЕФРАЗИРОВАННЫЕ ЗАИМСТВОВАНИЯ ПО КОЛЛЕКЦИИ ИНТЕРНЕТ В РУССКОМ СЕКТОРЕ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[28]	0,88%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/f... http://niboch.nsc.ru	04 Фев 2025	ПЕРЕФРАЗИРОВАННЫЕ ЗАИМСТВОВАНИЯ ПО КОЛЛЕКЦИИ ИНТЕРНЕТ В РУССКОМ СЕКТОРЕ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	0,88%	0%	Жарков, Тимофей Дмитриевич Ра... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2026	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[30]	0,79%	0%	krasheninina_dissert.pdf http://niboch.nsc.ru	02 Ноя 2024	ПЕРЕФРАЗИРОВАННЫЕ ЗАИМСТВОВАНИЯ ПО КОЛЛЕКЦИИ ИНТЕРНЕТ В РУССКОМ СЕКТОРЕ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[31]	0,75%	0%	Чиглинцева, Дарья Александров... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2026	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[32]	0,7%	0%	СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ФОСФОРИЛ... http://elibrary.ru	01 Янв 2025	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	0,64%	0%	Чиглинцева, Дарья Александров... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2026	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[34]	0,63%	0%	https://vak.gisnauka.ru/adverts-list... https://vak.gisnauka.ru	23 Апр 2026	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[35]	0,6%	0%	ГИБРИДИЗАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ... http://elibrary.ru	05 Сен 2012	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[36]	0,6%	0%	диплом-2020-06-07	07 Июн 2020	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Нет переводных заимствований из источника.
[37]	0,56%	0%	BGRSSB_2024_Abstracts.pdf https://bgrssb.icgbio.ru	05 Апр 2026	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	0,55%	0%	https://www.rjbc.online/_files/ugd/... https://rjbc.online	09 Мая 2026	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[39]	0,52%	0%	МахаловаКИ Антиплагиат	31 Май 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[40]	0,52%	0%	ASSOCIATION OF SNP &i>CYP2... https://platform.inventorus.ru	13 Июл 2022	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,51%	0%	Ляпин_Диплом_18.05.2026	18 Мая 2026	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[42]	0,51%	0%	Perspektivnye materialy s ierarkhic... https://platform.inventorus.ru	01 Ноя 2018	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[43]	0,49%	0%	Epigenetic «probes» for lung cance... https://platform.inventorus.ru	03 Июл 2015	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[44]	0,49%	0%	Induction of tyrosine aminotransfe... https://platform.inventorus.ru	03 Июл 2015	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	0,49%	0%	Бобрикова Е.Н. диплом на антип...	31 Мая 2020	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	0,48%	0%	Чиглинцева Дарья_диплом	21 Мая 2021	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[47]	0,47%	0%	Миронова, Надежда Львовна Кат... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2003	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[48]	0,46%	0%	Протазанова ВКР	06 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[49]	0,45%	0%	не указано	11 Мар 2026	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	0,42%	0%	диплом_Жуков	11 Июн 2020	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	0,42%	0,42%	https://repozitorij.pmf.unizg.hr/isla... https://repozitorij.pmf.unizg.hr	28 Дек 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	
[52]	0,4%	0%	Выбор олигонуклеотидов, селект... http://elibrary.ru	04 Мая 2017	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[53]	0,4%	0%	elibrary_44768843_29497659_218-... https://rjbc.online	04 Мар 2025	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[54]	0,38%	0,38%	не указано	21 Мар 2026	Цитирование	
[55]	0,36%	0%	SBB_2022.pdf https://pure.nsu.ru	03 Ноя 2023	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	0,35%	0%	Проблемы синтеза олигонуклеот... http://elibrary.ru	01 Янв 2021	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[57]	0,33%	0%	?j=molrus&y=2021&v=55&n=2&a=... https://sciencejournals.ru	08 Мая 2025	Интернет Плюс Онлайн	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	0,29%	0%	Метастатический гормончувстви... http://elibrary.ru	01 Янв 2025	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,29%	0%	Алемасов, Николай Александров... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2018	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	0,29%	0%	ПОЛУЧЕНИЕ ТРИАЗИНИЛАМИДО... http://elibrary.ru	01 Янв 2025	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,27%	0%	Time course of fluorescent-labelled... https://openalex.org	03 Июн 2024	Коллекция открытых публикаций международных издательств	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	0,27%	0%	Малова Е. А._ИХБФМ_История соз...	11 Янв 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	0,27%	0%	Рекомбинантная плазмидная ДН... https://fips.ru	25 Мар 2026	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0,27%	0%	ДНК-аптамер, специфично связы... https://fips.ru	25 Мар 2026	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	0,27%	0%	Способ детекции специфических ... http://findpatent.ru	24 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,27%	0%	Модифицированная направляю... https://fips.ru	01 Апр 2026	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0,24%	0%	Чиглинцева Дарья_диплом	21 Мая 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0,24%	0%	A linear-time algorithm for reconstr... https://openalex.org	01 Дек 2012	Переводные заимствования по Коллекции открытых публикаций международных издательств	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[69]	0,24%	0%	A linear-time algorithm for reconstr... https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov	07 Дек 2012	Переводные заимствования по базе публикаций открытого доступа PubMed	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[70]	0,24%	0%	Молекулярная биология. 2017. Т. ... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[71]	0,19%	0%	Мещанинова, Мария Ивановна О... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2009	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[72]	0,17%	0%	Effect of Reduced Graphene Oxide ... https://ieeexplore.ieee.org	05 Сен 2023	Переводные заимствования IEEE	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[73]	0,17%	0%	Exploring the Most Promising Stem... https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov	01 Дек 2019	Переводные заимствования по базе публикаций открытого доступа PubMed	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[74]	0,17%	0%	?j=molrus&y=2023&v=57&n=2&a=... https://sciencejournals.ru	13 Июн 2025	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[75]	0,15%	0%	https://europepmc.org/backend/pt... https://europepmc.org	04 Фев 2025	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[76]	0,13%	0%	Сенина, Анастасия Михайловна ... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2024	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[77]	0,13%	0%	Диплом аспиранта Данилин Н.А.	11 Июн 2024	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[78]	0,13%	0%	не указано https://openalex.org	26 Дек 2023	Коллекция открытых публикаций международных издательств	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[79]	0,13%	0%	ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТ... https://platform.inventorus.ru	26 Дек 2023	Коллекция INVENTORUS	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[80]	0,12%	0%	Биологический микрочип, содер... https://fips.ru	25 Мар 2026	Патенты СССР, РФ, СНГ	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[81]	0,09%	0%	Мутационный и кинетический ан... http://elibrary.ru	01 Янв 2021	Публикации eLIBRARY	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ им. Д. Г. Кнорре СИБИРСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчёт о проверке текста научно-квалификационной работы на
объём заимствования

Козырева Евгения Андреевна

«Нуклеазоустойчивые олигонуклеотиды с модифицированным
сахарофосфатным остовом и их пептидные конъюгаты: новые подходы к
синтезу и изучение их свойств»

Оригинальность работы составляет 95.68%, 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