

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ  
им. Д. Г. КНОРРЕ

*На правах рукописи*

**Мещанинова Мария Ивановна**

**Подходы к твердофазному синтезу конъюгатов олигорибонуклеотидов и  
их структурных аналогов как эффективных инструментов  
молекулярно-биологических исследований**

1.4.9 – биоорганическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ на соискание ученой степени  
доктора химических наук

Научный консультант:  
д.х.н., член-корр. РАН  
Пышный Дмитрий Владимирович

Новосибирск

2026

## Содержание

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Список сокращений и терминов (в алфавитном порядке) .....                                                                                                                                                                                                                                                        | 6   |
| Структура и объем диссертации .....                                                                                                                                                                                                                                                                              | 10  |
| ВВЕДЕНИЕ .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 11  |
| Актуальность проблемы .....                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 11  |
| Цель и задачи исследования.....                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 16  |
| Научная новизна и практическая значимость работы .....                                                                                                                                                                                                                                                           | 16  |
| Основные положения, выносимые на защиту .....                                                                                                                                                                                                                                                                    | 18  |
| Публикации и апробация работы .....                                                                                                                                                                                                                                                                              | 19  |
| Личный вклад автора .....                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 19  |
| Глава 1. Подходы к получению конъюгатов олигонуклеотидов с биоактивными (функциональными) молекулами (Обзор литературы).....                                                                                                                                                                                     | 21  |
| 1.1 Концепции синтеза конъюгатов олигонуклеотид-функциональная молекула....                                                                                                                                                                                                                                      | 26  |
| 1.1.1 Пресинтетический подход - функционализация олигонуклеотидной цепи с помощью готовых (коммерчески доступных и lab-made) модификаторов .....                                                                                                                                                                 | 27  |
| 1.1.2. Постсинтетический подход - комплексные стратегии получения функционализированных олигонуклеотидов .....                                                                                                                                                                                                   | 37  |
| 1.1.2.1. Сочетание алкил-NH <sub>2</sub> /карбоксильная группа.....                                                                                                                                                                                                                                              | 39  |
| 1.1.2.2. Сочетание алкил-NH <sub>2</sub> /гидроксильная группа .....                                                                                                                                                                                                                                             | 48  |
| 1.1.2.3. Сочетание алкин/азид .....                                                                                                                                                                                                                                                                              | 49  |
| 1.1.2.4. Сочетание алкил-NH <sub>2</sub> /фосфат .....                                                                                                                                                                                                                                                           | 56  |
| 1.1.2.5. Сочетание азид/фосфит .....                                                                                                                                                                                                                                                                             | 60  |
| 1.1.2.5. Сочетания альдегид/алкил-NH <sub>2</sub> или альдегид/гидразид .....                                                                                                                                                                                                                                    | 62  |
| 1.1.2.7. Сочетания тиол/малеимид, тиол/тиол или тиол/галогенид .....                                                                                                                                                                                                                                             | 68  |
| 1.1.2.8. Сочетания галоген/алкил-NH <sub>2</sub> или галоген/алкин .....                                                                                                                                                                                                                                         | 73  |
| 1.2. Заключение.....                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 77  |
| Глава 2. 5'-Конъюгаты олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов с биологически активными соединениями - основа моно- и мульти-функциональных НК-конструкций с сочетанием нужных характеристик как высокоселективных инструментов для молекулярно-биологических исследований (Результаты и обсуждение) ..... | 79  |
| 2.1. Разработка протоколов синтеза олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов средней длины и протоколов синтеза нативных и модифицированных протяженных олигорибонуклеотидов .....                                                                                                                          | 82  |
| 2.2. Разработка подхода к твердофазному синтезу 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с адресующими функциональными молекулами, основанного на сочетании методов Н-фосфонатной и фосфитамидной химии .....                                                                                                              | 91  |
| 2.3. Разработка твердофазного варианта синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с адресующими функциональными молекулами, введенными посредством кислотолабильной гидразоновой связи .....                                                                                                                         | 99  |
| 2.4. Разработка подхода к твердофазному синтезу 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с остатками функциональных молекул различной природы с использованием N,N'-дисукцинимидилкарбоната как активирующего агента .....                                                                                                 | 111 |
| 2.5. Разработка твердофазного варианта синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с биоактивными функциональными молекулами, введенными посредством кислотолабильной фосфамидной (P-N) связи .....                                                                                                                   | 122 |
| 2.6. Использование НК и/или их производных и конъюгатов, полученных по разработанным протоколам и подходам, в целях фундаментальной науки другими научными группами .....                                                                                                                                        | 132 |
| Глава 3. Материалы и методы исследований (Экспериментальная часть).....                                                                                                                                                                                                                                          | 137 |

|                                                                                                                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1. Исходные материалы .....                                                                                                                                                                                       | 137 |
| 3.2. Основные методы работы .....                                                                                                                                                                                   | 138 |
| 3.2.1. Тонкослойная и адсорбционная хроматография .....                                                                                                                                                             | 139 |
| 3.2.2. Частичное или полное деблокирование олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов .....                                                                                                                      | 139 |
| 3.2.2.1. Удаление щелочелабильных защитных групп и отделение олигонуклеотидов от носителя .....                                                                                                                     | 139 |
| 3.2.2.2. Удаление 2'- <i>O</i> -трет-бутилдиметилсилильных защитных групп .....                                                                                                                                     | 141 |
| 3.2.2.3. Удаление 5'-концевой ацетальной защитной группы с полностью деблокированного олигонуклеотида .....                                                                                                         | 141 |
| 3.2.2.4. Удаление 5'-концевой ацетальной защитной группы с полностью защищенного носитель-связанного олигонуклеотида .....                                                                                          | 142 |
| 3.2.2.5. Удаление защитных групп с межнуклеозидных и 5'-концевого фосфатов с полностью защищенного носитель-связанного олигонуклеотида .....                                                                        | 142 |
| 3.2.3. Получение олигонуклеотидов в форме цетилтриметиламмониевой соли .....                                                                                                                                        | 142 |
| 3.2.4. Аналитическая ВЭЖХ .....                                                                                                                                                                                     | 142 |
| 3.2.5. Аналитический гель-электрофорез олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов в ПААГ в денатурирующих условиях .....                                                                                         | 143 |
| 3.2.6. Выделение препаративным гель-электрофорезом олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов в ПААГ в денатурирующих условиях .....                                                                             | 143 |
| 3.2.7. Выделение липофильных конъюгатов олигонуклеотидов ОФ ВЭЖХ .....                                                                                                                                              | 144 |
| 3.2.8. Аналитический гель-электрофорез олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов в ПААГ в нативных условиях .....                                                                                               | 144 |
| 3.2.9. Расчет выхода на шаг синтетического цикла .....                                                                                                                                                              | 145 |
| 3.2.10. Определение общего выхода олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов в расчете на первое нуклеозидное звено .....                                                                                        | 145 |
| 3.2.11. Расчет выхода на стадию .....                                                                                                                                                                               | 145 |
| 3.2.12. Расчет содержания целевого олигонуклеотида в полученных реакционных смесях .....                                                                                                                            | 145 |
| 3.3. Методики эксперимента .....                                                                                                                                                                                    | 146 |
| 3.3.1. Синтез органических соединений .....                                                                                                                                                                         | 146 |
| 3.3.1.1. Синтез Н-фосфонатов липофильных соединений .....                                                                                                                                                           | 146 |
| 3.3.1.1.1. Производные холестерина, содержащие остатки аминспиртов .....                                                                                                                                            | 146 |
| 3.3.1.1.2. Производные литохолевой кислоты (3 $\alpha$ -гидрокси-5 $\beta$ -холан-24-овой кислоты), содержащие остатки аминспиртов .....                                                                            | 147 |
| 3.3.1.1.3. Олеиламид литохолевой кислоты (цис-N-(октадец-9-енил)-3 $\alpha$ -гидрокси-5 $\beta$ -холан-24-амида) и его производные, содержащие остатки аминспиртов .....                                            | 148 |
| 3.3.1.1.4. Производные $\alpha$ -токоферола (5,7,8-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-ола), содержащие остатки аминспиртов .....                                                                    | 150 |
| 3.3.1.1.5. Синтез Н-фосфонатов липофильных соединений (2.2.2.I-2.2.2.XV) .....                                                                                                                                      | 151 |
| 3.3.1.1.6. Проверка реакционной способности Н-фосфонатов липофильных соединений (2.2.2.I-2.2.2.XV) .....                                                                                                            | 153 |
| 3.3.1.2. Синтез гидразидов N-(холестерилоксикарбонил)-6-аминогексановой кислоты (2.3.VII) и 6-[2,5,7,6-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-илокси-карбонил]-аминогексановой кислоты (2.3.VIII) ..... | 153 |
| 3.3.1.3. Синтез транспортных лигандов, содержащих первичную аминогруппу .....                                                                                                                                       | 156 |
| 3.3.1.4. Синтез активированных бензотриазольных производных 4-метоксибензойной, фолиевой и глицирретиновой кислот .....                                                                                             | 158 |
| 3.3.2. Твердофазный фосфитамидный синтез олигонуклеотидов различных типов и их производных длиной до 100 и более звеньев .....                                                                                      | 159 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3.3. Синтез и исследование свойств 5'-липофильных конъюгатов олигонуклеотидов, полученных исходя из носитель-связанных олигонуклеотидов и Н-фосфонатов липофильных соединений .....                                                                               | 162 |
| 3.3.3.1. Оптимизация условий твердофазного синтеза 5'-липофильных конъюгатов олигонуклеотидов .....                                                                                                                                                                 | 163 |
| 3.3.3.2. Твердофазный синтез 5'-липофильных конъюгатов олигонуклеотидов .....                                                                                                                                                                                       | 163 |
| 3.3.3.3. Формирование дуплексов siРНК .....                                                                                                                                                                                                                         | 163 |
| 3.3.3.4. Определение температуры плавления siРНК .....                                                                                                                                                                                                              | 164 |
| 3.3.4. Твердофазный синтез и исследование свойств 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с липофильными функциональными молекулами, введенными посредством кислотолабильной гидразоновой связи .....                                                                        | 164 |
| 3.3.4.1. Оптимизация условий твердофазного синтеза олигонуклеотидных липофильных конъюгатов, содержащих -NH-N=CH- фрагмент .....                                                                                                                                    | 165 |
| 3.3.4.2. Твердофазный синтез липофильных конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих кислотолабильную -NH-N=CH- связь и ее восстановленный рН-независимый (-NH-NH-CH <sub>2</sub> -) аналог .....                                                                       | 166 |
| 3.3.4.3. Исследование стабильности гидразонсодержащих 5'-липофильных конъюгатов анти-MDR1 siРНК .....                                                                                                                                                               | 166 |
| 3.3.5. Разработка твердофазного подхода к созданию 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с функциональными молекулами различной природы с использованием N,N'-дисукцинимидилкарбоната как активирующего агента .....                                                       | 167 |
| 3.3.5.1. Оптимизация условий твердофазного синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с аминокислотными функциональными молекулами с использованием N,N'-дисукцинимидилкарбоната как активирующего агента .....                                                         | 168 |
| 3.3.5.2. Твердофазный синтез 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с функциональными молекулами различной природы .....                                                                                                                                                    | 168 |
| 3.3.5.2.1. Твердофазный синтез 5'-конъюгатов олигонуклеотидов исходя из носитель-связанного защищенного олигонуклеотида и аминокислотных функциональных молекул различной природы .....                                                                             | 169 |
| 3.3.5.2.2. Твердофазный синтез 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, основанный на последовательном введении остатка диамина и активированной органической кислоты.....                                                                                                   | 170 |
| 3.3.5.2.2.1. Подбор оптимальных условий удаления бутилоксикарбонильной защитной группы с остатка моно-N-трет-бутилоксикарбонил-1,6-диаминогексана, введенного на 5'-конец защищенного носитель-связанного олигонуклеотида dT <sub>6</sub> .....                     | 171 |
| 3.3.5.2.2.2. Удаление трет-бутилоксикарбонильной защитной группы с остатка моно-N-трет-бутилоксикарбонил-1,6-диаминогексана, введенного на 5'-конец защищенного носитель-связанного олигонуклеотида.....                                                            | 171 |
| 3.3.5.2.2.3. Оптимизация условий твердофазного синтеза конъюгатов олигонуклеотидов на примере модельного 5'-аминомодифицированного носитель-связанного защищенного олигонуклеотида dT <sub>6</sub> с 4-метоксибензойной, фолиевой и глицирретиновой кислотами ..... | 172 |
| 3.3.5.2.2.4. Твердофазный синтез 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с 4-метоксибензойной, фолиевой и глицирретиновой кислотами .....                                                                                                                                    | 172 |
| 3.3.6. Твердофазный синтез и исследование свойств 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с низкомолекулярными функциональными молекулами, введенными посредством кислотолабильной фосфамидной связи.....                                                                    | 173 |
| 3.3.6.1. Оптимизация условий твердофазного синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих кислотолабильную Р-N-связь .....                                                                                                                                      | 174 |

|                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3.6.2. Твердофазный синтез 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих кислотолабильную Р-Н-связь.....                                                                                          | 175 |
| 3.3.6.3. Исследование стабильности фосфамидой связи в составе конъюгатов при различных значениях рН .....                                                                                        | 176 |
| 3.3.7. Синтез конъюгатов олигонуклеотидов с <i>N</i> -(2-гидроксиэтил)феназином .....                                                                                                            | 176 |
| 3.3.8. Синтез конъюгата олигонуклеотида с биотином с использованием метода активированных эфиров .....                                                                                           | 176 |
| 3.3.9. Синтез конъюгатов олигонуклеотидов с <i>N</i> -ацетилгалактозамином и красителями FAM или Cy3 с использованием соответствующих азидов по реакции азид-алкинового циклоприсоединения ..... | 177 |
| ВЫВОДЫ .....                                                                                                                                                                                     | 178 |
| Список литературы.....                                                                                                                                                                           | 180 |
| Благодарности .....                                                                                                                                                                              | 227 |
| Список работ, в которых изложены основные результаты диссертации.....                                                                                                                            | 228 |

### Список сокращений и терминов (в алфавитном порядке)

АСО - антисмысловой олигонуклеотид,  
 ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография,  
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота,  
 НК – нуклеиновая кислота,  
 РНК – рибонуклеиновая кислота,  
 исРНК (isРНК) – иммуностимулирующая РНК,  
 нкРНК – некодирующие РНК,  
 мРНК – матричная РНК,  
 микроРНК (miРНК) – малые некодирующие РНК,  
 ОФ – обращенно-фазовая,  
 ПААГ – полиакриламидный гель,  
 ПЭГ – полиэтиленгликоль,  
 миРНК (siРНК) – малая интерферирующая РНК,  
 shРНК – шпилечные РНК,  
 ТСХ – тонкослойная хроматография,  
 ФМ – функциональная молекула,  
 ЯМР – ядерный магнитный резонанс,  
 2'-F - атом фтора в 2'-положении рибозы,  
 2'-О-Ме - метильная модификация в 2'-положении рибозы,  
 2'-О-МОЕ - метоксиэтильная модификация в 2'-положении рибозы,  
 2'-ОН - стандартная рибоза,  
 Å – ангстрем,  
 Ас (ac) – ацетил,  
 АСЕ –бис(ацетоксиэтокси)метил,  
 АсN – ацетонитрил,  
 Alk – алкил,  
 AS – антисенс-цепь siРНК,  
 В, Base – гетероциклическое основание,  
 Вос – *трет*-бутилоксикарбонил,  
 ВР – бромфеноловый синий,  
 BSA – N,O-бис-(триметилсилил) ацетамид,  
 Bu – бутил,  
 Bz (bz) – бензоил,

CE – 2-цианоэтил,  
 CPG – стекло с контролируемым размером пор или любой подходящий твердый носитель,  
 CuAAC – медь-катализируемая реакция азид-алкинового циклоприсоединения между азидами и алкинами с образованием региоселективных 1,2,3-триазолов (Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition),  
 CRISPR/Cas – система редактирования генома,  
 CPR – фосфорилирующий реагент 2-[2-(4,4'-диметокситритилокси)этилсульфонил]этил-*N,N*-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамид,  
 DBU – 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ен,  
 DCA (ДХУ) – дихлоруксусная кислота,  
 DCC – 1,3-дициклогексилкарбодиимид,  
 DIPEA – *N,N*-диизопропилэтиламин,  
 DMAA – 1,3-диметиламин,  
 DMAP (ДМАП) – 4-диметиламинопиридин,  
 DMF (ДМФА) – диметилформамид,  
 DMSO (ДМСО) – диметилсульфоксид,  
 DMS(O)MT – 4,4'-диметокси-4"-сульфонилтретил,  
 DMT – 4,4'-диметокситретил,  
 DSC – *N,N'*-дисулцинимидил карбонат,  
 dTdT – два остатка дезокситимидина на 3'-конце олигонуклеотида,  
 EDTA (ЭДТА) – этилендиаминтетрауксусная кислота,  
 EGFP – ген, кодирующий зелёный флуоресцентный белок,  
 EGFR – рецептор эпидермального фактора роста,  
 Et – этил,  
 EtSTetr – 5-этилтио-1*H*-тетразол,  
 FAM – остаток флуоресцеина,  
 Fm – 9-флуоренилметил,  
 Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил,  
 GalNAc – остаток *N*-ацетилгалактозамина,  
 GalNAc<sub>3</sub> – три остатка *N*-ацетилгалактозамина, введенные на 3'-конец смысловой цепи siРНК или на 5'-конец АСО-гапмера  
 HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота,  
 HOBt – 1-гидроксибензотриазол,  
 iBu – изобутирил,

invT – остаток инвертированного дезокситимидина на 3'-конце олигонуклеотида,  
iPr – изопропил,  
LNA - замкнутые нуклеиновые кислоты на основе бициклических сахаров (Locked Nucleic Acids),  
Lut – 2,6-лутидин,  
5mC – цитидин, модифицированный введением метильной группы в C5-положение гетероциклического основания,  
5mU – уридин, модифицированный введением метильной группы в C5-положение гетероциклического основания,  
Me – метил,  
*N*-MeIm – *N*-метилимидазол,  
MMT – монометокситритил,  
MOE – метоксиэтил,  
NHS – *N*-гидроксисукцинимид,  
NMP – *N*-метил-2-пирролидон,  
p – фосфат,  
PEG (ПЭГ) – полиэтиленгликоль,  
Ph – фенил,  
PMDETA – *N,N,N',N'',N'''*-пентаметилдиэтилентриамин,  
PO – стандартная межнуклеозидная фосфодиэфирная связь,  
PPh<sub>3</sub> – трифенилфосфин,  
PS – межнуклеозидная фосфотиоатная связь,  
Py – пиридин,  
(PyS)<sub>2</sub> – 2,2'-дипиридил дисульфид,  
S – сенс-цепь siРНК,  
sgРНК – гидовые РНК,  
SPAAC – азид-алкиновое циклоприсоединение, промотируемое напряжением цикла (Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition),  
TBAF – фторид тетрабутиламмония,  
TBDMS – *трет*-бутилдиметилсилил,  
TBTA – трис(бензилтриазилил)амин,  
*t*-Bu – *трет*бутил,  
TC – тионокарбамат,  
TEMED, TEMED – тетраметилэтилендиамин,

tfa – трифторацетил,  
 TFA (ТФА) – трифторуксусная кислота,  
 THF (ТГФ) – тетрагидрофуран,  
 TMSCl – триметилхлорсилан,  
 TMSOTf – триметилсилилтрифторметилсульфонат,  
 TOM – триизопропилсилилоксиметил,  
 Tris (Трис) – трис(гидроксиметил)аминометан.

**В работе приняты следующие термины и понятия:**

**Конъюгат** – это молекулярная конструкция, которая состоит из фрагмента НК (олигонуклеотида) и ФМ.

**Модификация (аналог)** – это небольшое структурное изменение нуклеотидного фрагмента, например, замены в рибозном фрагменте, фосфатной группе или гетероциклическом основании, сохраняющее базовую функцию нуклеотида в РНК/ДНК, но влияющее на его стабильность, ферментативное узнавание и др.

**Производное** – это олигонуклеотид с введенной реакционноспособной группой, предназначенной для дальнейших химических превращений и способной участвовать в реакциях конъюгации, либо содержащий флуорофоры (красители/тушители) для визуализации/отслеживания.

**Функциональная молекула (ФМ)** – это химическое соединение, обладающее определенными/заданными свойствами, позволяющими ему выполнять специфическую роль в химических, биологических и физических процессах.

**Модификаторы** – это химические соединения, вводимые в структуру биомолекул (пептидов, нуклеотидов, нуклеиновых кислот и белков) для направленного изменения их физико-химических или функциональных свойств.

**lab-made модификаторы** – это индивидуально разработанные соединения, предназначенные для решения уникальных задач по получению требуемых конъюгатов.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, списка сокращений, трех глав (обзор литературы, результаты и обсуждение, материалы и методы), заключения, выводов, списка цитированной литературы. Материал работы изложен на 231 страницах машинописного текста (12 шрифт, интервал 1,5) и содержит 112 рисунков, 11 таблиц. Библиография включает 547 литературных источников.

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Олигонуклеотиды, их аналоги и производные в настоящее время активно используются как инструменты для диагностики различных бактериальных, паразитарных, вирусных или онкологических заболеваний, анализа пищевых продуктов, биологических следов и объектов из окружающей среды, а также позволяют решать фундаментальные задачи по выявлению закономерностей при изучении НК-НК и НК-белковых взаимодействий.

Создание терапевтических препаратов на основе олигонуклеотидов является одной из актуальных задач современной биохимии, молекулярной биологии и фундаментальной медицины. Благодаря своей специфичности, функциональному разнообразию и низкой токсичности терапевтические НК все более востребованы при создании лекарственных средств [1–12]. К настоящему времени в мире одобрено к применению уже более 20 терапевтических препаратов и первым препаратом на основе химически синтезированного олигонуклеотида в 1998 году стал Фомивирсен (Fomivirsen), представляющий собой 21-звенный PS-модифицированный олигодезоксирибонуклеотид и ингибирующий по антисмысловому механизму репликацию цитомегаловируса (ЦМВ) при лечении ЦМВ-ретинита у больных СПИДом. Уже через несколько лет, в 2004 году, был одобрен препарат Макуген (Macugen), используемый в офтальмологии для лечения сосудов глаз, в основе которого представитель класса РНК - модифицированный олигорибонуклеотид Пегаптаниб (Pegaptanib) – 5'-пегилированный (ПЭГ, ~40кДа) 28-звенный 2'-F/2'-O-Me/2'-OH/PO/invT-РНК-аптамер. Введение ПЭГ позволяет повысить терапевтический потенциал лекарств за счет увеличения времени их циркуляции в организме, снизить иммуногенность и антигенность препаратов, а также увеличить гидродинамический размер лекарств и снизить их почечный клиренс [13]. Последнее десятилетие ознаменовалось выходом на рынок лекарств еще нескольких препаратов, в основе которых химически синтезированные, модифицированные олигорибонуклеотиды действующие по антисмысловому механизму и по механизму РНК-интерференции (табл. 1). Подавляющая часть препаратов на основе siРНК содержат в своем составе N-ацетилгалактозамин (GalNAc) - функциональную молекулу (ФМ) для направленной доставки олигонуклеотидов (в т.ч. siRNA) в печень.

Также на рынке присутствует еще 4 препарата, содержащие 21-30-звенные морфолиновые олигонуклеотиды (Exondys51, 2016; Vyondys53, 2019; Viltepso, 2020; Amondys45, 2021), действующие по антисенс механизму [5]. В 2023 году помимо еще

одного препарата на основе РНК-аптамера для терапии возрастной макулодистрофии (Avacincaptad pegol, Izervay™ - 5'-пегилированный 39-звенный 2'-F/2'-O-Me/2'-OH/PO/invT) был одобрен к применению препарат Casgevy, работающий на системе редактирования генов CRISPR и представляющий собой первую генную терапию для лечения серповидно-клеточной анемии [3, 14]. Суммируя приведенные данные, можно сказать, что в олигонуклеотидных препаратах для терапии различных заболеваний пока лидируют технологии с использованием АСО или siРНК, а в качестве действующего вещества в основном используют 2'-модифицированные PO/PS-содержащие аналоги олигорибонуклеотидов длиной до 30 оснований и/или их конъюгаты с функциональными молекулами.

**Таблица 1.** Список препаратов на основе олигонуклеотидов (АСО или siRNA), одобренных к применению за период 2013-2026гг.

| Год                                                                     | Препарат™ | Действующее вещество | Длина     | Состав                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|----------------------|-----------|--------------------------------------------------------|
| Антисмысловые олигонуклеотиды (АСО)                                     |           |                      |           |                                                        |
| 2013                                                                    | Kynamro   | Mipomersen           | 20        | 2'-дезоксид/2'-O-MOE/PS/5mC                            |
| 2016                                                                    | Spinraza  | Nusinersen           | 18        | 2'-O-MOE/PS/5mC                                        |
| 2017                                                                    | Milasen   |                      |           | 2'-O-MOE/PS                                            |
| 2018                                                                    | Tegsedi   | Inotersen            | 20        | 2'-дезоксид/2'-O-MOE/PS/5mC                            |
| 2023                                                                    | Wainua    | Eplontersen          | 20        | 2'-дезоксид/2'-O-MOE/PS/PO/5mC/5mU/GalNAc <sub>3</sub> |
| 2023                                                                    | Qalsody   | Tofersen             | 20        | 2'-дезоксид/2'-O-MOE/PS/PO/5mC/5mU                     |
| 2024                                                                    | Rytelo    | Imetelstat           | 13        | 2'-дезоксид/PS/NH <sub>2</sub> /C18*                   |
| 2024                                                                    | Tryngolza | Olezarsen            | 20        | 2'-дезоксид/2'-O-MOE/PS/PO/5mC/5mU/GalNAc <sub>3</sub> |
| 2025                                                                    | Dawnzera  | Donidalorsen         | 20        | 2'-дезоксид/2'-O-MOE/PS/PO/5mC/5mU/GalNAc              |
| 2026                                                                    | Zanvastro | Zilganersen          |           |                                                        |
| siРНК                                                                   |           |                      |           |                                                        |
| 2018                                                                    | Onpattro  | Patisiran            | 21/23 или | 2'-F/2'-O-Me/PS/PO/GalNAc <sub>3</sub>                 |
| 2019                                                                    | Givlaari  | Givosiran            | 23/23     |                                                        |
| 2020                                                                    | Oxlumo    | Lumarisan            | дуплексы  |                                                        |
| 2021                                                                    | Leqvio    | Inclisiran           | siРНК     |                                                        |
| 2022                                                                    | Amvuttra  | Vutrisiran           |           |                                                        |
| 2023                                                                    | Rivfloza  | Nedosiran            |           |                                                        |
| 2025                                                                    | Qfitlia   | Fitusiran            |           |                                                        |
| * NH <sub>2</sub> – алифатическая аминогруппа; C18 – алифатическая цепь |           |                      |           |                                                        |

Одним из наиболее значимых применений олигонуклеотидов в диагностике вот уже более 40 лет является ПЦР-анализ с использованием олигодезоксирибонуклеотидов в качестве праймеров. В настоящее время эта рутинная процедура используется во многих отраслях: здравоохранение, пищевая промышленность, ветеринария, растениеводство,

судебно-медицинская экспертиза и др. Диагностический потенциал олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов с каждым годом раскрывается все больше, например: включение LNA в состав олигонуклеотидных праймеров повышает прочность связывания с матрицей и специфичность для амплификации ДНК [15]; разработка технологии олигорибонуклеотидной интерференционной ПЦР, в которой короткая РНК гибридизуется с комплементарной последовательностью ДНК для ингибирования ПЦР-амплификации в конкретной последовательности-мишени [16]; создание уникальных аналитических систем, основанных на структурных особенностях аптамеров, для определения бактериальных патогенов, низкомолекулярных соединений, белковых мишеней, в том числе маркеров различных заболеваний (напр., микотоксины, антибиотики, пестициды, лекарственные препараты, иммуноглобулин Е, тромбоцитарный фактор роста, фактор некроза опухоли и др.) [17, 18].

Активное развитие исследований в области регуляции экспрессии генов с использованием аналогов микроРНК или siРНК по механизму РНК-интерференции, открытие CRISPR/Cas-технологии редактирования генома посредством гидовой РНК, а также возросший интерес к аптамерам, как компонентам систем доставки и распознавания молекул-мишеней, требуют получения синтетических нативных и модифицированных РНК длиной до 100 и более нуклеотидов как для проведения фундаментальных исследований, так и для разработки новых тест-систем и препаратов для клеточной и генной терапии [19–22]. Введение модификаций в заданные положения олигонуклеотидной цепи или конъюгирование ФМ с олигонуклеотидами позволяет улучшить нуклеазоустойчивость последних, а также повысить или понизить эффективность их связывания с комплементарными ДНК или РНК, визуализировать их локализацию в клетке/органе, увеличить эффективность их проникновения в клетки или скорректировать их внутриклеточный трафик, идентифицировать или выключить целевую НК или белок [23–30]. В настоящее время для получения олигонуклеотидов различных типов используют твердофазный фосфитамидный метод синтеза, представляющий собой автоматизированный процесс с использованием специальных "строительных блоков" (фосфитамидов) и вспомогательных реагентов и состоящий из повторения синтетического цикла, включающего в себя четыре стадии (детритилирование, конденсация, кэпирование, окисление) для каждого вновь присоединенного нуклеотида. Это позволяет наращивать на поверхности носителя олигонуклеотидную цепь, и с увеличением длины цепи синтез становится более чувствительным к эффективности каждой стадии. На рынке синтетических олигонуклеотидов действует большое число отечественных и зарубежных

компаний, которые предлагают широчайший спектр как функционализированных фрагментов ДНК или РНК, так и их гибридов, длиной примерно до 150-200 нуклеотидов (например, <https://ru.lumiprobe.com/>, [www.genscript.com](http://www.genscript.com), <https://www.syntol.ru/>, <https://www.agilent.com/en/product/crispr-cas>, [www.idtdna.com/pages/products/custom-dna-rna](http://www.idtdna.com/pages/products/custom-dna-rna), <https://evrogen.ru/>).

Для получения конъюгатов олигонуклеотидов выделяют два подхода – *пресинтетический* и *постсинтетический* [31–33].

*Пресинтетический* подход основан на использовании на определенной стадии олигонуклеотидного синтеза премодифицированного синтона - нуклеотидного или ненуклеотидного фосфитамида, содержащего требуемую ФМ. Коммерческие фирмы (напр., [34–39]) предлагают к продаже фосфитамида, содержащие различные ФМ, но как правило они имеют высокую стоимость и их набор ограничен – флуоресцентные красители, остатки холестерина,  $\alpha$ -токоферола, пирена, биотина. Причем линкер, соединяющий ФМ и олигонуклеотид также ограничен по своей структуре. При синтезе фосфитамида или носителя, содержащего искомую ФМ, в условиях лаборатории необходимо учесть ее совместимость с реагентами синтетического цикла автоматического синтеза (растворимость, инертность к ангидридам, окисляющему и детритилирующему агентам), а также стабильность в условиях деблокирования целевого конъюгата. Тем не менее, учитывая особенности стандартных обработок в рамках синтетического цикла и химическую устойчивость вводимых в олигонуклеотиды остатков ФМ, в настоящее время есть возможность получения широчайшего спектра производных ДНК и РНК в рамках пресинтетического подхода.

*Постсинтетический* подход оправдан, когда вводимая ФМ несовместима с химией синтетического цикла или финального деблокирования, и основан на использовании на определенной стадии олигонуклеотидного синтеза модифицированных фосфитамидов/носителей, имеющих в своем составе защищенную функциональную группу, деблокирование которой может происходить либо отдельно, либо одновременно с удалением всех защитных групп с олигонуклеотида при финальном деблокировании, позволяющую провести дальнейшее введение требуемой ФМ уже в составе олигомера. Коммерчески доступные варианты фосфитамидов содержат альдегидную, карбоксильную, тиольную, алкильную, гидроксильную, азидо- или амино-группы, а также атом галоида, что позволяет выбрать оптимальную для исследователя стратегию введения нужных ФМ [40, 41]. Следует отметить, что вводимая ФМ также должна содержать функциональную ортогональную группировку, способную реагировать только с группой, введенной в

олигонуклеотид. Описанный *постсинтетический* подход можно разделить на два варианта: "на твердой фазе" и "в растворе". Последний предполагает введение ФМ в полностью деблокированный олигонуклеотид, что может ограничивать природу вводимой ФМ, поскольку: олигонуклеотиды ограниченно растворимы в органических растворителях; некоторые ФМ (напр., холестерин и другие липофильные соединения) ограниченно растворимы в водно-органических смесях; требуется, как правило, использование минимальных избытков вводимых ФМ; возникает сложность отделения конъюгата от непрореагировавшей ФМ и возможных катализаторов или активаторов реакции. Таким образом, в каждом случае придется подбирать индивидуальные условия: растворители, соотношения, способ удаления избытков реагентов и т.д. Вариант *постсинтетического* подхода "на твердой фазе" накладывает ограничения на структуру вводимой ФМ - она должен быть стабильна как в условиях присоединения к олигонуклеотиду, так и в условиях его финального деблокирования. И этот вариант обладает рядом преимуществ: использование различных растворителей, включая водно-органические среды, а также любые избытки ФМ, удаление непрореагировавших компонентов и возможных побочных продуктов простой промывкой твердого носителя, к которому прикреплен олигонуклеотид. В отдельную задачу можно выделить получение конъюгатов олигонуклеотидов, в которых ФМ и олигонуклеотид соединены посредством связи лабильной во внутриклеточных условиях (например, дисульфидная, кислотолабильные ацетальная, оксимная, ортоэфирная и др.).

Резюмируя данные по получению синтетических НК и их производных/конъюгатов, стоит отметить, что оптимизация синтеза олигорибонуклеотидов является нетривиальной и актуальной задачей, решение которой объективно отвечает современным запросам биоорганической химии, среди которых необходимость создания протяженных олигомеров, их модифицированных аналогов и производных/конъюгатов. Несмотря на большое разнообразие пре- и постсинтетических подходов и методов, предложенных для получения конъюгатов олигонуклеотидов различными научными группами [32, 33, 40, 42–45], разработка новых *универсальных* методов ковалентного конъюгирования олигонуклеотидов с биомолекулами или различными транспортными системами не потеряла актуальности.

## **Цель и задачи исследования**

**Цель** настоящей работы – разработка новых подходов к твердофазному синтезу олигорибонуклеотидов, их структурных аналогов, а также конъюгатов с остатками функционально значимых молекул различной природы для получения потенциальных биологически активных и диагностически значимых соединений.

В ходе исследования решали две основные фундаментально и практически значимые **задачи**.

1. Разработка новых протоколов высокоэффективного автоматического синтеза олигорибонуклеотидов, их структурных аналогов и производных длиной до 100 и более нуклеотидных звеньев, с использованием отечественного ДНК/РНК синтезатора ASM-800/800E ("Биоссет", Новосибирск, Россия), в диапазоне от аналитического (0.01–0.05 мкмоль) до семипрепаративного (до 0.5 мкмоль) количества целевой цепи олигомера с перспективой масштабирования объемов синтеза.
2. Разработка новых подходов к высокоэффективному твердофазному синтезу 5'-конъюгатов олигонуклеотидов различных типов с остатками функционально значимых молекул, вводимых в том числе посредством ковалентных стимул-чувствительных связей. Комплекс подходов должен обеспечить гибкость варьирования природы получаемых конъюгатов с использованием минимально-достаточного набора реагентов вне зависимости от разновидности общего олигонуклеотидного предшественника.

## **Научная новизна и практическая значимость работы**

В данной работе создан набор подходов, позволяющих обеспечить получение широкого спектра олигонуклеотидов и их конъюгатов с разными функциональными молекулами, определяющих реализацию заданных биологически значимых свойств, таких как внутриклеточный транспорт, внутриклеточная функциональная доступность, визуализация и др. При этом особое внимание в работе было уделено как обеспечению высокой эффективности получения нативных и модифицированных функциональных нуклеиновых кислот (каталитические НК, аптамеры, антисмысловые олигонуклеотиды, микроРНК, малые интерферирующие РНК, гидовые РНК и др.), так и их конъюгированию с широким спектром биологически значимых молекул, включая липофильные молекулы, витамины, короткие пептиды, борсодержащие кластеры и др.

Разработанные для отечественного синтезатора ASM-800/800E протоколы синтеза имеют потенциал и могут быть востребованы в рамках реализации политики

импортозамещения. Тесное сотрудничество с единственным на национальном рынке производителем синтезаторов для получения нативных, модифицированных, а также гибридных НК-фрагментов позволяет обеспечить технологическую независимость и лидерство в научной и научно-практической сферах. Предложенные в работе твердофазные методы конъюгирования достаточно просты в исполнении и эффективны, не требуют использования сложных реакционных схем и процессов (например, специфических катализаторов, уникальных реагентов и синтонов) или экзотических условий проведения реакций. Они значимо расширяют возможности и практичность синтеза конъюгатов ДНК и РНК, используя преимущества твердофазного метода: непрореагировавшие реагенты и возможные побочные продукты реакции на всех стадиях можно легко отделять путем промывок, поскольку в процессе синтеза конъюгат все время присоединен к носителю; возможность использования большого набора растворителей, в том числе варьирование соотношения водной и органической фаз в широких пределах. Подходы не требуют предварительных многостадийных синтезов для модификации вводимых биологически активных молекул, поскольку, зачастую, эти биомолекулы коммерчески доступны и содержат в своем составе гидроксильную или аминогруппу, которая может быть непосредственно использована для конъюгирования по одному из разработанных в работе методов и подходов. Предложенные синтетические протоколы позволяют: из одного олигонуклеотида-предшественника синтезировать серию олигомеров, отличающихся строением (длиной и структурой) как линкерного звена, так и вводимых ФМ; получать конъюгаты олигонуклеотидов, содержащие схожие по структуре, но отличающиеся по стабильности связи, соединяющие олигонуклеотид и ФМ, что во многом определяет направление их практического применения. Кроме того, предложенные подходы в сочетании с широким спектром коммерческих модификаторов для олигонуклеотидного синтеза уже содержащих ФМ или реакционный центр, инертный в ходе синтеза, но способный к дальнейшей постфункционализации, позволяют создавать мультифункционализированные конструкции, несущие несколько биологически значимых остатков ненуклеозидной природы. В этом случае можно реализовать гибкую стратегию их получения, основанную либо на разнесении реакций модификации по этапам синтеза олигомера (сочетание пре- и постсинтетического подходов), либо на использовании комплексной постсинтетической стратегии (сочетание нескольких вариантов реакционноспособных групп).

### **Основные положения, выносимые на защиту**

В совокупности разработан ряд новых подходов и протоколов к высокоэффективному получению протяженных синтетических олигонуклеотидов и 5'-конъюгатов на их основе, несущих остатки функционально значимых соединений, введенных через линкеры различной стабильности.

1. Протоколы, обеспечивающие в рамках разового запуска синтезатора ASM-800/800E получение как набора (до 8 вариантов) олигонуклеотидов в аналитическом количестве (до 0.05 микромоль каждого), так и семипрепаративного количества (до 0.5 микромоль) одной последовательности нативной/модифицированной РНК длиной до 100 и более нуклеотидов (каталитические НК, аптамеры, малые интерферирующие РНК, микроРНК, гидовые РНК, антисмысловые олигонуклеотиды и др.). Разработанные протоколы обеспечивают получение олигонуклеотидов с эффективностью до 99 % на каждый синтетический цикл автоматического синтеза в зависимости от длины и нуклеотидного состава последовательности.
2. Протокол гибридного твердофазного синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, сочетающий использование новых типов Н-фосфонатных синтонов на основе гидроксилсодержащих функциональных молекул и стандартных амидофосфитных мономеров.
3. Подход к твердофазной конъюгации биомолекул, содержащих алифатическую аминогруппу, с олигонуклеотидом посредством сукцинилкарбаматной активации 5'-гидроксильной группы носитель-связанного олигонуклеотида.
4. Твердофазный вариант получения 5'-конъюгатов, в которых олигонуклеотид и аминокислотсодержащие биомолекулы различной природы соединены фосфамидной связью, способной к гидролизу при умеренно кислых pH (в диапазоне 4.5-6.0).
5. Твердофазный метод синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих гидразоновый фрагмент, обеспечивающий в структуре целевого продукта наличие кислотолабильной азометиновой связи. Последующее использование восстанавливающих агентов позволяет получать стабильный аналог целевого 5'-конъюгата олигонуклеотида без изменения его функциональности.
6. Разработанные подходы к твердофазному 5'-конъюгированию позволяют функционализировать олигонуклеотиды любых типов и длины биомолекулами различной структуры, с конверсией реакции конъюгации близкой к количественной.

### **Публикации и апробация работы**

По теме диссертации опубликована 28 статей в рецензируемых журналах (Web of Science, Scopus). Основные результаты работы были представлены на международных и российских конференциях: "Инженерная биология и биофармацевтика" (Новосибирск, 2026); V Всероссийская конференция "Физико-химическая биология" (Новосибирск, 2024); Конгресс "CRISPR-2023" (Новосибирск, 2023); Всероссийская конференция "Синтетическая биология и биофармацевтика" (Новосибирск, 2022); XIe Colloque MeetOchondrie (Gironde, 2022); Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (Novosibirsk, 2022); Конференция с элементами школы молодых ученых "Молекулярные основы заболеваний: что молекулярная биология может сделать для современной медицины" (Новосибирск, 2021); Мультиконференции "Биотехнология – медицине будущего" (Новосибирск, 2019); 44th FEBS Congress, From Molecules to Living Systems (Krakow, 2019); International Workshop "Targeting RNA World" (Saint-Petersburg, 2018); 13 Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (Bordeaux, 2017); 5th Annual Congress on Clinical & Translational science (EUSTM-2017) (Berlin, 2017); XXII<sup>th</sup> International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (Paris, 2016); Международная конференция "Химическая биология", посвященная 90-летию академика Д. Г. Кнопpe (Новосибирск, 2016); "Targeting the RNA World" International Research Workshop (Saint-Petersburg, 2016); VII Российский симпозиум "БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ" (Новосибирск, 2015); "Euromit 2014" (Tampere, 2014); XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids Chemical Biology of Nucleic Acids (Poznań, 2014); Международная конференция "Molecular mechanisms of growth and progression of malignant neoplasms" (Москва, 2014); First Symposium on Supramolecular Chemistry for Materials and Life Sciences (Novosibirsk, 2010).

### **Личный вклад автора**

Работа выполнена в Лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия). Представленные в работе экспериментальные данные по разработке и использованию как протоколов автоматического олигонуклеотидного синтеза, так и новых твердофазных подходов к синтезу 5'-конъюгатов олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов получены лично автором, либо при его непосредственном участии и руководстве на всех этапах исследования. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях. В совместных работах автору принадлежит ключевая роль по планированию и проведению

экспериментов по химическому синтезу олигорибонуклеотидов, их аналогов и конъюгатов, а также обработке, оформлению и подготовке к публикации соответствующих результатов.

Эстронил-6-аминогескилкарбамат любезно предоставлен Новопашиной Д.С. (ИХБФМ СО РАН), аминотетраметиленоксониевое производное клозо-додекабората любезно предоставлено Сильниковым В.Н. (ИХБФМ СО РАН), гидрохлорид монопиперазинового производного тритильной спиновой метки (Finland trityl) любезно предоставлен Тормышевым В.М. (НИОХ СО РАН). Запись ЯМР-спектров и характеристика малых молекул и их производных проведены в ЦКП НИОХ СО РАН; LC-ESI- и MALDI-TOF-спектры производных органических соединений, а также олигонуклеотидов и их конъюгатов записаны в ОЦКП ИХБФМ СО РАН.

## **Глава 1. Подходы к получению конъюгатов олигонуклеотидов с биоактивными (функциональными) молекулами (Обзор литературы)**

Олигонуклеотиды - фрагменты нуклеиновых кислот (НК) - в настоящее время используют в различных областях биотехнологии, молекулярной биологии, а также медицины. Они незаменимы для диагностики, их терапевтический потенциал огромен - это может быть основа ген-направленных препаратов, противовирусных, противоопухолевых и иммуномодулирующих агентов. В мире одобрено к применению уже более 20 терапевтических препаратов на основе олигонуклеотидов [1, 46–50], в которых в качестве основного действующего вещества используют именно олигонуклеотиды или их конъюгаты с рядом биологически активных соединений (функциональных молекул).

На сегодняшний день синтез олигонуклеотидов (как дезокси-, так и рибо-ряда, а также их фосфат- или 2'-модифицированных аналогов и т.д.) обеспечивает потребности широкого спектра исследовательских и практических приложений и является уже рутинной автоматизированной процедурой, хотя и требует подбора квалифицированного персонала и качественной базы реактивов. Это стало возможным благодаря исследованиям нескольких групп ученых [51]. В 1950-х годах группа под руководством A.R.Todd [52] заложила основы для Н-фосфонатного и фосфотриэфирного методов синтеза олигонуклеотидов, а сотрудники H.G.Khorana [53] разработали фосфодиэфирный метод. В 1960-х годах группы под руководством R.Letsinger [54, 55] и C.Reese [56] разработали фосфотриэфирный метод. В 1970-х годах R.Letsinger [57] предложил фосфиттриэфирный метод образования межнуклеозидных связей, в котором были использованы существенно более реакционноспособные нуклеозидные производные на основе Р(III). В числе ученых, активно способствовавших развитию и становлению олигонуклеотидного синтеза, также необходимо отметить A.A. Michelson, K.K. Ogilvie, S.L. Beaucage, З.А. Шабарову, О.Г. Чахмахчеву, М.Н. Колосова, В.Ф. Зарытову, Д.Г. Кнорре [58–66]. Область их интересов охватывает широкий спектр исследований - от изучения защитных групп и активирующих агентов до поиска новых методов и усовершенствования синтетических процессов. Благодаря всем предшествующим исследованиям группа под руководством M.Caruthers [67, 68] реализовала этот метод в твердофазном варианте. Окончательный выбор 2-цианэтильной группы [69] в качестве защитной группы по фосфату дал тот вариант нуклеозидных фосфитаминов, который является общепринятым в настоящее время.

Автоматический фосфитаминовый синтез олигонуклеотидов [70–73] (рис. 1.1) позволяет получать как нативные, так и модифицированные фрагменты НК. Синтетический цикл присоединения одного нуклеотидного звена включает три ключевые стадии

(детритилирование, конденсация, окисление) в ходе которых и идет наращивание олигонуклеотидной цепи. Вспомогательная стадия кэпирования необходима для блокирования наращивания побочных укороченных олигомеров с длиной  $n-1$ ,  $n-2$  и т.д. - продуктов неполной конденсации при синтезе основной цепи. Синтез НК проводят на твердых носителях - стекло с контролируемым размером пор или макропористый полистирол, что позволяет на каждой стадии направленно изменять реакционную или функциональную среду вокруг носителя, тем самым обеспечивая получение целевого олигонуклеотида или конъюгата на его основе, с заданной последовательностью и функциональностью.

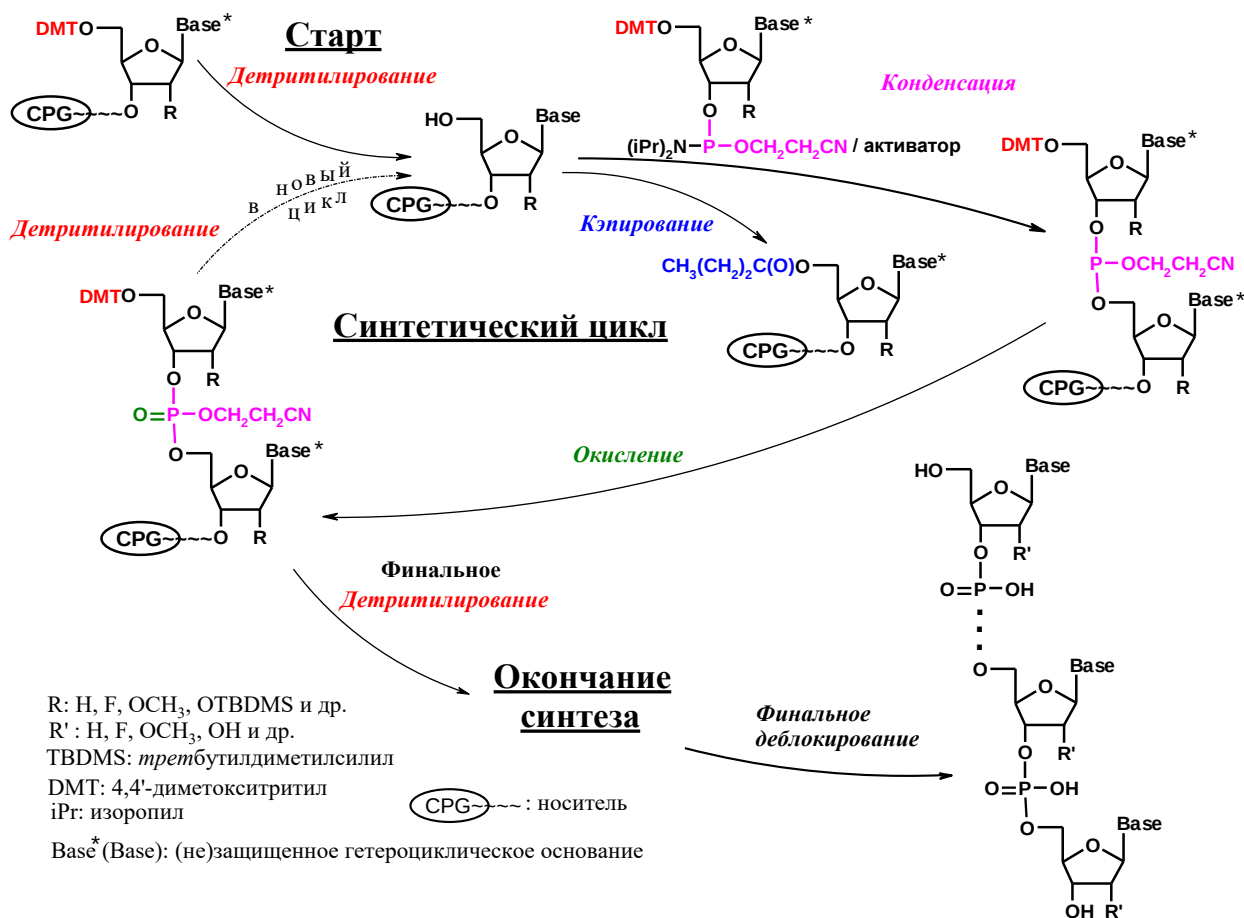
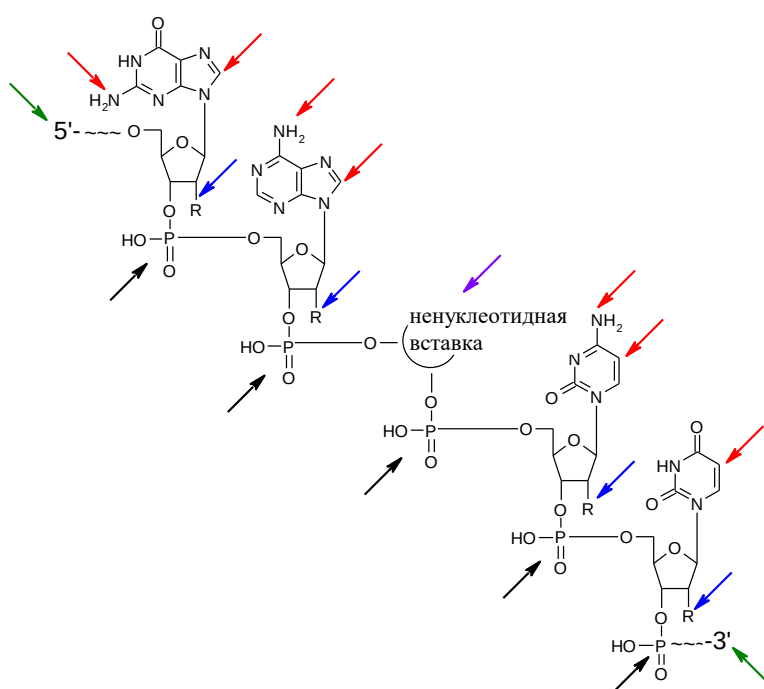


**Рисунок 1.1.** Схема твердофазного синтеза олигонуклеотидов.

Таким образом, твердофазный фосфитамидный синтез как для получения олигонуклеотидов (нативных и модифицированных по гетероциклическим основаниям и углеводофосфатному остову), так и их конъюгатов с остатками различных ФМ стал доступен и широко развился в 80х годах XX века. ФМ-содержащие олигонуклеотиды способствовали эффективному решению как исследовательских (физико-химических, молекулярно-биологических, биохимических), так и практико-ориентированных задач диагностической и терапевтической направленности.

В зависимости от поставленной задачи очень важным является положение введения ФМ в олигонуклеотидную цепь. Как правило введение ФМ осуществляют по гетероциклическим основаниям, в 2'-положение рибозы, а также по межнуклеотидным фосфатам, во внутреннюю часть олигонуклеотидной цепи (в виде ненуклеотидных вставок различной природы), на 5'- или 3'-концевые фрагменты НК (рис. 1.2). Для введения ФМ в олигонуклеотид в качестве "строительных" блоков используют набор *модификаторов*: фосфитамины и/или носители нуклеотидной и ненуклеотидной природы, содержащие различные группы, позволяющие направленно функционализировать заданное положение синтезируемой цепи НК. Следует отметить, что несмотря на наличие коммерческих продуктов (модификаторов), при необходимости, синтез прекурсоров, содержащих



функциональные группы, можно осуществить по описанным в литературе методикам, а использование в ходе синтеза нескольких модификаторов в комбинации друг с другом позволяет получать не только моно-, но и мультимодифицированные олигонуклеотиды.

**Рисунок 1.2.** Сайты, доступные для модификации в структуре олигонуклеотида.

В целом для синтеза конъюгатов выделяют пресинтетический (I) и постсинтетический (II) подходы (рис. 1.3). Первый - это прямое введение остатка ФМ в ходе автоматического синтеза, второй - опосредованное присоединение остатков ФМ, т.е. введение в олигонуклеотид в ходе автоматического синтеза реакционноспособной группировки и ее дальнейшая постсинтетическая функционализация ФМ. Их описание, преимущества и особенности представлены в таблице 1.1.

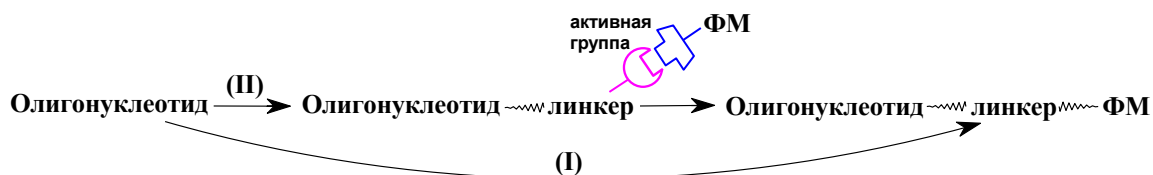


**Рисунок 1.3.** Прямое (I) и опосредованное (II) введение ФМ в структуру олигонуклеотида.

**Таблица 1.1.** Стратегии синтеза конъюгатов олигонуклеотидов с ФМ.

| <b>Пресинтетический<br/>подход (I)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>Постсинтетический подход (II)#</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>Синтез на носителе<br/>(гетерофазный вариант)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>Синтез в растворе<br/>(гомофазный вариант)</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>Описание</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Введение ФМ в виде модифицированных нуклеотидных или нуклеотидных фосфитаминов и/или носителей в ходе автоматического синтеза олигонуклеотида.                                                                                                                                                                        | Введение ФМ по реакционной группе в составе полностью защищенного олигонуклеотида, присоединенного к носителю и полученного после автоматического синтеза.                                                                                                                                                           | Введение ФМ по реакционной группе в составе полностью деблокированного (незащищенного) олигонуклеотида.                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Преимущества</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| ✓ Отсутствие дополнительных обработок/реакций для введения ФМ.                                                                                                                                                                                                                                                        | ✓ Любые избытки ФМ по отношению к олигонуклеотиду.<br>✓ Удаление избытков ФМ и возможных катализаторов/активаторов реакции промывкой соответствующим растворителем.<br>✓ Использование большого спектра растворителей, в том числе водно-органические смеси.<br>✓ Широкий диапазон условий (pH, температура, время). | ✓ Возможность полной очистки и характеристики олигонуклеотида и ФМ перед конъюгированием.                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Особенности</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| ✓ Растворимость ФМ в условиях, совместимых с автоматическим синтетическим циклом.<br>✓ Возможна деструкция и/или модификация ФМ в присутствии реагентов автоматического цикла.<br>✓ Возможна деструкция и/или модификация ФМ в процессе финального деблокирования (удаления защитных групп и отщепления от носителя). | ✓ Необходимость активации или демаскирования реакционной группы и стабильность олигонуклеотида в этих условиях.<br>✓ Деструкция и/или модификация ФМ в процессе финального деблокирования (удаления защитных групп и отщепления от носителя).                                                                        | ✓ Совместимость растворителей для олигонуклеотида и ФМ.<br>✓ Разработка специальных схем модификации в зависимости от природы (свойств) ФМ (гидрофобность vs гидрофильность).<br>✓ Избытки ФМ vs олигонуклеотида и катализаторов/активаторов реакции. Удаление избытков.<br>✓ Вероятность проведения повторной очистки для целевого конъюгата. |
| # подробнее о границах применимости двух вариантов постсинтетического подхода описано в разделе 1.1.2                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

Одними из первых работ с использованием конъюгатов олигонуклеотидов с ФМ были таковые по комплементарно-адресованной модификации – одному из основных и универсальных методов направленного воздействия на ДНК или РНК, идея которой была впервые предложена Н.И. Гриневой с соавт. [74] еще в 1967 году. Было показано, что олигонуклеотиды, несущие химически активные группы, проявляют способность к комплементарным взаимодействиям с НК-мишенью, что обеспечивает ее направленную модификацию [75–83]. Работы по синтезу олигонуклеотидов, содержащих краситель флуоресцеин, активно публиковались в конце 80х - начале 90х годов (напр., [84–88]). Еще одной из популярных молекул помимо флуоресцеина на заре получения конъюгатов с помощью автоматического синтеза был гидрофобный остаток холестерина (напр., [89–91]). Уже тогда было понятно, что увеличение эффективности проникновения олигонуклеотидов в клетки и корректировка их внутриклеточного распределения важно при создании терапевтических препаратов на основе олигонуклеотидов. С развитием методик и подходов к получению конъюгатов олигонуклеотидов с различными остатками функциональных молекул появилась возможность значительно влиять на физико-химические свойства, определяющие их специфику взаимодействия с НК-мишенями или белками, визуализировать их локализацию в клетке и/или органе, повышать эффективность их проникновения в клетки или корректировать их фармако-кинетические свойства при распределении в организме [23–28, 92]. Прогресс в развитии химии олигонуклеотидов значительно расширил спектр фундаментального использования и практического приложения этих агентов на основе НК. Однако до настоящего времени не существует общепринятой и четкой стратегии планирования рациональной схемы синтеза требуемого производного олигонуклеотида, отвечающей функциональным требованиям эксперимента или ожидаемому результату биологического воздействия.

В данном обзоре будут представлены существующие на сегодняшний день подходы рационального синтеза олигонуклеотидных конъюгатов, содержащих остатки целевой функциональной молекулы и сформулированы принципы своего рода "олигонуклеотидного конструктора". Акцент сделан на вариантах, позволяющих получать целевые конъюгаты, оперируя минимально-оптимальным набором хорошо зарекомендовавших себя эффективных коммерчески доступных реагентов и реакций с их участием. Дополнительно будут рассмотрены удобные и эффективные схемы, позволяющие вводить коммерчески недоступные, но доступные в условиях специализированных лабораторий (lab-made модификаторы), остатки функциональных молекул, порой уникальных, в структуру олигонуклеотида. Проанализированные варианты

позволят показать, как можно нивелировать возможные синтетические препятствия при конструировании целевого конъюгата олигонуклеотида с остатком ФМ с заранее заданными свойствами.

### **1.1 Концепции синтеза конъюгатов олигонуклеотид-функциональная молекула**

Как уже упоминали выше для получения конъюгатов различной функциональности используют *пре*- и *пост*синтетические подходы (табл. 1.1). Независимо от выбранного подхода в ходе автоматического синтеза целевой последовательности необходимо использовать модификаторы, которые обеспечивают прямое введение ФМ в заданное положение олигомера (пресинтетический подход), либо содержат реакционную группу, неактивную или маскированную в ходе синтеза, но способную к дальнейшей функционализации путем направленного введения остатка ФМ (постсинтетический подход). Постсинтетический подход подразумевает введение как в олигонуклеотид, так и в остаток ФМ реакционно-способных групп, как правило, склонных к парно-селективным биоортогональным превращениям (клик-реакция, тиол/малеимидная конденсация, реакция Соногаширы и др). И этот подход возможен лишь при условии, что ФМ может быть модифицирована без потери ее основополагающих характеристик. Широкий набор доступных реакционных групп и способов их введения позволяет подобрать оптимальный вариант получения модифицированной ФМ, который сохранит ее функциональное назначение. Также важно отметить, что постсинтетический подход разделяют на два варианта - синтез на носителе и в растворе. Выбор одного из них, во многом, зависит от устойчивости ФМ в условиях финального деблокирования олигонуклеотида (производного/конъюгата) и его постсинтетических обработок.

Независимо от выбранной стратегии коммерческие компании <sup>1</sup> [34–39] поставляют нуклеотидные/ненуклеотидные модификаторы, что значительно облегчает процесс получения целевого конъюгата, однако к продаже предложены только наиболее популярные реакционные группы и ФМ, хорошо зарекомендовавшие себя в широком спектре исследований фундаментального и прикладного назначения. В тоже время различные научные группы, практически на постоянной основе, проводят поисковые разработки, предлагая новые методики синтеза разнообразных lab-made модификаторов НК.

---

<sup>1</sup> Люмипроб, Праймтех, Glen Research, Hongene, ChemGenes, Merck и др.

### 1.1.1 Пресинтетический подход - функционализация олигонуклеотидной цепи с помощью готовых (коммерчески доступных и lab-made) модификаторов

Пресинтетический подход (табл. 1.1) можно охарактеризовать как один из наиболее простых способов введения различных функционально значимых молекул в олигонуклеотиды, поскольку он предполагает непосредственное использование в автоматическом синтезе уже готовых (предварительно полученных) коммерческих или lab-made ФМ-содержащих модификаторов.

Модифицирующие реагенты для олигонуклеотидного синтеза конъюгатов можно разделить на 3 группы: 1) терминирующие фосфитамиды-модификаторы, обеспечивающие введение ФМ на 5'-конец олигонуклеотида без возможности дальнейшего удлинения цепи; 2) внутрицепочечные (линейные или разветвленные) модификаторы, способные к включению в цепь олигонуклеотида в любой выбранной позиции; 3) носители, позволяющие модифицировать 3'-конец олигонуклеотидной цепи.

Самыми простыми, с точки зрения получения, являются терминирующие ненуклеотидные фосфитамиды-модификаторы. Их синтез обычно проводят в одну или две стадии исходя из ФМ, содержащей в своей структуре только одну гидроксильную группу, либо реакционный центр (X), способный реагировать с простыми бифункциональными гидроксилсодержащими молекулами (обычно аминспиртами или диолами) (рис. 1.4А). Для получения внутрицепочечных линейных модификаторов можно использовать бисгидроксилсодержащую ФМ, либо гидроксилсодержащую ФМ с дополнительным реакционным центром (X) в сочетании с аминспиртами или диолами (рис. 1.4Б). При синтезе внутрицепочечных разветвленных модификаторов или функционализированных носителей обычно исходят из ФМ, содержащей в своей структуре реакционный центр (X) (рис. 1.4В). В этом случае в качестве линкера могут выступать нуклеозиды, аминодиолы или триолы.

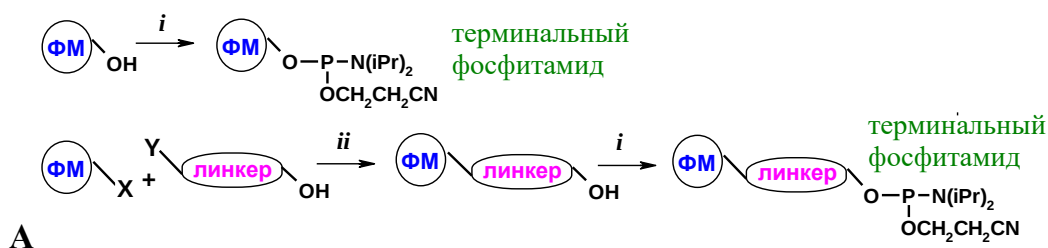


**Рисунок 1.4.** Общие схемы получения ФМ-содержащих модификаторов для автоматического олигонуклеотидного синтеза: *i* – фосфитилирование, *ii* – присоединение линейного или разветвленного линкера к ФМ, *iii* – диметокситритилирование, *vi* – присоединение к носителю (X, Y: реакционноспособные группы).

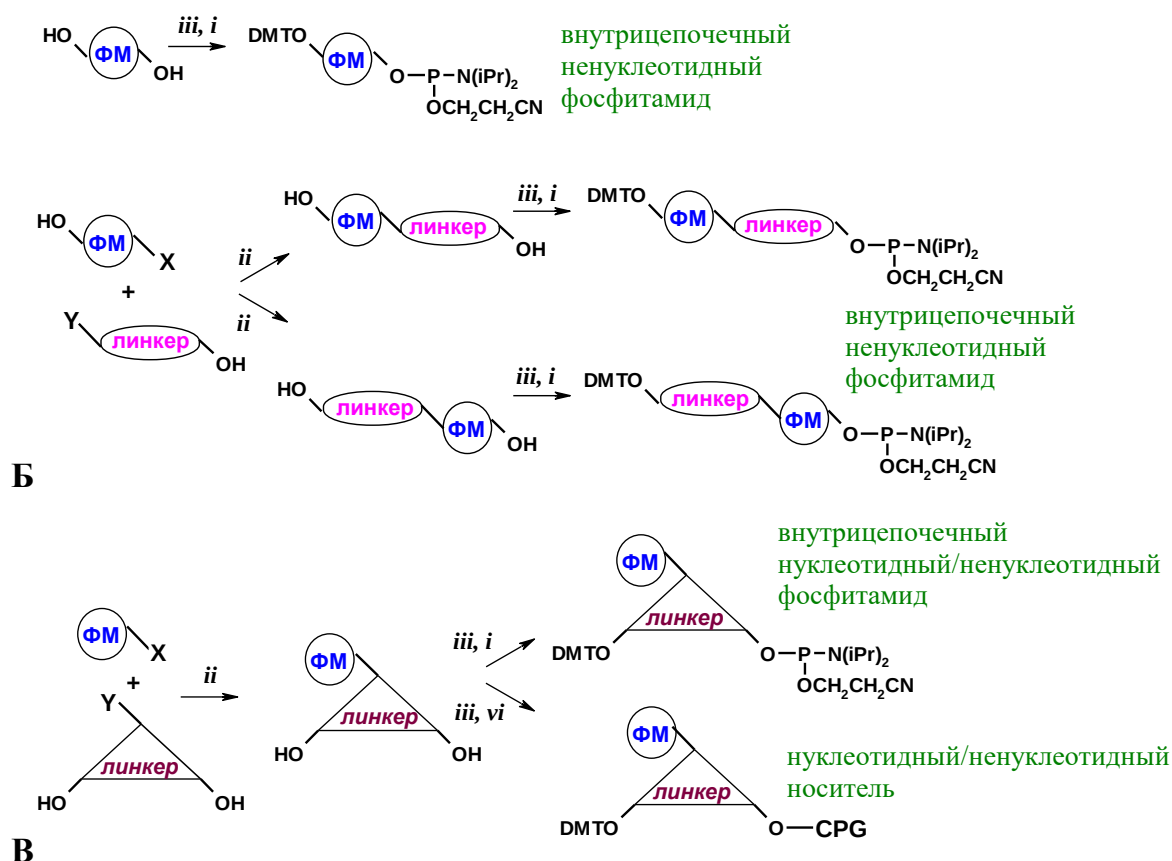


**Рисунок 1.4 (продолжение).** Общие схемы получения ФМ-содержащих модификаторов для автоматического олигонуклеотидного синтеза: *i* – фосфитилирование, *ii* – присоединение линейного или разветвленного линкера к ФМ, *iii* – диметокситритилирование, *vi* – присоединение к носителю (X, Y: реакционноспособные группы).

Как видно, основные различия в модификаторах связаны с их структурой, в частности с линкерной частью (нуклеотидной или ненуклеотидной), которая соединяет фосфитамидную группировку или носитель с ФМ, что влияет на стабильность, пространственное расположение ФМ и функциональные возможности в целом получаемого конъюгата. Например, фосфитамиды красителей и тушителей часто имеют специальные линкеры для оптимального расположения меток в последовательности. Нуклеотидные линкеры имитируют структуру нуклеотидных звеньев, что важно при сохранении физико-химических свойств ДНК или РНК, тогда как ненуклеотидные линкеры обеспечивают дополнительную гибкость и разнообразие вариантов модификации. Таким образом, модификаторы представляют собой многокомпонентные системы, где важна не только химическая природа модифицирующих групп, но и строение линкера, обеспечивающего правильное присоединение и функциональность ФМ (схематично основные сайты для введения ФМ указаны на рис. 1.2).

The figure displays the chemical structures of four DNA probes (I-IV) used for the detection of C5 mutations. Each probe is composed of a DNA handle (DMT-O-ribose-3'-OH), a linker (pink), and a fluorophore/quencher (green).

- Probe I:** FAM fluorophore, DusQ2 quencher.
- Probe II:** FAM fluorophore, FAM quencher.
- Probe III:** SIMA fluorophore, SIMA quencher.
- Probe IV:** Biotin fluorophore, Biotin quencher.

Для коммерческих нуклеотидных ФМ-несущих фосфитаминов и/или носителей довольно популярны группы на основе аминодиолов, позволяющих получать как терминальные, так и внутрицепочечные модификаторы. В частности, 2-(4-аминобутил)-1,3-пропандиол, диэтаноламин и 4-гидрокси-2-(гидроксиметил)-пирролидин хорошо

29

зареккомендовали себя в качестве структурных звеньев, обеспечивающих как возможность последовательного наращивания олигомерной цепи благодаря наличию двух гидроксильных групп в их структуре, так и присоединение ФМ непосредственно по алифатической аминогруппе (рис. 6, структуры I, II), либо через дополнительный линкер (рис. 1.6, структуры III-VI).

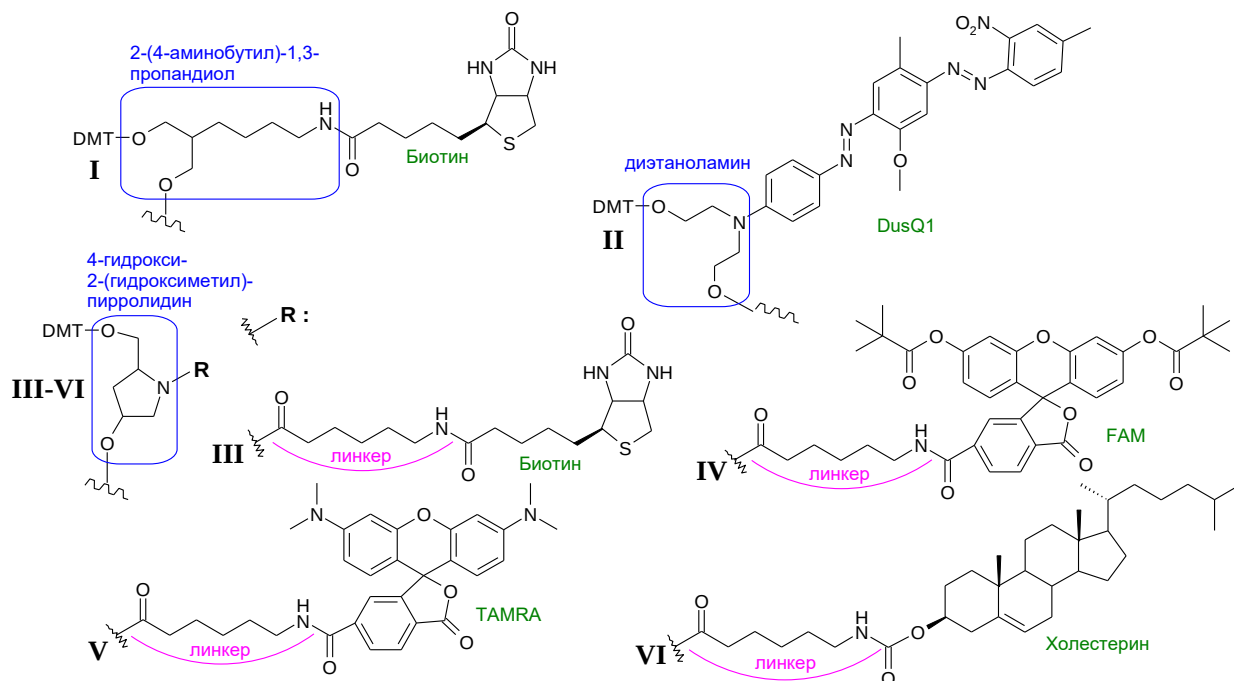


**Рисунок 1.6.** Примеры коммерческих модификаторов на основе аминокдиолов.

Глицерин (1,2,3-пропантриол) и глицидол (2,3-эпоксипропан-1-ол) в сочетании с гликолями также используют в коммерческих модификаторах на основе глицерина, способных к встраиванию в любое положение олигонуклеотидной цепи (рис. 1.7, структуры I, II).

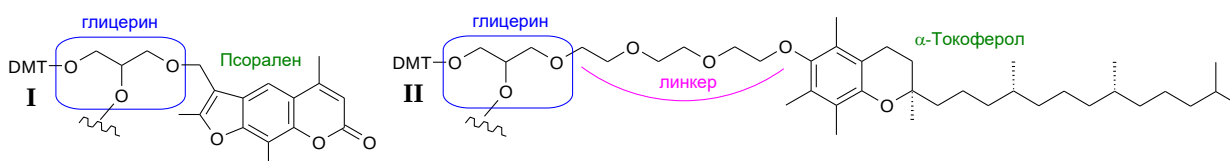


**Рисунок 1.7.** Примеры коммерческих модификаторов на основе глицерина.

Терминирующие модификаторы - фосфитамины, не позволяющие проводить дальнейшее наращивание олигонуклеотидной цепи, - получают, либо используя в качестве линкера аминокспирты или диолы (рис. 1.8, структуры I-VI), либо превращая ФМ (в случае наличия в ее структуре гидроксильной группы) в 5'-концевой модификатор для автоматического синтеза (рис. 1.8, структура VII).

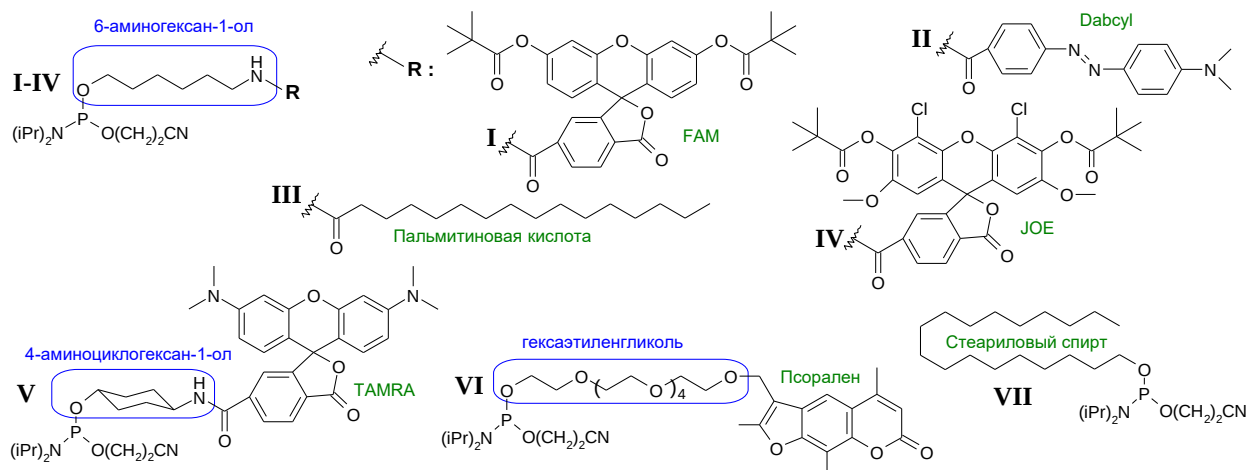


**Рисунок 1.8.** Коммерческие терминирующие фосфитамиды-модификаторы на основе аминоспиртов (I-V), диолов (VI) или гидроксилсодержащей ФМ (VII).

На рисунках 1.5-1.8 приведены примеры коммерческих модификаторов, большая часть которых представляет собой ненуклеотидные синтоны и относится к классу флуоресцентных красителей/тушителей. Таким образом в коммерческом доступе можно найти порядка 100 наиболее распространенных модификаторов для получения конъюгатов олигонуклеотидов различной природы и функциональности.

Также в литературе описано получение и использование в автоматическом синтезе целого ряда lab-made модификаторов. Можно сказать, что 4-гидрокси-2-(гидроксиметил)-пирролидин (гидроксипролинол, получаемый путем восстановления аминокислоты L-гидроксипролина) это одна из самых популярных основ для синтеза различных синтонов, позволяющих удобно ввести остатки ФМ в различные положения олигонуклеотида. Его применение для получения модифицированных фосфитамидов и носителей подробно рассмотрено в работе [93]. В частности, авторы получали биотин-содержащие модификаторы, представленные на рисунке 1.6 (структура III). Синтез фосфитамидов, несущих остатки капроновой (C5) и пальмитиновой (C15) кислот (рис. 1.9, структуры I, II), описан в статье [94]. Остаток холестерина может быть непосредственно [89] присоединен к гидроксипролинолу, либо через линкер на основе аминокaproновой кислоты [90] (рис. 1.9, структуры III, IV). Получение модификаторов, содержащих биотин,  $\alpha$ -токоферол и остатки алифатических цепей (C18) (рис. 1.9, структуры V-VII), описано в работе [95]. Модификаторы на основе гидроксипролинола, содержащие один или несколько остатков N-ацетилгалактозамина (GalNAc) (рис. 1.9, структуры VIII-XI), представлены в целом ряде работ [96–106].

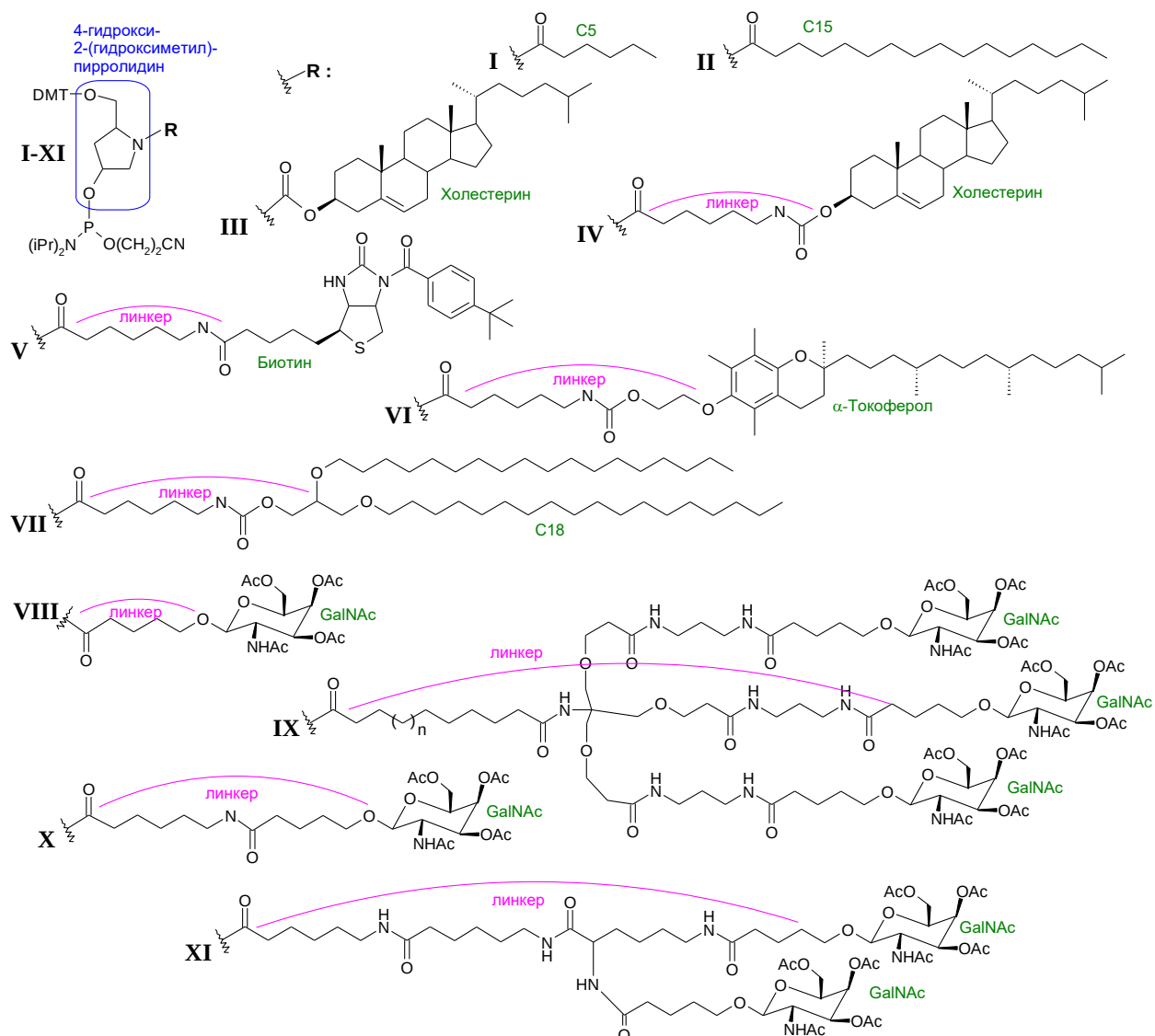


**Рисунок 1.9.** Примеры lab-made модификаторов на основе гидроксипропианола.

Линейный аминодиол 2-(4-аминобутил)-1,3-пропандиол был использован в работе [107] для получения серии модификаторов, содержащих один, два или три остатка миристиновой (Муг), эйкозапентаеновой (ЕРА) или докозагексаеновой (ДНА) кислот (рис. 1.10, структуры I-V). Позднее те же авторы получали модификаторы, содержащие докозагексаеновую (ДНА) кислоту и фосфохолин (рис. 1.10, структура VI) [108].

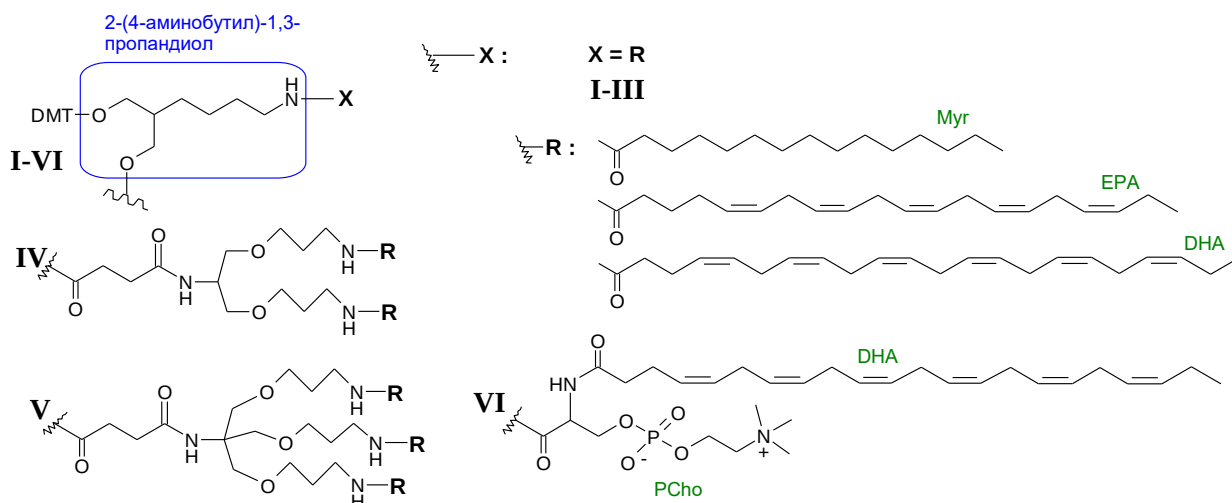


**Рисунок 1.10.** Примеры lab-made модификаторов на основе 2-(4-аминобутил)-1,3-пропандиола.

Для получения холестерин-содержащего модификатора, например, можно использовать короткий аминокдиол, сериол (2-аминопропан-1,3-диол), в сочетании с триглицидным линкером [109] (рис. 11, структура I). Его структурный аналог 3-аминопропан-1,2-диол и D-треонинол (2-аминобутан-1,3-диол) позволили получить модификаторы, содержащие несколько остатков пальмитиновой кислоты (C15) [110] (рис. 11, структура II) или *N*-ацетилгалактозамина [111, 112] (рис. 11, структуры III-V). Фосфитами́д производного фолиевой кислоты также был получен с помощью D-треонинола [112] (рис. 10, структура VI). На основе 4-аминобутан-1,3-диола, полученного восстановлением карбоксильной группы 3-гидрокси-4-аминобутановой кислоты до спиртовой, авторы работы [113] получали фосфитами́д биотина (рис. 11, структура VII).

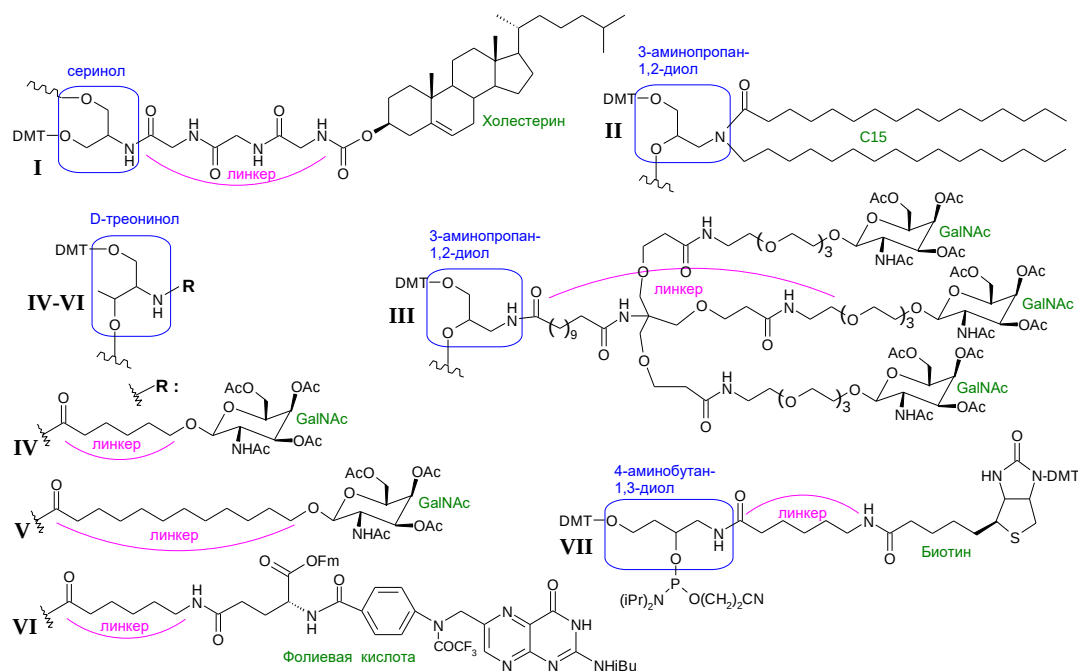


**Рисунок 1.11.** Примеры lab-made модификаторов на основе разветвленных аминокдиолов.

Остаток глицерина так же часто используют как основу при получении lab-made модификаторов. Так, например, с помощью коммерчески доступного солкеталья (защищенная изопропилиденацетальной группой форма глицерина) и 1-бромтетрадекана и октадека-1,13-диенилметансульфоната были синтезированы фосфитамиды и носители на основе глицерина, несущие гидрофобные C14 и C18 алифатические остатки [114, 115] (рис. 1.12, структуры I, II). Используя 3-аминопропилсолкеталь, авторы работы [116] получали фосфитамиды *O*-бис(2-цианоэтил)фосфатного производного тирозина и биотина (рис. 1.12, структуры III, IV). В данном случае в качестве линкера был использован остаток 3-аминопропанола. Используя в качестве разветвителя также 3-аминопропилсолкеталь, можно синтезировать холестерин-модифицированный носитель и фосфитамидный модификатор [109, 117] (рис. 1.12, структура V). Молекулу биотина можно превратить в фосфитамид, исходя из тетраэтиленгликоля и 1-диметокситритил-2,3-эпоксипропанола [118] (рис. 1.12, структура VI).

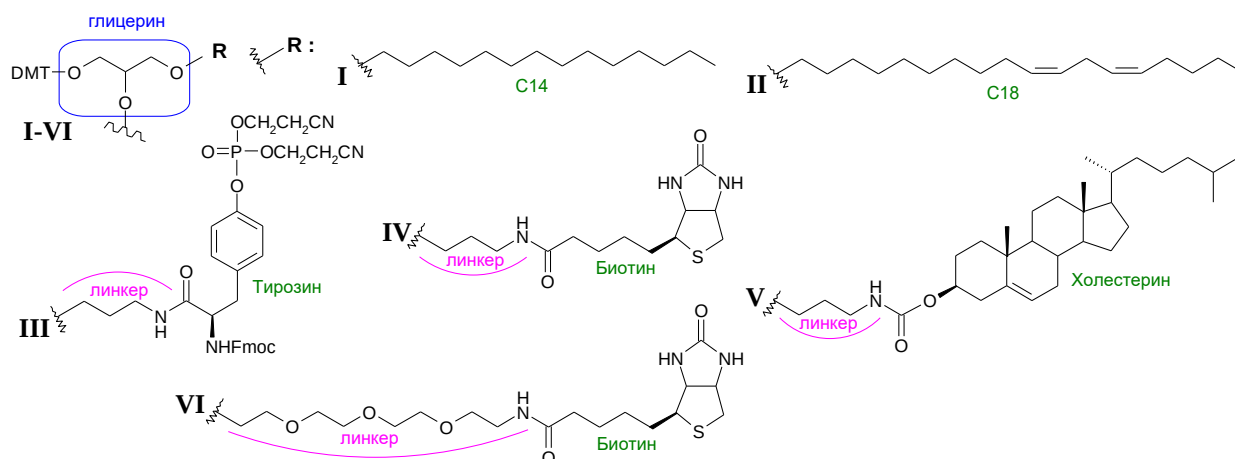


**Рисунок 1.12.** Примеры lab-made модификаторов на основе глицерина.

При синтезе нуклеотидных модификаторов, как правило, для введения различных ФМ используют C5-положение уридина (рис. 1.13, структура I) [95] или 2'-положение рибозы (рис. 1.13, структуры II-V) [101, 112, 119]. В работе [101] авторы вводили холестерин в гетероциклическое основание псевдоуридина (рис. 1.13, структура VI).

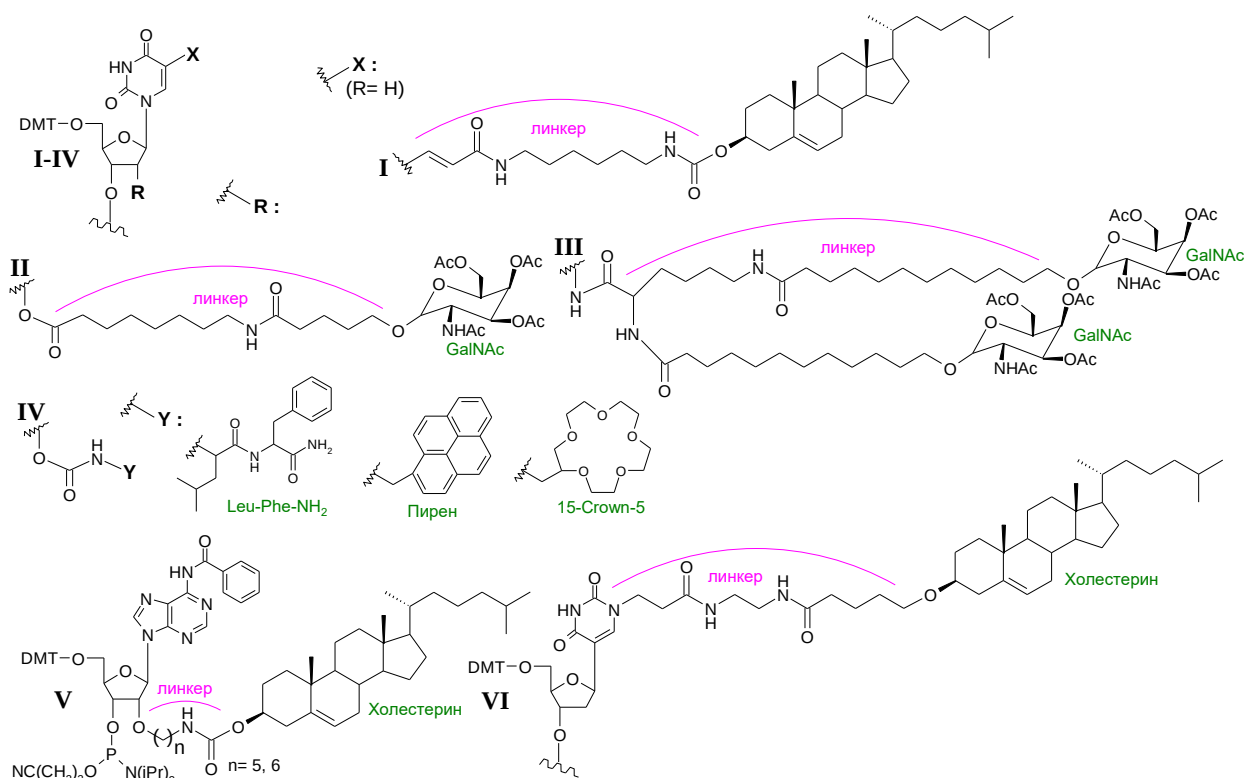


**Рисунок 1.13.** Примеры нуклеотидных lab-made модификаторов.

ФМ, содержащие минимум две реакционноспособные группировки, можно использовать как внутрицепочечную ненуклеозидную вставку, создавая непосредственно на ее основе фосфитами, пригодный для автоматического синтеза. Например, литохолевую кислоту можно использовать как модификатор либо восстановив карбоксильную группу в ее составе до первичной гидроксильной (рис. 1.14, структура I) [120], либо введя по ней аминоспирт (рис. 1.14, структура II) [121]. В работе [120] авторы получали ненуклеотидную внутрицепочечную вставку на основе 12-гидроксилауриновой кислоты (C11) (рис. 1.14, структура III).

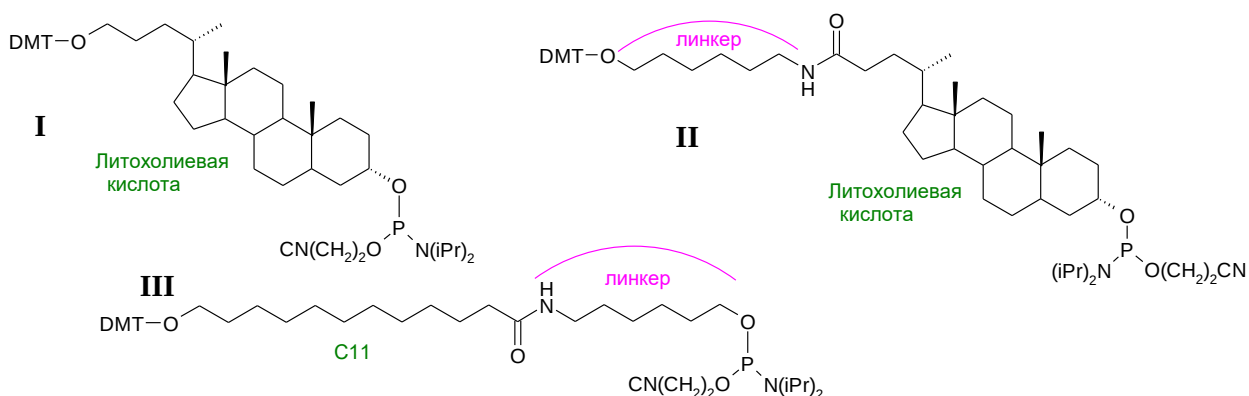


**Рисунок 1.14.** Примеры ненуклеотидных внутрицепочечных lab-made модификаторов.

В работах [122–124] с использованием диэтилоксалата в сочетании с диэтаноламином была предложена схема получения циклического 4-(2-гидроксиэтил)морфолин-2,3-диона –

универсальной основы для создания ненуклеотидных концевых и/или внутрицепочечных модификаторов (рис. 1.15). Последовательное введение защитной диметокситритильной группы, открытие лактонового кольца в присутствии ФМ, содержащей алифатическую аминогруппу (подраздел 1.1.2.1), и фосфитилирование/прикрепление к носителю приводит к получению серии унифицированных ахиральных ненуклеотидных модификаторов, функциональные свойства которых определяются природой введенной ФМ.

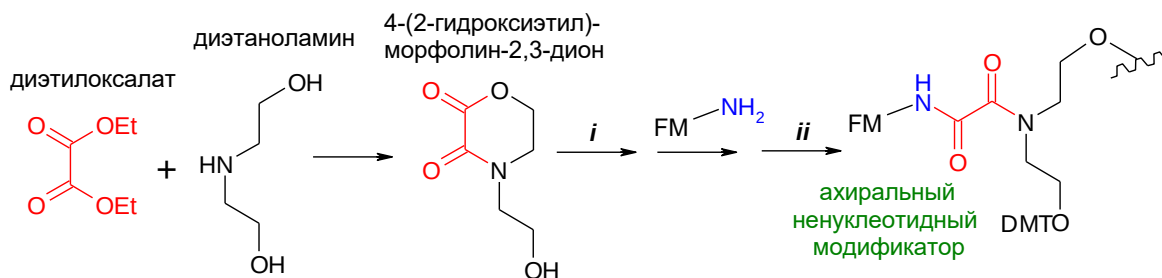


**Рисунок 1.15.** Схема получения ахиральных ненуклеотидных модификаторов на основе 4-(2-гидроксиэтил)морфолин-2,3-диона (*i*: введение защитной диметокситритильной группы; *ii*: фосфитилирование или прикрепление к носителю).

Несколько ФМ можно объединить в один бинарный модификатор [120, 125]. Комбинация хлестовой кислоты и D-галактозы позволили получить 5'/3'-концевые модификаторы (рис. 1.15, структуры I, II) [125]. Авторы работы [120] также сконструировали структурный аналог липидов мембраны, используя комбинации 12-гидроксиллауриновой кислоты (C11) и ди-*n*-дециламина (C10) (рис. 1.16, структура III).

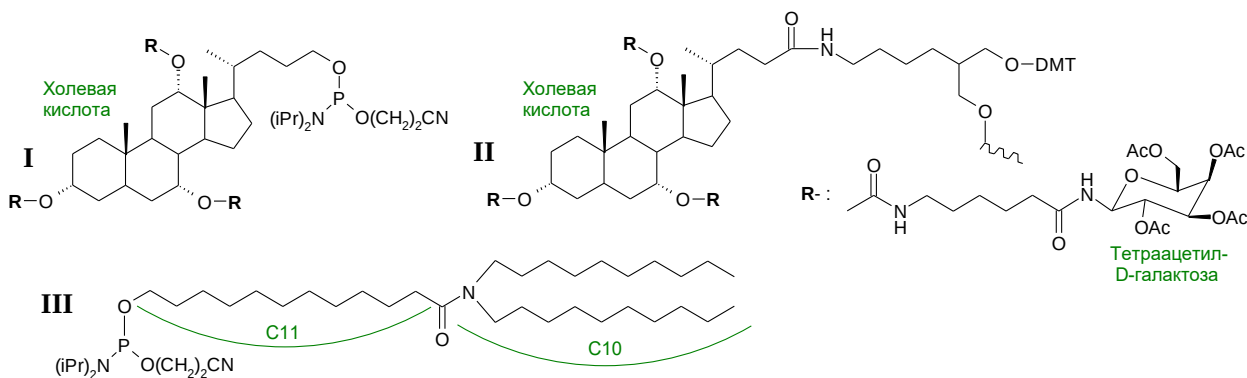


**Рисунок 1.16.** Бинарные lab-made модификаторы.

Наличие гидроксильной группы в структуре ФМ позволяет получать терминирующие фосфитамиды-модификаторы для автоматического синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов. Так, например, были получены модификаторы, содержащие остатки холестерина [126–129] и  $\alpha$ -токоферола [129–131] (рис. 1.17, структуры I, II). ФМ также можно модифицировать аминспиртами или диолами (в частности, гликолями) для увеличения расстояния между ФМ и олигонуклеотидом. Например, на рисунке 1.17

(структуры III-VIII) приведены примеры терминирующих фосфитамидов с остатками холестерина,  $\alpha$ -токоферола и *N*-ацетилгалактозамина [102, 132–135].

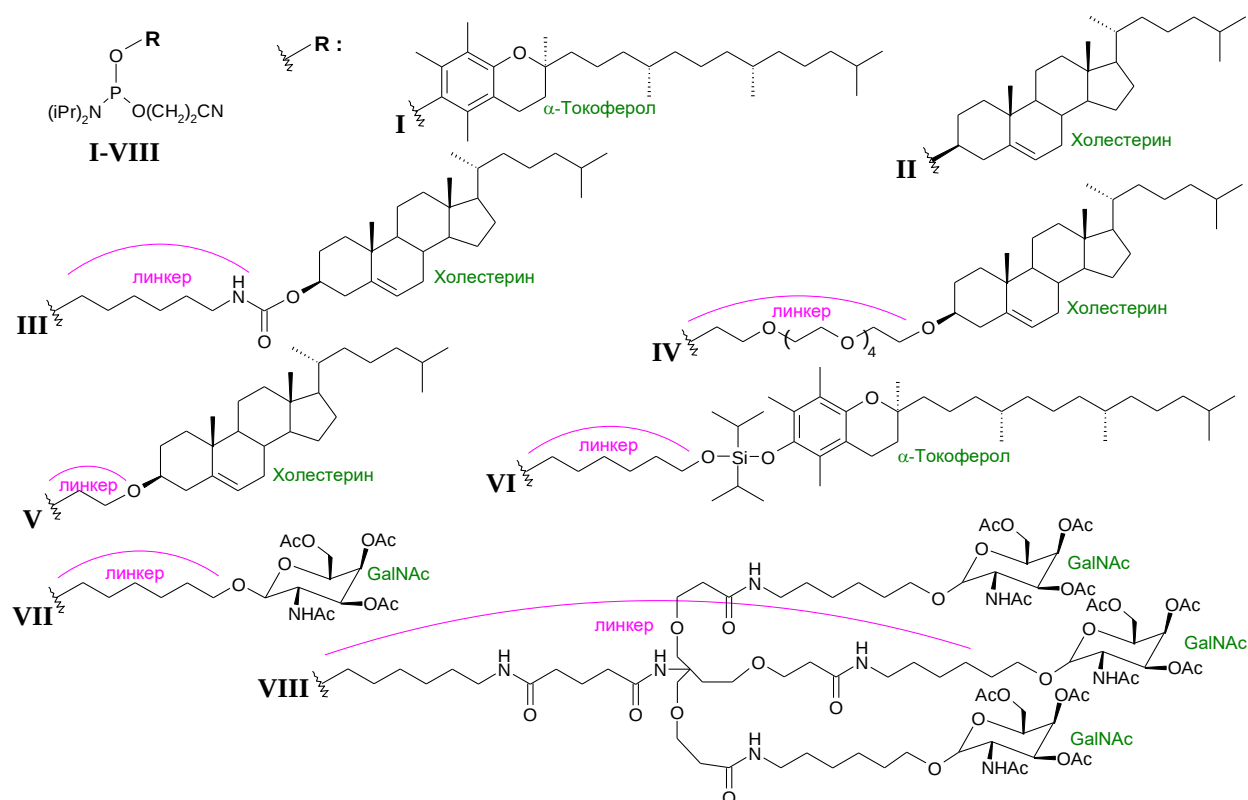


**Рисунок 1.17.** Примеры терминирующих ненуклеотидных lab-made модификаторов.

Резюмируя раздел по применению *пресинтетического* подхода к получению конъюгатов олигонуклеотидов с различными остатками ФМ можно заключить, что в коммерческом доступе, как правило, всегда есть модификаторы, содержащие различные, в определенной степени унифицированные, остатки красителей, тушителей, гидрофобизаторов, биоспецифичность определяющих молекул и др. Lab-made модификаторы в основном представляют собой остатки ФМ, гарантирующие гидрофобность-обеспеченную или рецептор-определяемую доставку олигонуклеотидного производного внутрь клетки-мишени.

### 1.1.2. Постсинтетический подход - комплексные стратегии получения функционализированных олигонуклеотидов

Несмотря на удобство использования и широкий спектр коммерчески доступных модификаторов, позволяющих получать в рамках *пресинтетического* подхода конъюгаты различной функциональности, тем не менее не удастся в полной степени решить все задачи, стоящие перед исследователями и разработчиками. Довольно часто возникает необходимость предварительно, в ходе автоматического синтеза, получать олигонуклеотидное производное, которое уже постсинтетически может быть превращено в

конъюгат с ФМ. *Постсинтетический* подход к конъюгированию олигонуклеотидов (как на носителе, так и в растворе, табл. 1.1) применяют в случае, если вводимая ФМ несовместима с химическими реакциями, лежащими в основе олигонуклеотидного синтетического цикла и/или процедурой его финального деблокирования (рис. 1.1). Данный подход представляет собой комплексную стратегию, во многом случай-зависимую, и, как следствие, разнонаправленную. Для каждого конъюгата прорабатываются варианты получения, учитывающие тип и размещение реакционноспособных группировок в паре олигонуклеотид/ФМ-остаток (рис. 1.18). При этом, в первую очередь, планируя синтетический протокол, следует отталкиваться от структурных особенностей ФМ, определяя оптимальные пути ее возможной модификации. Более того, стоит учитывать, что наиболее приемлемым вариантом предварительной модификации олигонуклеотида является тот, который обеспечивает максимальный выход синтеза соответствующего ДНК/РНК-производного и его глубокую конверсию при взаимодействии с активированным остатком ФМ.

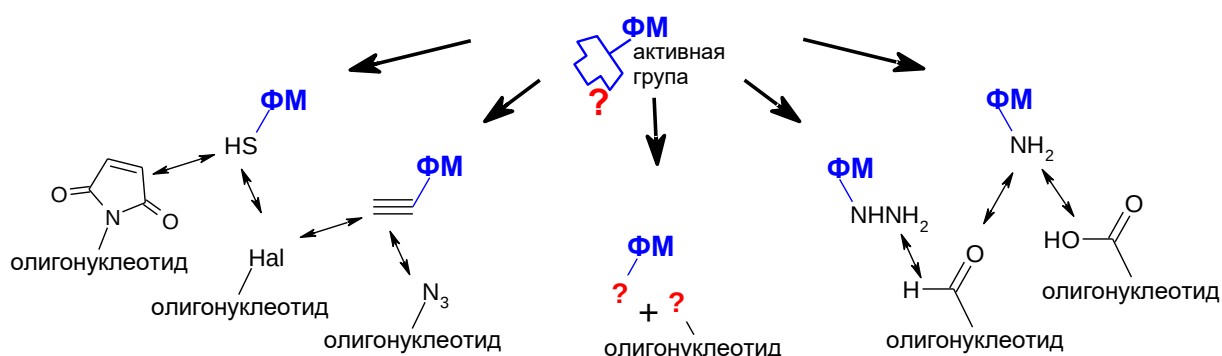


**Рисунок 1.18.** Типичные варианты получения конъюгатов (Hal: атом галогена).

Наиболее распространенными реакционноспособными группами для постсинтетической конъюгации являются: карбоксильные, гидроксильные, альдегидные, алкиламино-, гидразидо- или азидогруппы, атомы галоида (алифатической или алкенильной природы), а также алкинильная или фосфатная группировки. Можно выделить следующие варианты реакционноспособных пар, позволяющих проводить успешное конъюгирование олигонуклеотида и ФМ: алкил-NH<sub>2</sub>/карбоксильная группа, алкил-NH<sub>2</sub>/гидроксильная группа, алкил-NH<sub>2</sub>/галогенид, алкил-NH<sub>2</sub>/альдегид, гидразид/альдегид, алкинил/азид, алкинил/галогенид, тиол/галогенид, тиол/малеимид, тиол/тиол, алкил-NH<sub>2</sub>/фосфат, алкил-NH<sub>2</sub>/фосфит, фосфит/азид. В своем большинстве эти пары реакционно комплементарны, что дает возможность их ортогонального попарного расположения в системе олигонуклеотид/остаток-ФМ для обеспечения химической реакции между ними при получении целевого соединения. Постсинтетический подход широко применим и

позволяет эффективно получать конъюгаты олигонуклеотидов с разнообразными функциональными группами, как на этапе твердофазного синтеза, так и после деблокирования и выделения реакционноспособного олигонуклеотидного производного (напр., [31, 33, 136–139]).

Также следует отметить, что возможно получать не только монофункционализированные производные, но и олигомеры, несущие несколько биологически значимых остатков ненуклеозидной природы. В этом случае стратегия их получения должна основываться либо на разнесении стадий модификации по этапам синтеза олигомера (пре/пост-синтетический), либо, на использовании стратегии применения набора "химически-ортогональных" пар группировок сугубо в рамках пост-синтетического превращения. В качестве таких "химически-ортогональных" группировок, определяющих парность конъюгирования, следует рассматривать, например, карбокси-/алифатическая амино- и алкил-/азидо-группы, поскольку взаимодействие в таких парах может происходить в строго специфических условиях.

Важным этапом планирования получения конъюгата с остатком ФМ, следует рассматривать особенности структурной организации последней. Введение в состав олигонуклеотидного производного остатка ФМ должно обеспечить появление специфических свойств составной молекуле. То есть, с точки зрения ФМ-остатка важно понимать какие группировки в его составе могут служить сайтами конъюгирования, модификация которых не приведет к потере его биологически значимой функции.

#### 1.1.2.1. Сочетание алкил-NH<sub>2</sub>/карбоксильная группа

В синтезе олигонуклеотидных конъюгатов нашла широчайшее применение реакция органической химии, приводящая к образованию ковалентной амидной связи, - взаимодействие молекул с амино- и карбоксильной группами (рис. 1.19).

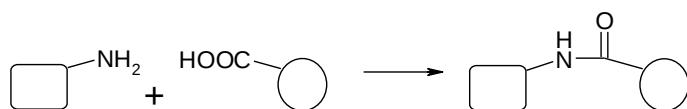


**Рисунок 1.19.** Взаимодействие молекул, содержащих амино- и карбоксильную группы с образованием амидной связи ( $\square, \bigcirc$ : олигонуклеотид или ФМ, здесь и далее).

Классическим вариантом получения конъюгатов НК является ацилирование олигонуклеотидов, содержащих алифатическую аминогруппу в различных положениях олигонуклеотидной цепи, ФМ, с использованием их активированных карбокси-производных (рис. 1.20). Такой вариант конъюгации крайне широко используется и эффективен, в том числе, при постсинтетическом получении производных, например, с

красителями цианинового ряда Cy7 и Cy7.5, когда ФМ-остаток не стабилен в рамках процедуры автоматического синтеза НК.



**Рисунок 1.20.** Схематичное изображение взаимодействия аминоксодержащего олигонуклеотида и ФМ с активированной карбоксильной группой (X – активирующая группа).

На рисунке 1.21 представлены примеры структур коммерчески доступных фосфитаминов/носителей, позволяющих после синтеза, деблокирования и выделения получать аминоксодержащие олигонуклеотиды. Нуклеотидные модификаторы позволяют проводить введение  $\text{NH}_2$ -групп в любое положение олигонуклеотидной цепи, включая 3'- и 5'-концы. В качестве сайтов для введения ФМ в нуклеотидах как правило используют C5-положение пиримидинов рибо- (структура I) или дезоксирибо-ряда (структуры II, III), N4-положение цитидина (структура IV), N2- или C8- положения пуринов (структуры V и VI). Модификаторы на основе аминоксидиолов (гидроксипролин (структура VII) и серин (структура VIII)) также позволяют вводить аминоксодержащую группу в составе ненуклеотидной вставки в любое положение олигонуклеотидной цепи. Используя аминокспирты, содержащие 3, 6 или 12 атомов углерода, к продаже предлагаются соответствующие терминирующие коммерческие аминоксодификаторы (структуры IX-XV). Использование гликолей (структура XVI) позволяет увеличить гидрофильность аминоксодификатора. Также для удобства исследователей помимо модификаторов со стандартными щелочелавильными (фталимидной и трифторацетильной, например, структуры IX и X) защитными группами предлагаются модификаторы с кислотолавильными защитами (монометокситритильной и 4,4'-диметокси-4''-сульфонил-тримитильной, структуры XII, XIII) или флуоренилметоксикарбонильной защитной группой (структура XI), способной к избирательному удалению слабыми основаниями, такими как пиперидин, без воздействия на большинство других защитных групп. Использование защитных групп различной стабильности дает возможность селективно деблокировать аминоксодержащую группу в то время как весь олигонуклеотид защищен или наоборот.

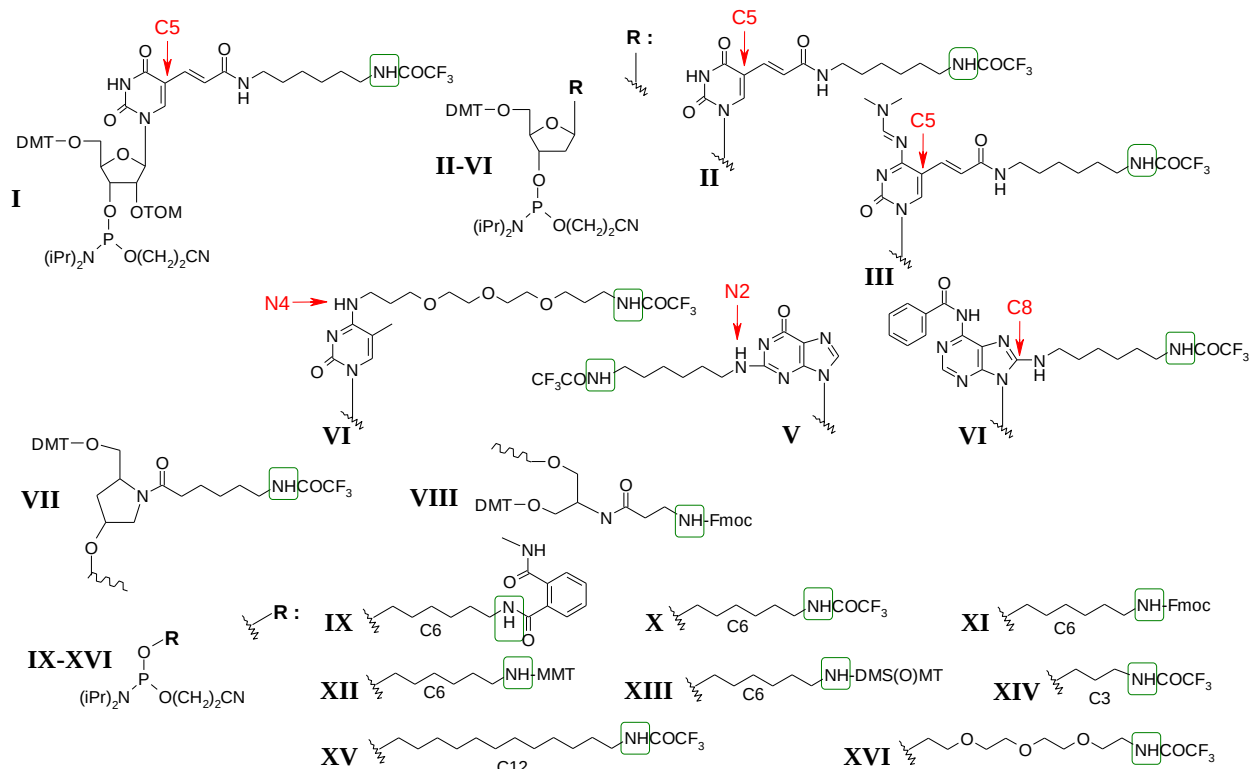


**Рисунок 1.21.** Примеры структур коммерчески доступных аминоксодержащих фосфитаминов/носителей нуклеотидной (структуры I-VI) и ненуклеотидной (структуры VII-XVI) природы.

При синтезе lab-made аминоксодификаторов самый простой и минимальный вариант для введения в качестве ненуклеотидной вставки аминоксодержащей группы в любое положение олигонуклеотида предложен в работах [140, 141] и основан на использовании 3-аминопропил-1,2-диола (рис. 1.22, структура I). Использование 2-(2-(2-хлорэтокси)этокси)этанола позволило авторам работы получить модифицированный по фосфату фосфитаминов тимидина (рис. 1.22, структура II). В работе [142], взяв за основу 2,3-дигидрокси-4-(гидроксиетил)-1-аминоциклопентан, был получен рибозуранозный аналог - 1'-аминокарбонциклический рибозуфосфитаминов, содержащий в C1'-положении замаскированную аминоксодержащую группу (рис. 1.22, структура III). Для получения 5'-терминирующего бисаминосодержащего lab-made модификатора (рис. 1.22, структура IV) авторы [143] использовали  $\beta$ -аланин и 1,3-диамино-2-пропанол.

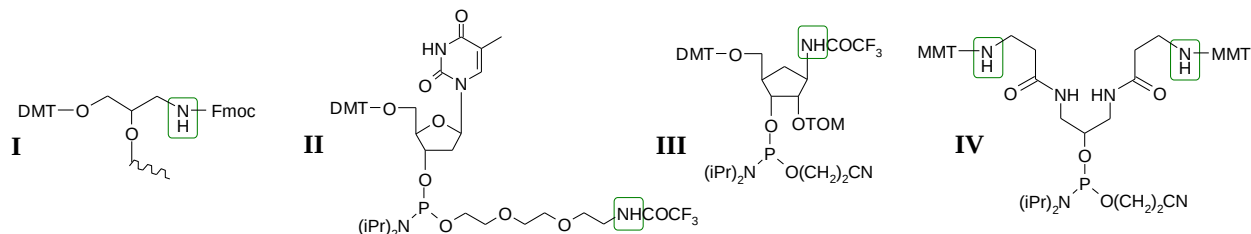


**Рисунок 1.22.** Примеры структур аминоксодержащих lab-made фосфитаминов/носителей нуклеотидной (структуры II, III) и ненуклеотидной (структуры I, IV) природы.

The image displays the chemical structures of several fluorescent dyes and their derivatives, arranged in a grid-like fashion. The structures are as follows:

- Top Left:** A chemical structure of a carbodiimide derivative,  $\text{R-O-C(=O)-N=C=S}$ , with a wavy line indicating a connection point.
- Top Middle:** A chemical structure of a cyanine dye, **Cy 7**, featuring a central benzene ring with a  $\text{BF}_4^-$  counterion, and two indole-like rings at the ends, each with a wavy line indicating a connection point.
- Top Right:** A chemical structure of a cyanine dye, **Cy 3**, similar to Cy 7 but with a different indole-like ring system, also featuring a  $\text{BF}_4^-$  counterion and wavy lines.
- Middle Left:** A chemical structure of a biotin derivative, **Биотин**, consisting of a biotin ring system with a wavy line indicating a connection point.
- Middle Middle:** A chemical structure of a dye, **DusQ1**, featuring a central benzene ring with a wavy line, and two indole-like rings at the ends, each with a wavy line indicating a connection point.
- Middle Right:** A chemical structure of a dye, **ROX**, featuring a central benzene ring with a wavy line, and two indole-like rings at the ends, each with a wavy line indicating a connection point.
- Bottom Left:** A chemical structure of a chelator, **DOTA**, consisting of a central nitrogen atom with four wavy lines indicating connection points.
- Bottom Middle:** A chemical structure of a dye, **TAMRA**, featuring a central benzene ring with a wavy line, and two indole-like rings at the ends, each with a wavy line indicating a connection point.
- Bottom Right:** A chemical structure of a dye, **FAM**, featuring a central benzene ring with a wavy line, and two indole-like rings at the ends, each with a wavy line indicating a connection point.

**Рисунок 1.23.** Примеры структур коммерчески доступных сукцинимидных эфиров ФМ.

Комбинируя различные по структурам amino- и сукцинимидные составляющие, представленный вариант конъюгирования (общая схема, рис. 1.20) позволяет получать широкий спектр конъюгатов, поскольку в арсенале коммерческих фирм можно найти более 60 различных NHS-эфиров, включая производные пирена, биотина, флуоресцентных красителей и тушителей и др.

Получение активированных эфиров ФМ для модификации олигомеров возможно с применением карбодиимидов, реагирующих с карбоновыми кислотами с образованием промежуточного высокореакционноспособного производного *O*-ацилизо мочевины. В настоящее время, применительно к синтезу конъюгатов олигонуклеотидов, в качестве активирующих агентов для карбоксигрупп [148] в составе ФМ наиболее часто используют *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (DCC), *N,N'*-диизопропилкарбодиимид (DIC) и водорастворимый 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид (EDCI) (рис. 1.24).

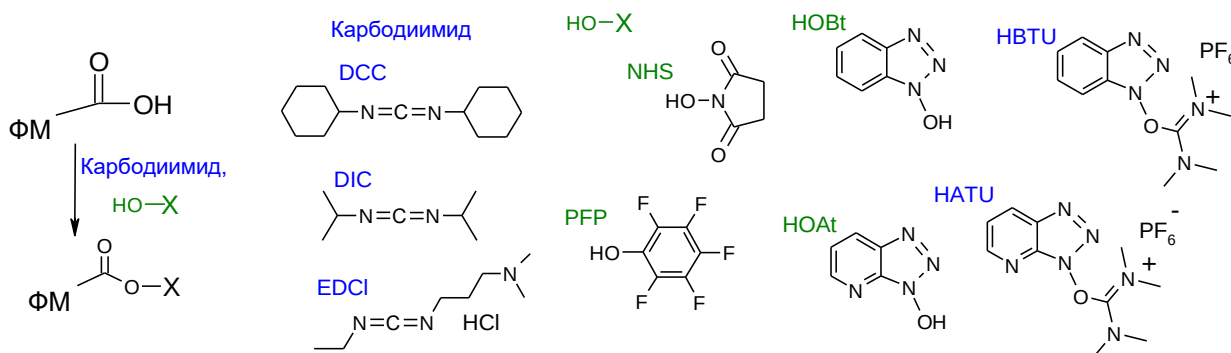


**Рисунок 1.24.** Общая схема синтеза активированных производных кислот.

DCC [149, 150] был одним из первых карбодиимидов, примененных в качестве активирующего реагента для образования амидной  $-C(O)-NH-$  связи. Данный реагент хорошо растворим в широком наборе органических растворителей (дихлорметан, тетрагидрофуран, ацетонитрил, диметилформамид и др.), но нерастворим в водных растворах. При использовании DCC следует учитывать, что получаемая как побочный продукт реакции *N,N'*-дициклогексилмочевина не растворима в большинстве органических растворителей, поэтому использование DCC несовместимо с гетерофазным вариантом синтеза конъюгатов. DIC [151] даже сам по себе представляет собой бесцветную жидкость, которую можно использовать в твердофазном синтезе, а продукт активации карбоксифункции - 1,3-диизопропилмочевина - растворим в обычных органических растворителях и легко удаляется на этапе промывочных процедур. Водорастворимый EDCI [152, 153] эффективно активирует карбоновые кислоты в водных и водно-органических средах.

Также при образовании  $-C(O)-NH-$ связи с использованием карбодиимидов часто применяют дополнительные реагенты (соактиваторы), повышающие эффективность реакции, снижающие рацемизацию и образование побочных продуктов (например, образование *N*-ацилмочевины) и увеличивающие выход целевого продукта (рис. 1.24). Сочетание карбодиимида и *N*-гидроксисукцинимид (NHS) [154, 155] или пентафторфенола (PFP) [156] позволяет получать NHS- или PFP-активированные эфиры карбоновых кислот,

обладающие относительной устойчивостью к хранению при пониженной температуре в сухих условиях. Поскольку при активации карбодиимидом существует возможность рацемизации активированной аминокислоты [148], то целесообразно использование соединений, таких как 1-гидроксibenзотриазол (HOBt [157]) и 1-гидрокси-7-аза-бензотриазол (HOAt [158]), препятствующих подобной трансформации и определяющих активность соответствующего сложного эфира, который впоследствии вступает в реакцию с алифатической аминогруппой с образованием амидной связи. В настоящее время на основе этих соединений создан отдельный класс активирующих агентов - тетраметилуроний гексафторфосфат-производных (2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний гексафторфосфат (HBTU [159–161]) и 2-(1*H*-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилуроний гексафторфосфат (HATU [161, 162])), характеризующихся низкой степенью рацемизации.

Окисление альдегидной группы в составе ФМ до карбоксильной можно провести с помощью мягкого окислителя, реактива Толленса (аммиачного раствора оксида серебра) [163]. Соединения, содержащие гидроксильные группы, можно сразу превратить в активированные производные, способные к взаимодействию с аминокислотной компонентой, используя, например, карбонилдиимдазол (CDI) [164–169] или *N,N*-дисукцинимидилкарбонат (DSC) [170–175] (рис. 1.25), представляющие собой диимдазолид или NHS-эфир угольной кислоты, соответственно. Оба этих реагента получают в несколько стадий из фосгена. DSC представляет собой белое твердое не гигроскопичное вещество, мало растворимое в воде, в то время как CDI очень чувствителен к влаге.

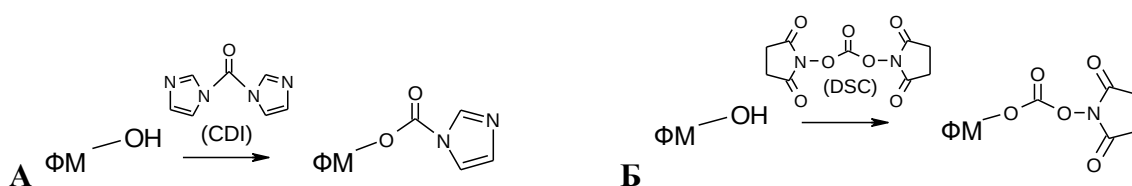


**Рисунок 1.25.** Схемы синтеза активированных производных ФМ с использованием карбонилдиимдазола (А) или *N,N*-дисукцинимидилкарбоната (Б).

Реакции, приведенные на рисунках 1.24 и 1.25, проходят быстро и эффективно, не требуют специфических реагентов и зачастую, при использовании эквивалентных количеств активирующих агентов (карбодиимиды, CDI, DSC) и карбоксил/гидроксил-содержащих ФМ, очистки полученных активированных производных ФМ, позволяя использовать их *in situ* в реакциях с аминокислотными олигонуклеотидами.

Инвертированный вариант взаимодействия карбоксилсодержащих олигонуклеотидов и аминомодифицированных ФМ позволяет получать конъюгаты в гетерофазном варианте (рис. 1.26).



**Рисунок 1.26.** Схематичное изображение взаимодействия аминомодифицированного ФМ с олигонуклеотидом, содержащим активированную карбоксильную группу (X – активирующая группа).

Для введения модификаций как на 5'-конец, так и в середину олигонуклеотидной цепи предлагаются к использованию коммерческие карбоксисодержащие фосфитамиды-модификаторы (рис. 1.27), которые можно использовать в ходе автоматического синтеза олигонуклеотидов. 5'-Карбокси-модификатор C10 (структура I) и NHS-карбокси-dT (структура II) содержат в своем составе *N*-гидроксисукцинимидный эфир активированной карбоновой кислоты, пригодный для конъюгирования полученных после автоматического синтеза олигонуклеотидов с молекулами, содержащими аминогруппу с образованием стабильной амидной связи. 2-Хлортритильная группа 5'-карбокси-модификатора C5 (структура III) является защитной и удаляется в процессе стандартного цикла деблокирования с получением свободной карбоксильной группы на полностью защищенном носитель-связанном олигонуклеотиде. После ее активации, например, также *N*-гидроксисукцинимидом в присутствии карбодиимидов, она также способна реагировать с аminosодержащими ФМ.

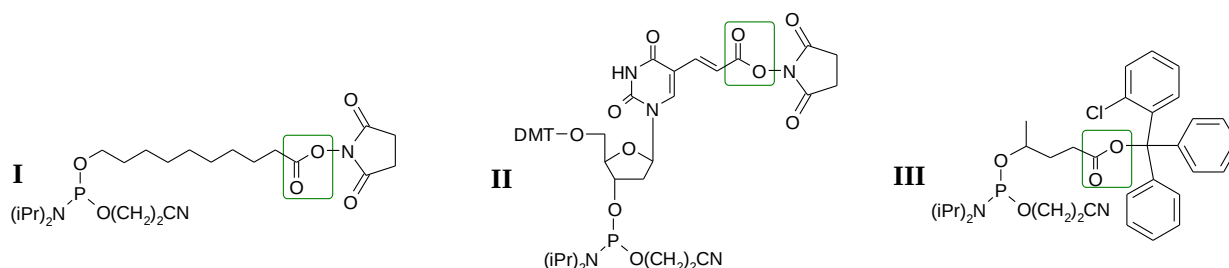


**Рисунок 1.27.** Структуры коммерчески доступных 5'-концевых (I, III) и внутрицепочечного (II) карбоксисодержащих фосфитамидов.

Получение замаскированной карбоксильной группы в lab-made варианте для 2'-положения рибозы описано в работе [176] (рис. 1.28). Удаление 2'-*O*-аллильной защитной группы в присутствии  $\text{Pd}[\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3]_4$ /морфолин позволило авторам получать конъюгаты с гистамином, спермином, пиреном и короткими пептидами.

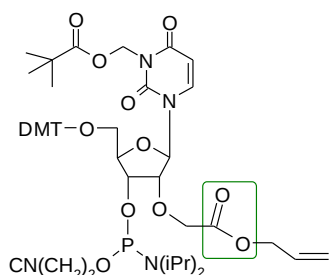


**Рисунок 1.28.** Структура 2'-карбоксисодержащего фосфитамидного lab-made модификатора.

В качестве примеров коммерчески доступных аминосодержащих ФМ можно привести полиоксиэтиленамин биотина, додециламин, олеиламин, O-(2-аминоэтил)-O'-метилполиэтиленгликоль (PEG), дибензооктинамин (DBCO), 1-(3-аминопропил)имидазол, пиренметиламин (рис. 1.29).

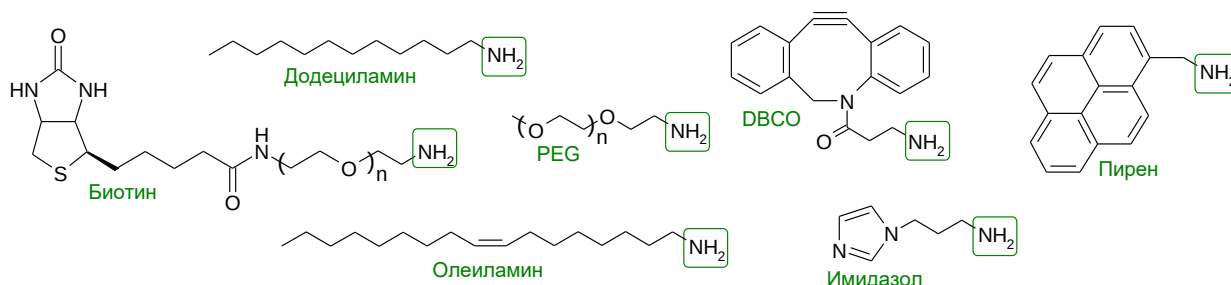


**Рисунок 1.29.** Примеры структур коммерчески доступных аминов.

Среди стандартных вариантов lab-made получения амино-содержащих производных ФМ стоит указать следующие [177] (рис. 1.30): **1)** прямое и не прямое алкилирование: взаимодействие первичных и вторичных алкилгалогенидов с аммиаком (прямое алкилирование, реакция А.Гофмана [178]); алкилирование фталимида калия под действием алкилгалогенидов с образованием N-алкилфталимида, который далее превращается в первичный амин при взаимодействии с гидразингидратом в спиртовом растворе (непрямое алкилирование, синтез первичных аминов по Габриэлю [179]); **2)** каталитическое аминирование спиртов: при пропускании смеси паров спирта и аммиака через нагретые окислы двухвалентных и трехвалентных металлов (чаще всего алюминия или тория), играющие роль катализаторов [180]; **3)** восстановительное аминирование карбонильных соединений: действием аммиака на альдегиды с одновременным восстановлением водородом (процесс протекает через стадию образования иминов (оснований Шиффа)), которые восстанавливают водородом в присутствии катализаторов гетерогенного гидрирования [181, 182]; **4)** восстановительное аминирование карбоксилсодержащих соединений по реакции Шмидта, исходно основанное на взаимодействии карбоновой кислоты с азотистоводородной кислотой в кислых условиях через промежуточный изоцианат с образованием амина и с сопутствующим выделением азота и  $\text{CO}_2$  [183, 184];

5) расщепление амидов кислот по Гофману: амиды кислот под действием щелочных гипохлоритов (гипобромитов) или галоидов в щелочной среде образуют первичные амины, содержащие на один атом углерода меньше, чем исходный амид [185]; 6) восстановление нитросоединений: с помощью каталитического гидрирования (катализаторы - медь на силикагеле, никель в комбинации с оксидами ванадия и алюминия, оксид платины (IV), никель Ренея) или действием восстанавливающих агентов (металлы (олово, цинк, железные опилки) или соли металлов в присутствии кислот и воды); для восстановления нитрогрупп в ароматических системах также используют гидросульфиды и дисульфиды щелочных металлов [186–188]; 7) восстановление нитрилов: каталитическое гидрирование, либо с помощью алюмогидрида лития в эфире или боргидрида натрия [189, 190]; 8) восстановление оксимов алюмогидридом лития или цианборгидридом натрия [191]; 9) восстановление азидов с помощью алюмогидрида лития [192] или под действием иодоводородной кислоты [193]; 10) термическое разложение азидов карбоновых кислот (перегруппировка Курциуса [194–199]): перегруппировка ацилазида при нагревании с потерей газообразного азота в изоцианат, и последующее декарбоксилирование образующихся карбаминовых кислот при взаимодействии изоцианата с водой.

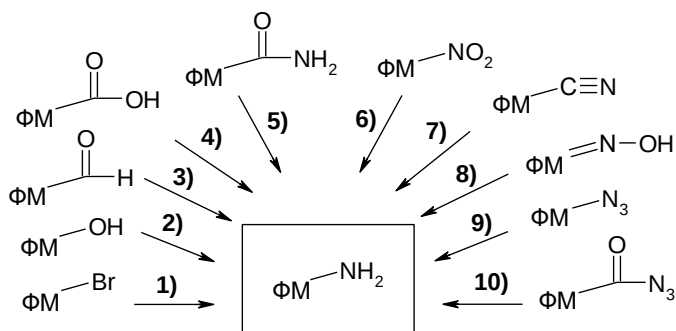


**Рисунок 1.30.** Общие схемы получения ФМ, содержащих в своем составе аминогруппу.

История амидной (пептидной,  $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ ) связи как таковой берет начало в конце XIX века, когда немецкий химик E.Fischer [200] экспериментально доказал существование пептидных связей и разработал общий метод, при помощи которого стало возможным синтезировать пептиды в лабораторных условиях. Это открытие стало не только фундаментом для дальнейшего изучения пептидов, но и впоследствии позволило использовать весь накопленный опыт при синтезе конъюгатов олигонуклеотидов с различными ФМ-остатками (в том числе олигонуклеотид-пептидных конъюгатов [201–203]), и даже привело к созданию пептидил-нуклеиновых кислот (PNA) - синтетических электронейтральных аналогов ДНК, в которых углеводофосфатный остов заменен псевдопептидным [204–208].

### 1.1.2.2. Сочетание алкил-NH<sub>2</sub>/гидроксильная группа

Данную пару можно использовать для конъюгирования исключительно в гетерофазном варианте.

В литературе описано получение 5'- или 2'-конъюгатов олигонуклеотидов, используя активацию с помощью CDI 5'- или 2'-гидроксильной группы связанного с носителем защищенного олигонуклеотида, полученного в рамках автоматического синтеза (рис. 1.31). Активированные таким образом производные олигонуклеотидов могут далее реагировать с молекулами, содержащими как первичные, так и вторичные, аминогруппы в довольно мягких условиях.

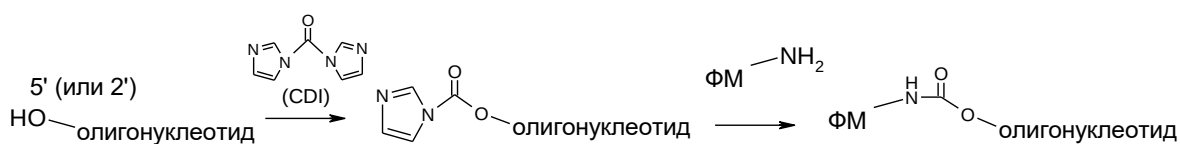


**Рисунок 1.31.** Схематическое изображение синтеза 5'/2'-конъюгатов олигонуклеотидов, основанного на активации карбонилдиимидазолом 5'- или 2'-гидроксильной группы защищенного носитель-связанного олигонуклеотида.

В случае 5'-конъюгатов исходный 5'-гидроксилсодержащий защищенный носитель-связанный олигонуклеотид получается непосредственно после проведения автоматического синтеза и финального детритилирования синтезируемой цепи (рис. 1.32) [209–214].

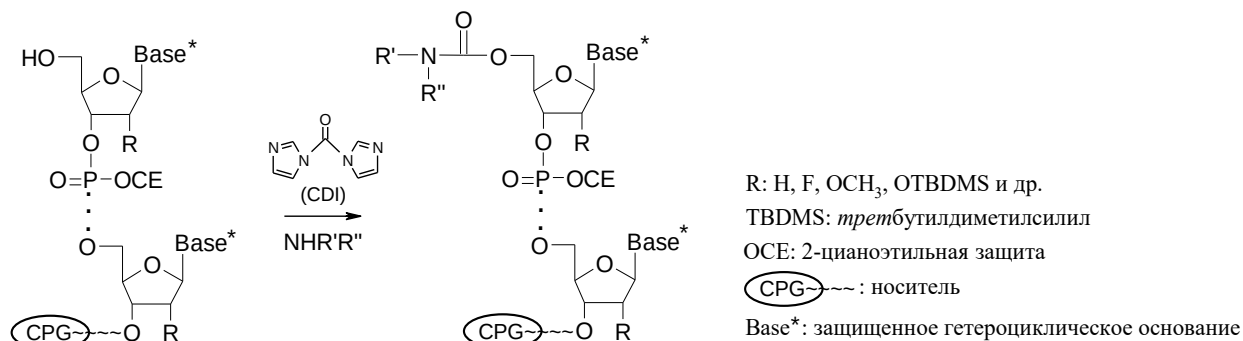


**Рисунок 1.32.** Схема 5'-функционализации НК (R': ФМ; R'': Н или ФМ).

Эlegantный и эффективный способ получения олигонуклеотидов, несущих модификацию в 2'-положении остатка рибозы олигонуклеотидов любых типов был предложен в работе [215]. Он основан на использовании щелочелабильной 2'-O-тиокарбаматной (ТС) группы и 2'-O-третбутилдиметилсилильной (TBDMS) защитной группы, селективно удаляемой в присутствии фторид ионов. Направленное деблокирование 2'-гидроксильной группы в составе защищенного носитель-связанного олигомера дает возможность его активации и последующего присоединения аминоксодержащего остатка ФМ (рис. 1.33). Нужно отметить, что синтез ведут на полистирольных носителях, инертных

к реагентам для удаления TBDMS-защит. Предложенный метод является универсальным и позволяет получать широкий спектр 2'-конъюгатов РНК и РНК/ДНК-гибридов.

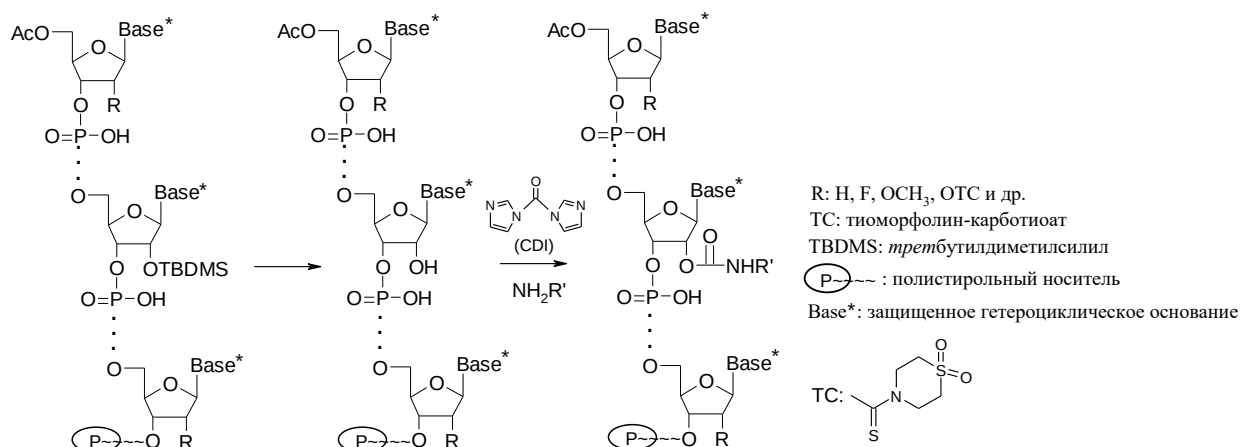


**Рисунок 1.33.** Схема 2'-функционализации НК (R': ФМ).

Важно отметить, что в данном варианте конъюгации ФМ оказывается связана с олигомером через стабильную в биологических условиях карбаматную связь.

#### 1.1.2.3. Сочетание алкин/азид

Еще один популярный метод кросс-сочетания для получения конъюгатов олигонуклеотидов с различными молекулами основан на реакции Хьюсгена [216, 217] - биоортогональной реакции азид-алкинового циклоприсоединения между азидами и алкинами с образованием региоселективных 1,2,3-триазолов (CuAAC, Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, рис. 1.34). О катализе данной реакции с помощью катионов меди (Cu<sup>+</sup>) было впервые сообщено в публикациях независимых групп М. Meldal [218] и К.В. Sharpless [219]. Позднее был предложен вариант металл-независимой реакции азид-алкинового циклоприсоединения, основанный на использовании стерически активированного органического остатка с алкильной группой – дибензоциклооктинового фрагмента (DBCO). Такой вариант конъюгации получил название – присоединение, промотируемое напряжением цикла (SPAAC, Strain-Promoted Azide-Alkyne Cycloaddition) [220]. CuAAC и SPAAC [221, 222] получили название "клик-реакции" и в 2022 году за ее открытие авторы были удостоены Нобелевской Премии по химии.

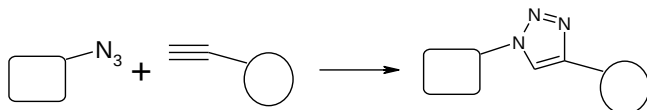


**Рисунок 1.34.** Общая схема биоортогональной реакции азид-алкинового циклоприсоединения.

При создании конъюгатов с помощью "клик-реакции" как правило алкинильную компоненту вводят в состав олигонуклеотида (рис. 1.35). Это обусловлено тем, что алкины

устойчивы в условиях автоматического синтеза олигонуклеотидов, в то время как азиды склонны к превращению под действием соединений, содержащих атом Р(III) (реакция Штаудингера, далее подраздел 1.1.2.5) [223].

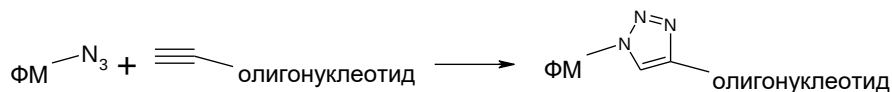


**Рисунок 1.35.** Схематичное изображение биоортогональной реакции азид-алкинового циклоприсоединения между алкинилсодержащим олигонуклеотидом и азидом ФМ.

На рисунке 1.36 представлены примеры коммерческих нуклеотидных фосфитаминов/носителей, модифицированных по гетероциклическим основаниям (структуры I-IV) или 2'-положению рибозы (структуры V, VI), или ненуклеотидные синтоны на основе серинола (структура VII), гидроксипропинола (структуры VIII), аминоспиртов (структура IX) или 4-аминоциклогексанола (структура X). Использование пентаэритрита (2,2-бис(гидроксиметил)-1,3-пропандиол) позволяет получать как терминирующий (структура XI), так и внутрицепочечный (структура XII) ненуклеотидные модификаторы для введения в олигонуклеотидную цепь двух или трех алкинильных групп. К продаже предложены как алкин-содержащие модификаторы для катализируемых медью CuAAC реакций (структуры II-VIII, X-XII), так и реагенты с напряженным циклом (DBCO, структура I; BCN, структура IX) для проведения реакции SPAAC, протекающей в отсутствие катионов меди.

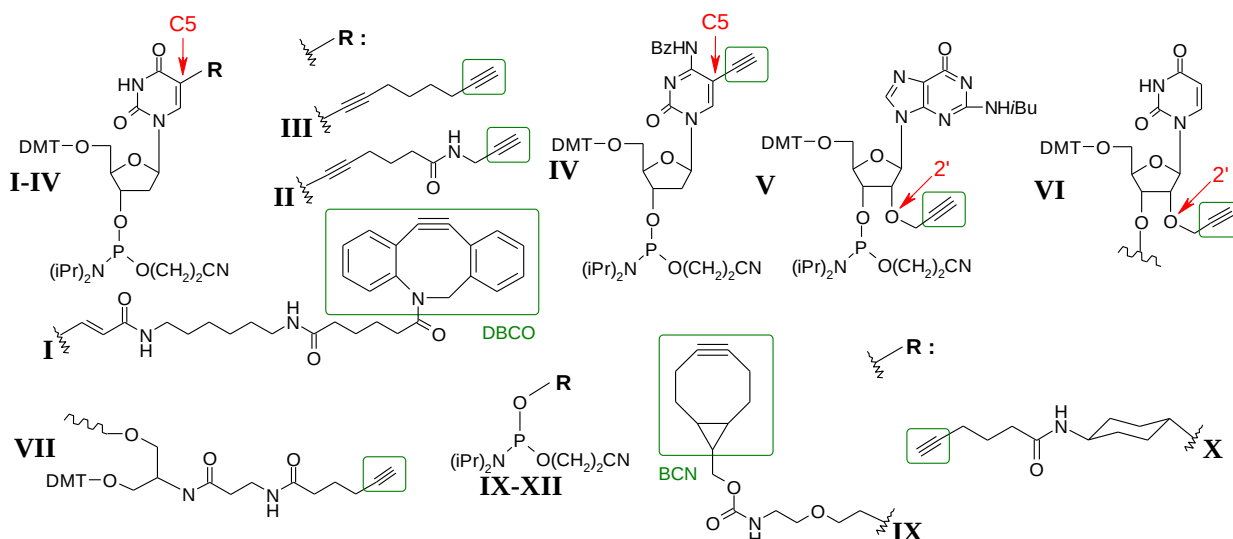


**Рисунок 1.36.** Примеры структур коммерчески доступных алкин-содержащих модификаторов, используемых в автоматическом синтезе олигонуклеотидов (— фосфитаминовая группа или носитель).

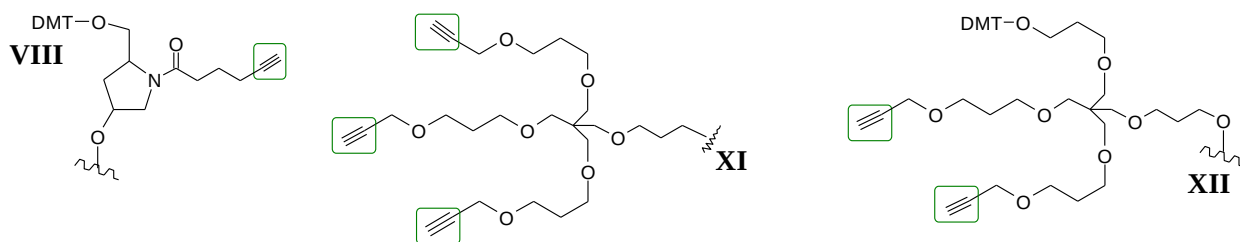


**Рисунок 1.36 (продолжение).** Примеры структур коммерчески доступных алкин-содержащих модификаторов, используемых в автоматическом синтезе олигонуклеотидов (  $\sim$  -фосфитамидная группа или носитель).

В литературе описаны примеры получения алкинил-модифицированных lab-made фосфитамидов и/или носителей. В качестве примера можно привести работу [224], где для получения серии терминальных фосфитамидов (рис. 1.37, структура I) 5'-гидроксильную группу 2',3'-*O*-изопропилиденуридина или 3'-*O*-ацетил-2'-*O*-метилуридина модифицировали пропаргиламином или 5-аминогексиновой кислотой. Вариант ненуклеотидного синтона на основе 4-(2-пропинилокси)бутиламина (рис. 1.37, структура II) описан в работе [123].

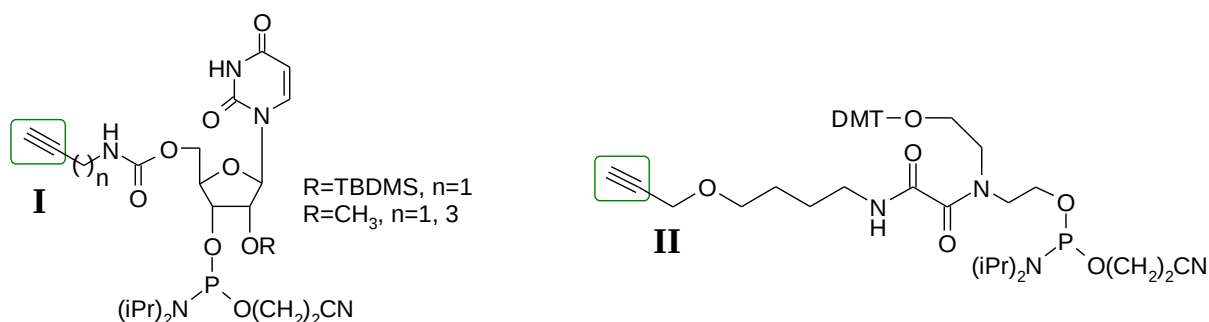


**Рисунок 1.37.** Структуры алкинил-содержащих терминального (структура I) и ненуклеотидного (структура II) lab-made фосфитамидов-модификаторов.

Набор коммерчески доступных азидов сопоставим с набором коммерческих NHS-эфиров (см. выше раздел а)), и включает азидопроизводные биотина, пирена и целого ряда флуорофоров – кумарина (AMCA), родамина (ROX, R6G, R110, TAMRA, TR, ATT), флуоресцеина и его аналогов (FAM, JOE, HEX, TET, VIC, SIMA), красителей цианинового ряда (Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, Cy7.5), а также бордипиррометеновых красителей (BDP 558/568 - BDP 650/665). В качестве примера на рисунке 1.38 приведены структуры коммерческих азидов красителя HEX, пирена и биотина.

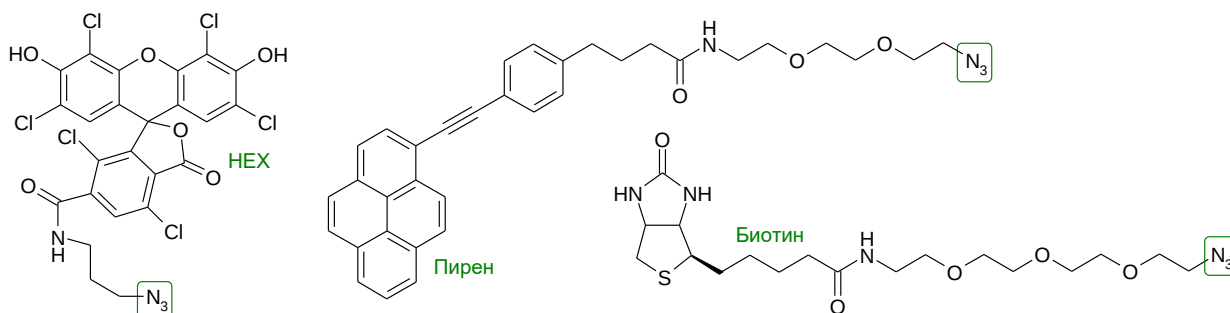


**Рисунок 1.38.** Примеры структур коммерчески доступных азидов.

Наиболее широко используются азидо-модификаторы, которые в настоящее время являются коммерчески доступными. Однако постоянно ведется разработка такого типа lab-made модификаторов, несущих, например, остаток холестерина [225] и пару функциональных остатков кумарина и биотина [226] (рис. 1.39).

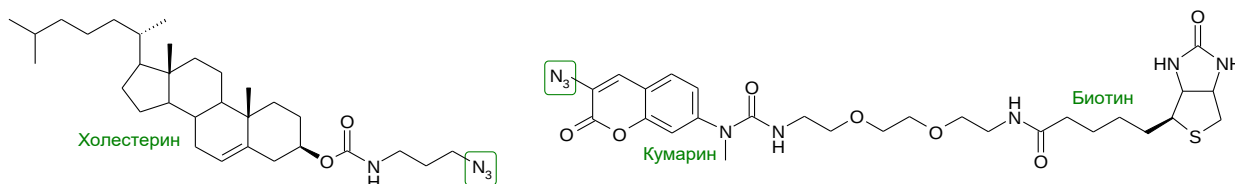


**Рисунок 1.39.** Примеры структур lab-made азидов.

Как видно из представленных структур азидов, в своем большинстве это алкил-азиды, поскольку клик-реакция с ацилазидами крайне затруднена [227]. Целевые биомолекулы, содержащие карбоксильную, гидроксильную или аминогруппы можно легко превратить в соответствующие азидопроизводные [139, 198, 228–231] (рис. 1.40): **1)** первичные и вторичные алифатические спирты по реакции Мицунобу в присутствии азидо водорода, трифенилфосфина и диэтилазодикарбоксилата [232, 233]; **2)** обработкой спиртов 2-азидо-1,3-диметилимидазолия гексафторфосфатом в присутствии 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ена [234]; **3)** прямое азидирование различных спиртов с использованием азидотриметилсилана в присутствии Amberlyst-15 в качестве катализатора, пригодного для повторного использования [235]; **4)** обработкой спиртов азидом натрия после активации гидроксильной группы бис(2,4-дихлорфенил)фосфатом в присутствии 4-(диметиламино)пиридина [236]; **5)** в результате взаимодействия в смеси ароматических аминов с *трет*-бутилнитритом и азидотриметилсиланом в мягких условиях [237]; **6)** используя трифторметансульфонилазид ( $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{N}_3$ ) для превращения аминов по реакции диазопереноса [238]; или, **7)** гидрохлорид имидазол-1-сульфонилазида [239, 240] для обработки аминов вместо  $\text{CF}_3\text{SO}_2\text{N}_3$ , поскольку данный реагент прост в приготовлении, коммерчески доступен и стабилен при хранении при температуре 4 °C; а также, **8)** фторсульфурилазид как еще один пример диазотирующего агента для первичных аминов

[241]; **9)** азидирование алкилгалогенидов (как правило содержащих атом Br или I) азидом натрия в полярных растворителях, например, гексаметилфосфортриамиде, или с использованием краунэфиров [139, 242, 243]; **10)** декарбоксилирующее азидирование в мягких водных условиях алифатических карбоновых кислот тозилазидом или пиридин-3-сульфонилазидом позволяет получать соответствующие алкилазиды при использовании  $\text{AgNO}_3$  в качестве катализатора и  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  в качестве окислителя [244].

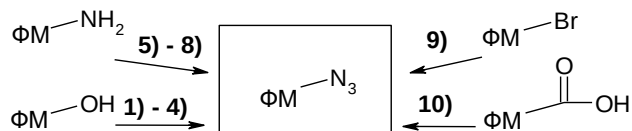


**Рисунок 1.40.** Общие схемы получения азидопроизводных ФМ.

Для получения конъюгатов можно использовать и вариант "наоборот" с введением азидокомпоненты в олигонуклеотид (рис. 1.41).

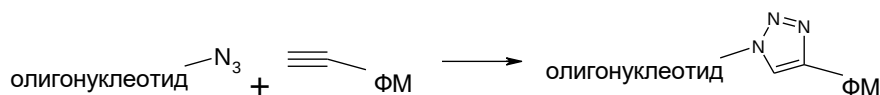


**Рисунок 1.41.** Схематичное изображение биоортогональной реакции азид-алкинового циклоприсоединения между азидсодержащим олигонуклеотидом и алкинсодержащей ФМ.

Коммерчески доступный бромгексилфосфорамидит (рис. 1.42А, структура I) позволяет получать 5'-азидопроизводные олигонуклеотидов, заменяя с помощью азидата натрия атом брома на азидогруппу в составе олигонуклеотидной цепи. Для введения азидогруппы на 3'-конец предлагается использовать модифицированный носитель на основе серинола (рис. 1.42А, структура II). Использование активированного эфира азидобутановой кислоты (рис. 1.42А, структура III) позволяет вводить на универсальной основе азидо-компоненту в различный тип аминсодержащих производных олигонуклеотидов, модифицированных как при включении в схему автоматического синтеза нуклеотидных синтонов, так и планируемых к использованию твердых носителей (рис. 1.21, рис. 1.22).

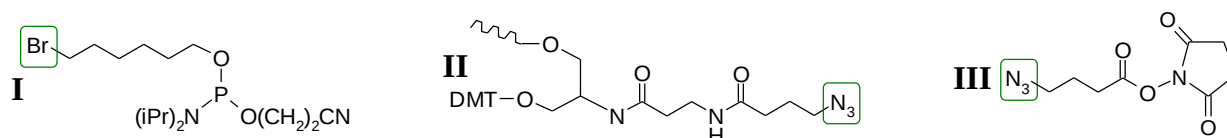


**Рисунок 1.42.** Структуры коммерчески доступных бром-содержащего 5'-модификатора (структура I), азидомодифицированного носителя (структура II), и N-гидроксисукцинимидного эфира азидобутановой кислоты (структура III).

В качестве примера использования lab-made азидо-модификаторов можно привести случай мультиэтапного применения 2'-мезилоксиэтилсодержащих фосфитаминов, позволяющих вводить требуемую модификацию в несколько положений синтезируемой

цепи олигонуклеотида [245]. Замена мезильной группы на азидную под действием азид натрия приводила к получению 2'-азидоэтильного производного олигомера (рис. 1.43).

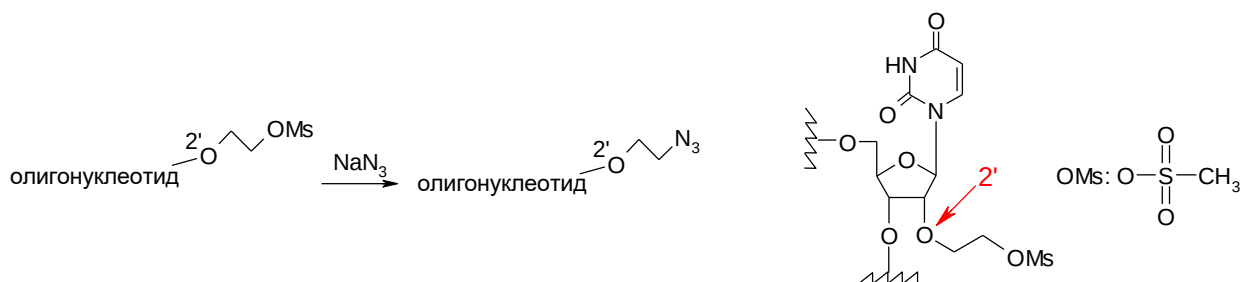


**Рисунок 1.43.** Получение 2'-азидосодержащих производных РНК ( — - нуклеотид, олигонуклеотид).

Использование носителя, уже содержащего азидогруппу в 2'-положении уридина, для синтеза 2'-O-(2-азидоэтил) модифицированных РНК описано в работе [246] (рис. 1.44).

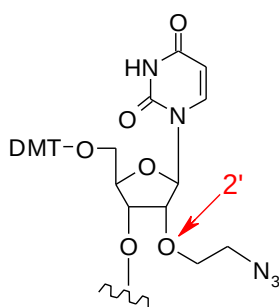


**Рисунок 1.44.** Структура 2'-азидосодержащего lab-made модификатора.

Позднее, в работах [247, 248] для получения азидо-содержащих олигонуклеотидов было предложено использовать реакцию диазопереноса для получения производных РНК, исходно содержащих аминогруппы при гетероциклическом основании или 2'-положении рибозы, используя фторсульфурилизид ( $\text{FSO}_2\text{N}_3$ ) (рис. 1.45). Важно отметить, что в результате реакции соответствующие азидо-модифицированные РНК были получены практически с количественным выходом, не затрагивая аминогруппы гетероциклических оснований.

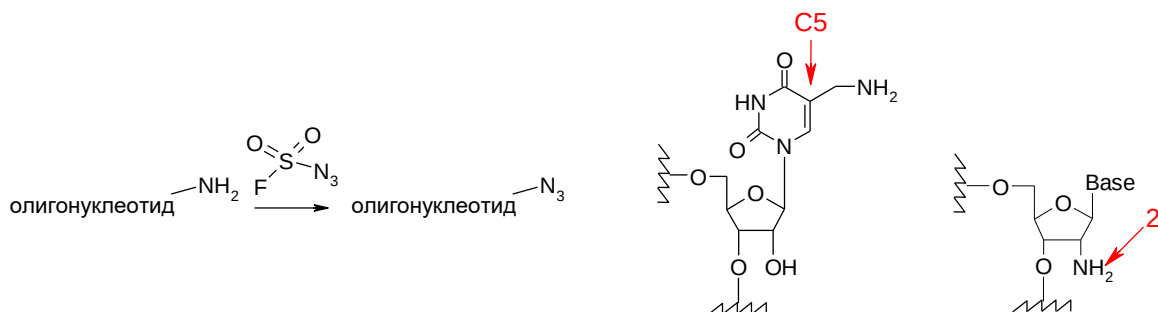


**Рисунок 1.45.** Получение азидосодержащих производных РНК по реакции диазопереноса без металлов на олигонуклеотид, содержащий аминогруппу (Base: гетероциклическое основание; — - нуклеотид, олигонуклеотид).

В обзорных работах [139, 249, 250] можно более детально ознакомиться со стратегиями введения алкинильной или азидо-компоненты в олигонуклеотиды.

В качестве примера коммерчески доступных алкинил-содержащих ФМ можно привести производные биотина, *N*-ацетилгалактозамина, перилена и красителя ROX (рис. 1.46А). Получение lab-made серии алкинил-производных красителей цианинового ряда (рис. 1.46Б) описано в работе [245].

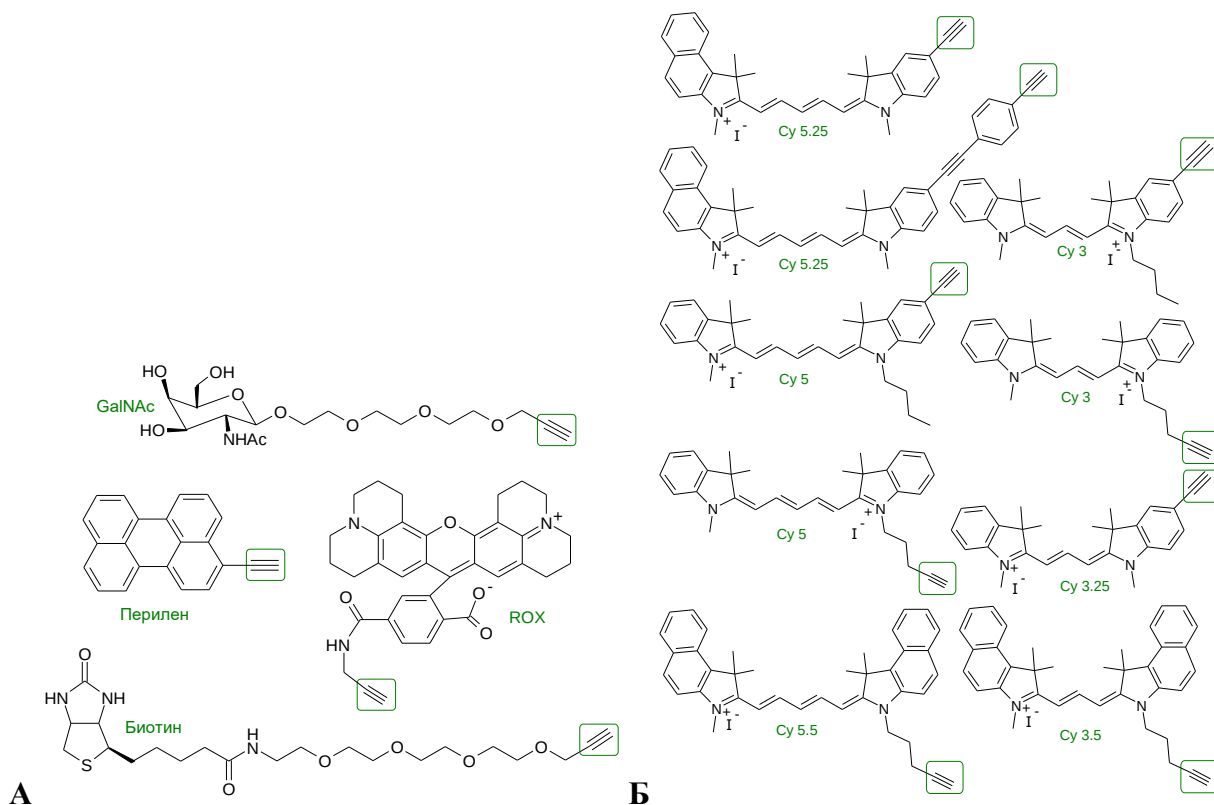


**Рисунок 1.46.** А – Примеры структур коммерчески доступных алкинил-содержащих производных *N*-ацетилгалактозамина, биотина, перилена и красителя ROX. Б – Примеры структур lab-made алкинил-содержащих ФМ (красителей цианинового ряда).

Большинство работ по получению конъюгатов "клик-методом", описанных в этом разделе, можно отнести к гомофазному варианту. CuAAC характеризуется разнообразием возможных условий для ее проведения, в частности состава каталитического буферного раствора. К самым часто используемым соединениям меди относятся галогениды меди (I) и сульфат меди (II), который предварительно восстанавливают аскорбиновой кислотой до меди (I). Авторы работы [251] отмечают предпочтительность использования буферного раствора, содержащего Cu(II), поскольку присутствие восстановителя в реакции делает возможным поддержание постоянного уровня Cu(I). Также галогениды меди (I) для образования связи с алкином требуют наличия аминового основания или высокой температуры [251]. Для защиты Cu(I) от воздействия кислорода и для ускорения реакции в каталитический буфер добавляют различные соединения (например, TBTA, PMDETA,

дисульфонат батофенантролина) [251], которые также оказывают влияние на скорость циклоприсоединения за счет регуляции присутствия наиболее активных кластеров. В отличие от CuAAC, SPAAC зарекомендовал себя в экспериментах не только *in vitro*, но и *in vivo* [252, 253]. Реакция с использованием производных циклооктина может протекать в физиологических условиях и при отсутствии вспомогательных реагентов [254]. Однако существенный недостаток SPAAC заключается в отсутствии региоселективности, из-за которой образуются смеси неразделимых продуктов. В работах [225, 255, 256] авторы проводили исследование гетерофазного CuAAC в автоматическом режиме в ДНК-синтезаторе с использованием различных растворителей (смесь *t*-BuOH:H<sub>2</sub>O (1:1), DMF, DMSO, CH<sub>3</sub>CN, формамид, DMAA) и медных буферных растворов (CuCl, Cu(MeCN)<sub>4</sub>PF<sub>6</sub>, CuI/DIPEA, CuCl·TBTA, CuBr·Me<sub>2</sub>S, CuBr·PhSMe, CuBr·TBTA, CuI·P(OEt)<sub>3</sub>). Было отмечено, что одной из проблем, возникающих в ходе "клик-реакции" в автоматическом режиме синтеза олигонуклеотидов, является способность азидов в ацетонитриле взаимодействовать с фосфитамидами по реакции Штаудингера (см. раздел 1.1.2.5).

#### 1.1.2.4. Сочетание алкил-NH<sub>2</sub>/фосфат

Фосфит/фосфатная группа углеводофосфатного остова может служить центром для дальнейшей функционализации олигонуклеотидов, позволяя получать конъюгаты с различными ФМ (рис. 1.47).

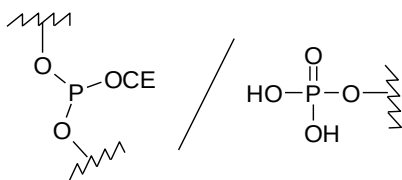


**Рисунок 1.47.** Схематичное изображение фосфит/фосфатной группы сахарофосфатного остова олигонуклеотидов ( : нуклеозид; CE: 2-цианоэтил).

В начале 70х годов прошлого столетия Т. Mukaiyama с соавт. [257, 258] подробно описали синтез производных нуклеотидов и коротких олигонуклеотидов с использованием окислительно-восстановительной пары (ОВП) трифенилфосфин/2,2'-дипиридилдисульфид (Ph<sub>3</sub>P/(PyS)<sub>2</sub>). Соли фосфороксифосфония, образованные в результате реакции фосфата и этой ОВП, далее могут взаимодействовать с аминами, спиртами и фосфатами приводя к получению, соответственно, фосфорамидов, смешанных сложных эфиров фосфорной кислоты и асимметричных пирофосфатов.

Предложенная ОВП сама по себе или в сочетании с нуклеофильным катализатором 4-диметиламинопиридином (DMAP) для активации конечного фосфата полностью деблокированного олигонуклеотида позволяет получать фосфамидные производные олигонуклеотидов с различными аминоксодержащими биомолекулами в гомофазном

варианте (рис. 1.48А). Для синтеза 5'/3'-фосфатсодержащих олигонуклеотидов коммерческие фирмы предлагают два типа фосфорилирующих реагентов (рис. 1.48Б). Их использование для получения конъюгатов с липофильными, алкилирующими, фотоактивными реакционными группами, а также с остатками полициклических красителей, антибиотика блеомицина, диаминов, пептидов описано в целом ряде работ (напр., [83, 259–264]).

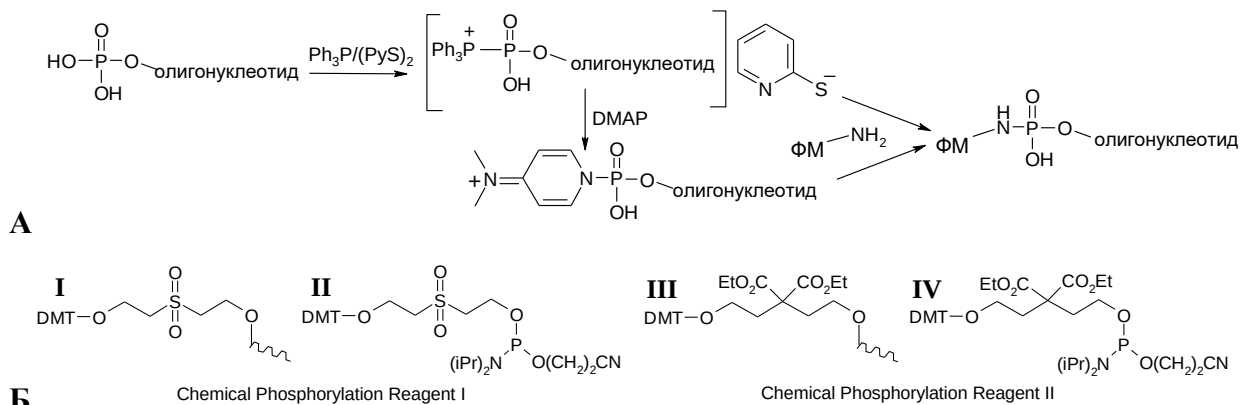


**Рисунок 1.48.** А - Схема реакции фосфатсодержащего олигонуклеотида и аминоксодержащей ФМ в присутствии  $\text{Ph}_3\text{P}/(\text{PyS})_2$  или  $\text{Ph}_3\text{P}/(\text{PyS})_2/\text{DMAP}$ . Б - Структуры 5'- и 3'-коммерческих фосфорилирующих реагентов.

ФМ на 5'- или 3'-конец полностью деблокированного олигонуклеотида можно также ввести, активируя остаток концевой фосфорной кислоты 1-этил-3,3-диметиламинопропилкарбодиимида (EDC) в присутствии имидазола [265] или 4-метилимидазола [266] (рис. 1.49).

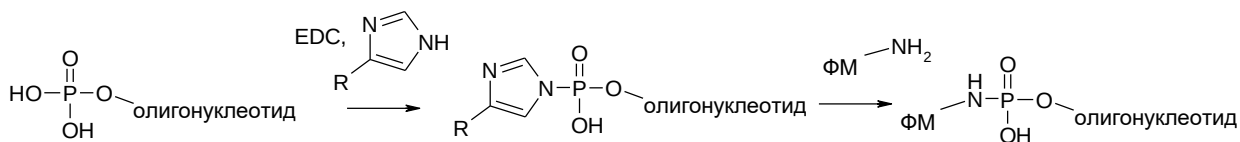


**Рисунок 1.49.** Схема реакции фосфатсодержащего олигонуклеотида и аминоксодержащей ФМ в присутствии EDC и имидазола (R: H) или 4-метилимидазола (R:  $\text{CH}_3$ ).

Один из самых удобных и часто используемых способов образования фосфамидной связи при синтезе конъюгатов в гетерофазном варианте предложена в середине 40х годов XX века и основана на реакции Аттертона-Тодда (АТ), а именно на взаимодействии диалкил-фосфита (Н-фосфоната) с первичным или вторичным амином в присутствии четыреххлористого углерода ( $\text{CCl}_4$ ) [267] (рис. 1.50). Механизм этой реакции был достаточно подробно изучен [268–271], также было показано, что использование в качестве альтернативы  $\text{CBr}_4$ ,  $\text{CBrCl}_3$  или  $\text{CHCl}_3$  не снижает эффективности данного варианта получения амидофосфатов [268, 272–274].

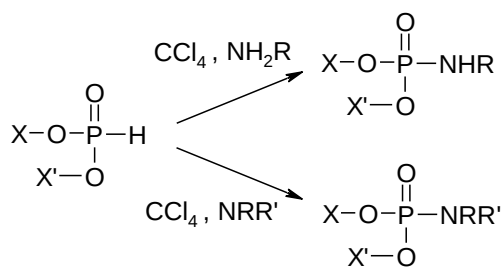


**Рисунок 1.50.** Реакция Аттертона-Тодда.

Диалкил-фосфит образуется на стадии конденсации в ходе Н-фосфонатного синтеза олигонуклеотидной цепи и условия его окислительного аминирования совместимы с синтетическим циклом. Успехи в развитии твердофазного варианта Н-фосфонатного метода синтеза олигонуклеотидов в конце XX века в сочетании с простотой и эффективностью реакции АТ упростили синтетический процесс и позволили получать как короткие, так и протяженные моно- и мультиконъюгаты с различными ФМ не только по концевым, но и по межнуклеозидным фосфатам.

В настоящее время Н-фосфонаты нуклеозидов коммерчески доступны (рис. 1.51А), что значительно расширяет возможности по синтезу конъюгатов для дальнейших исследований. Комбинирование фосфитамидной и Н-фосфонатной химии (рис. 1.51Б) продемонстрировано в статье [275], где авторы в заданные положения защищенного и связанного с носителем олигонуклеотида встраивали Н-фосфонатный остаток соответствующего нуклеозида и проводили окислительное аминирование межнуклеозидного фосфита рядом аминов (диметилэтилендиамин, диметилпропандиамин, диметилбутандиамин, изопентиламин) в присутствии  $\text{CCl}_4$ ; далее продолжали наращивание цепи в рамках стандартного автоматического фосфитамидного метода синтеза.

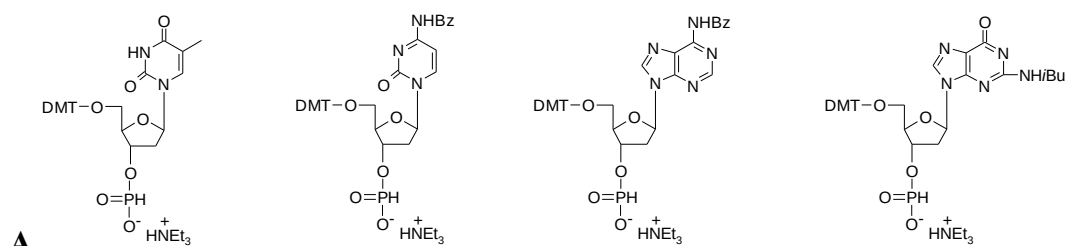
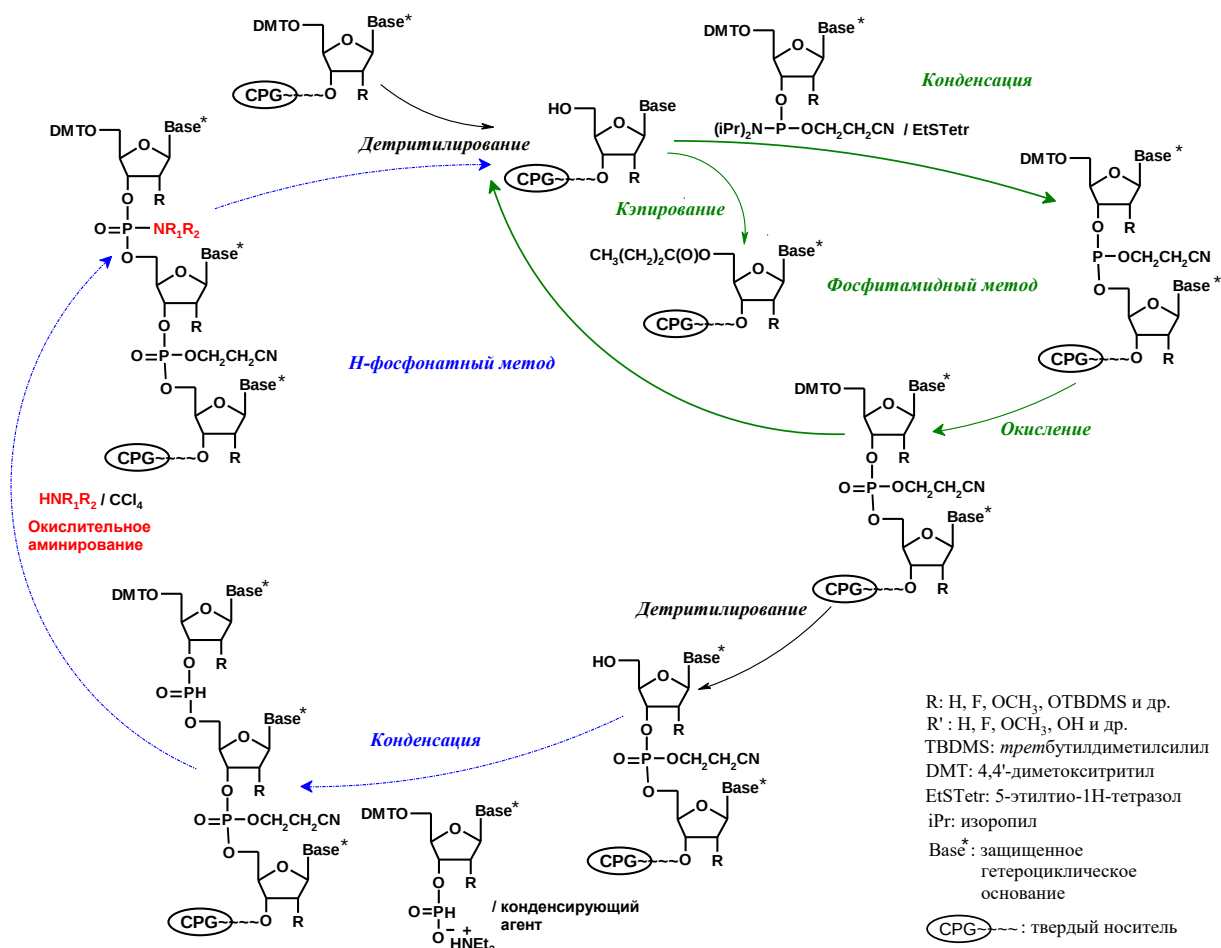


**Рисунок 1.51. А - Структуры коммерчески доступных Н-фосфонатов нуклеозидов в виде триэтиламмонийных солей.**



Б

**Рисунок 1.51 (продолжение).** Б - Комбинация фосфитамидного и Н-фосфонатного методов синтеза.

Использование в твердофазном синтезе Н-фосфонатов нуклеозидов позволяет также введение в олигонуклеотиды различных аминосодержащих ФМ посредством фосфамидной связи по альтернативному реакции АТ гетерофазному варианту, который заключается в окислении Н-фосфонатной связи в диалкил-фосфите элементарным иодом [276] с последующим его замещением аминосодержащими ФМ (рис. 1.52).

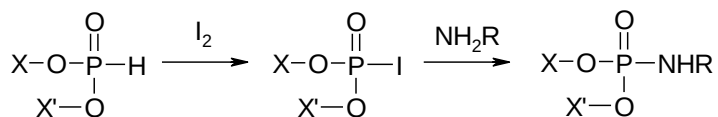


**Рисунок 1.52.** Схема окисления Н-фосфонатной связи аминосодержащей ФМ в присутствии  $\text{I}_2$  ( $R$  - ФМ;  $X, X'$  - нуклеотид, олигонуклеотид).

Также стоит упомянуть гетерофазный вариант получения 5'-фосфамидных производных олигонуклеотидов основанный на окислении триалкил-фосфита, полученного на стадии конденсации стандартного фосфитамидного цикла синтеза, аминосодержащей ФМ также в присутствии элементарного иода (рис 1.53) [277].

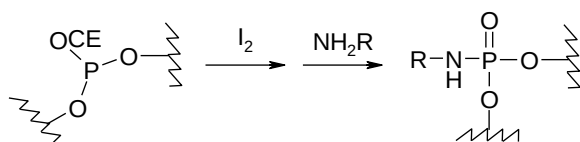


**Рисунок 1.53.** Реакция фосфитсодержащего компонента и аминоксодержащей ФМ в присутствии  $I_2$  (R: н-бутил;  : нуклеозид; CE: 2-цианоэтил).

Синтез модифицированных по 5'/3'-концевым фосфатам олигонуклеотидов преимущественно реализуется в жидкофазном варианте. Описанные гетерофазные варианты синтеза олигонуклеотидов, модифицированных по межнуклеозидным фосфатам, хоть и проводят на носителе, но, как правило, они не могут быть полностью автоматизированы [275–279].

#### 1.1.2.5. Сочетание азид/фосфит

Реакция Штаудингера была открыта в 1919 году Н. Staudinger [280]. Она основана на окислении фосфиттриэфиров органическими азидами.

Реакцию Штаудингера широко используют для модификации гликанов, липидов, ДНК, белков, а также для создания гликопептидов, микрочипов и функциональных биополимеров [281–283]. В настоящее время она стала инструментом для получения фосфатмодифицированных олигонуклеотидов и может быть применена в ходе твердофазного синтеза для функционализации межнуклеозидного фосфиттриэфирного остатка (рис. 1.54), который образуется на стадии конденсации в рамках стандартного синтетического фосфитамидного протокола.

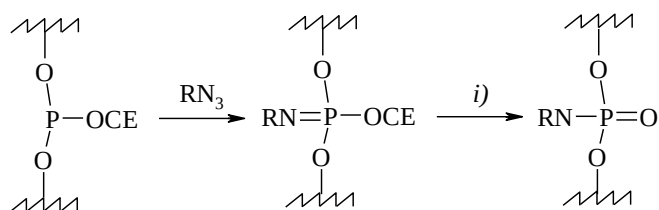


**Рисунок 1.54.** Взаимодействие азид с межнуклеозидным 2-цианоэтилфосфитом ( - нуклеозид, олигонуклеотид; R: ФМ; CE: 2-цианоэтил; i) удаление защитной 2-цианоэтильной группы).

Применительно к олигонуклеотидам для эффективного протекания реакции необходимо наличие при азидогруппе органического заместителя, обладающего выраженными электронно-акцепторными свойствами (в частности, ацилазиды, сульфонилазиды). Использование алкилазидов предполагает повышенные температуры и длительные времена реакций [284, 285], что значительно увеличивает время синтеза целевого конъюгата, особенно в случае множественных модификаций. В структуре азид

также могут присутствовать дополнительные реакционноспособные центры, позволяющие варьировать функционал вводимых заместителей.

Получение азидов ФМ описано в подразделе 1.1.2.3. Целевые биомолекулы, содержащие карбоксильную или альдегидную группы можно достаточно легко модифицировать в их ацилазидопроизводные [198, 230] (рис. 1.55): **1)** прямая реакция карбоновой кислоты с дифенилфосфорилазидом [286]; **2)** действием азидата натрия на активированные карбоновые кислоты – хлорангидриды, полученные обработкой тионилхлоридом [287], либо **3)** *in situ* комбинацией трихлорацетонитрила и трифенилфосфина [288], либо **4)** бензотриазольные производные кислот, полученные при реакции с 1-(метилсульфонил)бензотриазолом [289]; **5)** гидразиды карбоновых кислот (полученные обработкой гидразином) по реакции диазотирования с использованием нитрозоний тетрафторбората [290], четырехокси азота [291] или оксида азота в присутствии кислорода [292]; **6)** для альдегидов описано одностадийное превращение с использованием азидата натрия и периодинана Десса-Мартина [293].

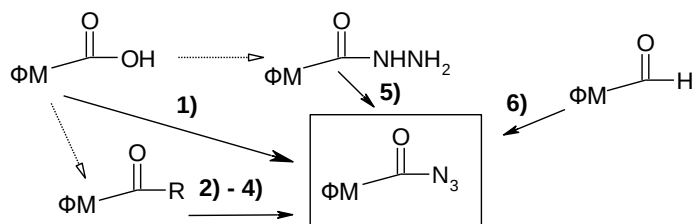


**Рисунок 1.55.** Общие схемы получения ацилазидопроизводных ФМ (R: Cl, *O*-бензотриазол).

Реакция азидата/ацилазида с атомом фосфора(III) в большинстве случаев совместима с твердофазным синтезом олигонуклеотидов. Ее активное применение для получения олигонуклеотидных производных за последнее десятилетие не только упростило введение ФМ-остатков по межнуклеозидным фосфатам [285, 294–300], но и позволило получать новые классы заряженных или электронейтральных фосфат-модифицированных аналогов олигонуклеотидов (сульфониламидофосфатные (N-sulfonyl), фосфорилгуанидиновые (PGO), N-незамещенные (P-NH<sub>2</sub>), бензоазольные (PABAO) и др.) с измененными относительно нативных олигомеров физико-химическими и биологическими свойствами [296, 300–312] (рис. 1.56).

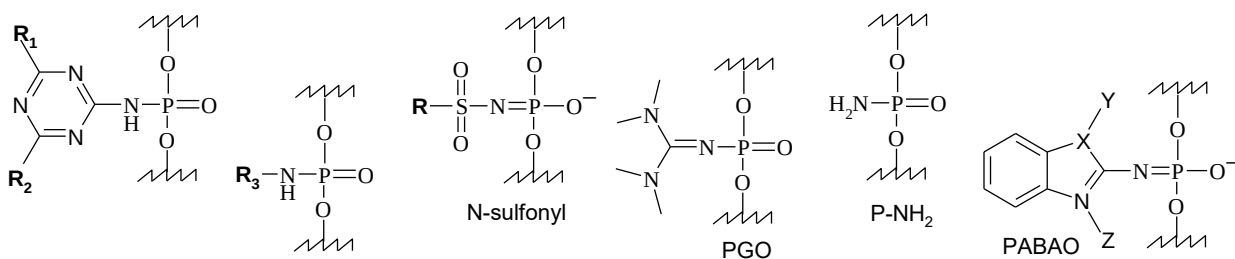


**Рисунок 1.56.** Варианты структурных фрагментов фосфатного звена олигонуклеотидной цепи модифицированные по реакции Штаудингера ( — нуклеозид, олигонуклеотид; R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>: заместители различных типов, от минимального метиленового звена, до разветвленных структур, включая остатки пирена, холестерина, протяженных алифатических цепей; X: O или S (Y,Z=нет), N (Y,Z: H или CH<sub>3</sub> (с противоионом PF<sub>6</sub><sup>-</sup>)).

Введение заместителей с принципиально отличающимися структурными характеристиками в межнуклеозидные фосфатные звенья посредством реакции Штаудингера представляет собой рациональный и высокоэффективный подход к синтезу широкого спектра конъюгатов и аналогов НК, содержащих P-N-связь, что в настоящее время значительно расширило возможности модификации и функционализации олигонуклеотидов.

#### 1.1.2.5. Сочетания альдегид/алкил-NH<sub>2</sub> или альдегид/гидразид

Молекулы, содержащие альдегидные или кето-группы могут реагировать как с аминсоединениями, с получением азометинов - оснований Шиффа [313, 314], названных в честь итальянского химика Н. Schiff, открывшего эту реакцию в 1864 (рис. 1.57А), так и с гидразидными производными молекул (рис. 1.57Б), с получением соответствующих гидразонов. Азометиновый фрагмент (-N=C-) является кислотолабильным, его чувствительность к pH среды зависит от структуры примыкающих к нему группировок [315, 316]. Часто для стабилизации конъюгатов такого типа проводят восстановление азометинового фрагмента с получением стабильной C-N-связи, например, с помощью цианоборгидрида натрия (рис. 1.57).

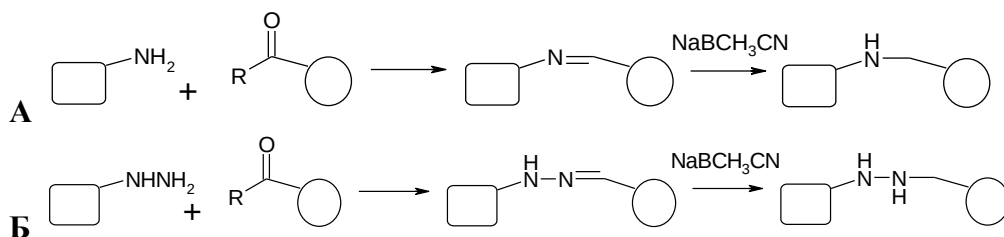


**Рисунок 1.57.** Взаимодействие карбонильных соединений (R=H или алкил/арил) с молекулами, содержащими аминами (А) и гидразидными (Б) группами.

При получении конъюгатов олигонуклеотидов с различными ФМ в 4 попарно возможных вариантах, представленных на рисунке 1.58, используют только их альдегидсодержащие производные.

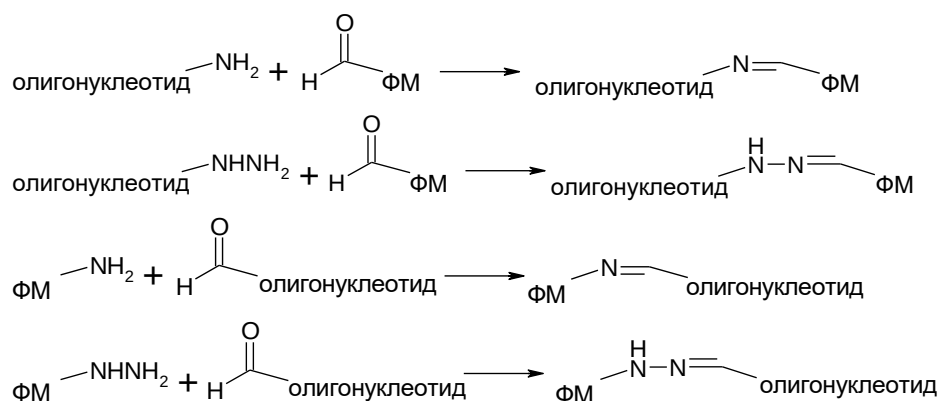


**Рисунок 1.58.** Схематическое изображение взаимодействия олигонуклеотидов и ФМ, содержащих альдегидную, амино- и гидразидные группы.

Для всех четырех вариантов такого типа конъюгации существуют коммерчески представленные решения. Получение аминосодержащих олигонуклеотидов с использованием модификаторов описано выше (подраздел 1.1.2.1). Введение гидразидной группы в олигонуклеотид можно провести опосредованно в аминомодифицированный олигонуклеотид с помощью бифункционального 2,5-диоксопирролидин-1-ил-6-(2-(пропан-2-илиден)гидразинил)никотината (SANH, рис. 1.59, структура I). Для введения альдегидной группы на 5'-конец олигонуклеотидной цепи фирмы предлагают два типа модификаторов: нуклеозидоподобный фосфитамид, несущий экзоциклическую альдегидную группу при остатке индола, который можно использовать на любом (промежуточном или концевом) цикле автоматического синтеза олигонуклеотидов (рис. 1.59, структура II); или, терминальный ненуклеотидный модификатор, содержащий замаскированную альдегидную группу, для финального цикла синтеза преактивированного производного (рис. 11.59, структура III). Также введение альдегидной группы в синтезируемый олигонуклеотид можно провести опосредованно через его аминосодержащее производное (подраздел 1.1.2.1), используя, например, бифункциональный реагент 2,5-диоксопирролидин-1-ил-4-формилбензоат (SFB, рис. 1.59, структура IV).

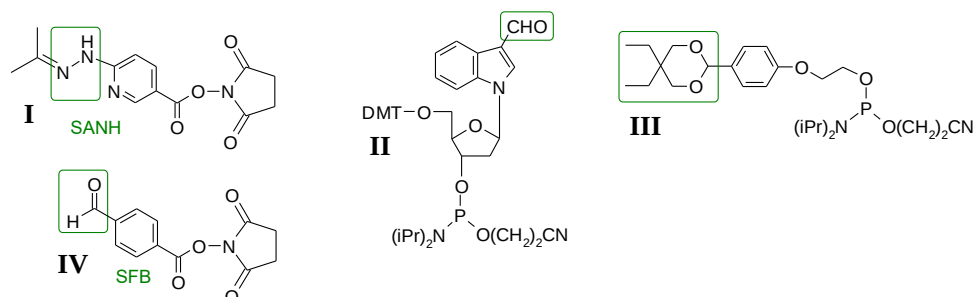


**Рисунок 1.59.** Структуры коммерчески доступных 2,5-диоксопирролидин-1-ил-6-(2-(пропан-2-илиден)гидразинил) никотината (SANH, структура I), внутрицепочечного (структура II) и 5'-концевого (структура III) альдегид-модификаторов, а также бифункционального реагента 2,5-диоксопирролидин-1-ил-4-формилбензоата (SFB, структура IV).

Учитывая высокую эффективность взаимодействия пары групп альдегид/гидразид фирмы предлагают широкий спектр коммерчески доступных гидразид-содержащих производных красителей, тушителей и ряда других остатков ФМ. На рисунке 1.60А в качестве примера приведены гидразиды биотина, цианинового красителя Cu3, полиэтиленгликоля (mPEG<sub>12</sub>), адамантануксусной, пиренмаслянной и гексадекановой (C16) кислот. Отдельно стоит упомянуть гетеро- или бис-функциональные гидразид-содержащие реагенты (рис. 1.60Б): гидразидная компонента вступает в реакцию с карбонильными соединениями - альдегидами и кетонами; алкинил- или азидо-группы могут быть использованы для проведения CuAAC или SPAAC реакций (подраздел в)); малеимидный фрагмент будет участвовать в реакции тиол-малеимидной конденсации (далее подраздел 1.1.2.7). Коммерческие альдегиды ФМ не настолько широко представлены - в качестве примера (рис. 1.60В) можно привести моноальдегидное производное антрацена (антрацен-9-карбальдегид), ретиналь (альдегид витамина А), лауриновый альдегид (C12) или альдегидное производное пептида трилейцина.

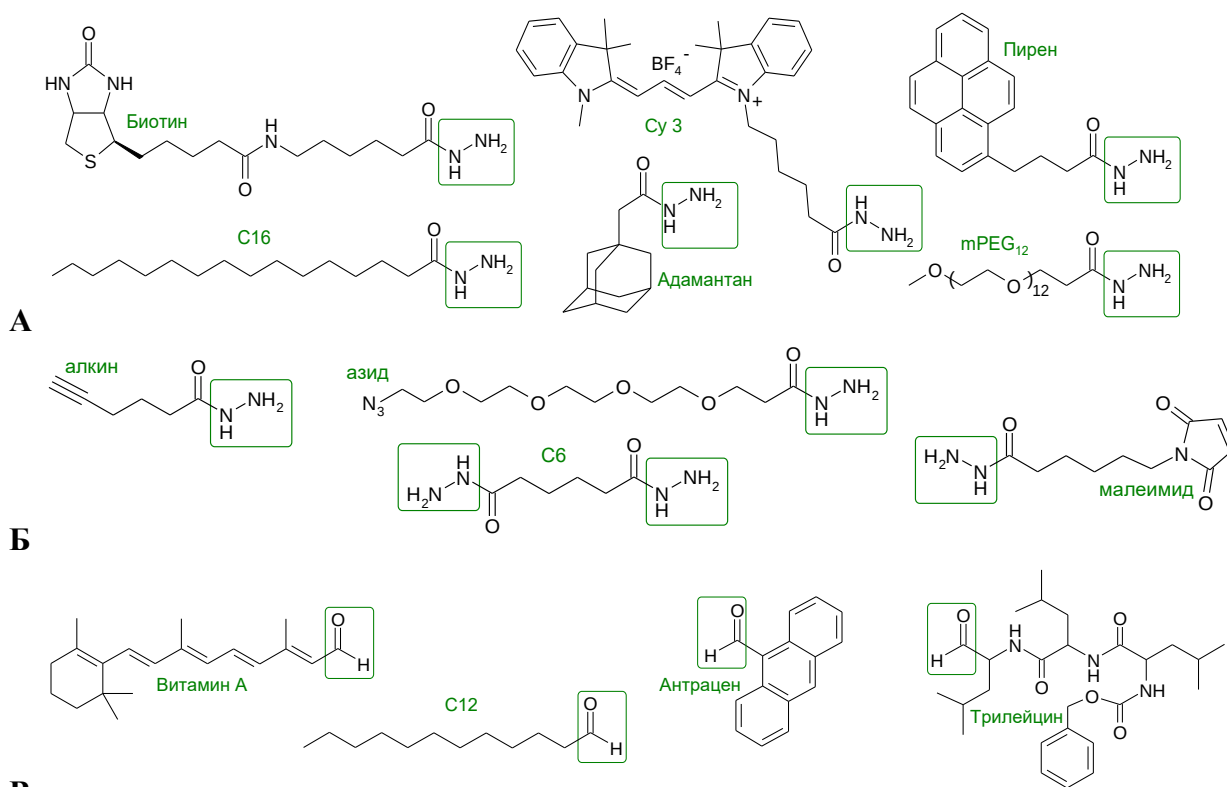


**Рисунок 1.60. А** - Структуры коммерчески доступных гидразидов биотина, цианинового красителя Cu3, полиэтиленгликоля (mPEG<sub>12</sub>), адамантануксусной, пиренмаслянной и гексадекановой (C16) кислот. **Б** - Структуры коммерческих бифункциональных алкинил/азид/малеимид/гидразид-содержащих реагентов. **В** - Структуры коммерчески доступных альдегида витамина А, лауринового альдегида (C12), антрацен-9-карбальдегида, альдегидного производного пептида трилейцина.

При переходе к lab-made вариантам можно отметить простой и эффективный способ генерации альдегидных групп на 3'-конце олигонуклеотидной цепи, который заключается в окислении 3'-концевого остатка рибозы с помощью периодата натрия ( $\text{NaIO}_4$ ) [317–319] в гомофазном варианте (рис. 1.61). Взаимодействие получаемого в результате 2',3'-бисальдегидного производного олигомера с первичной алифатической аминогруппой в составе остатка ФМ приводит к образованию конъюгата путем формирования морфолин-замещенного цикла.

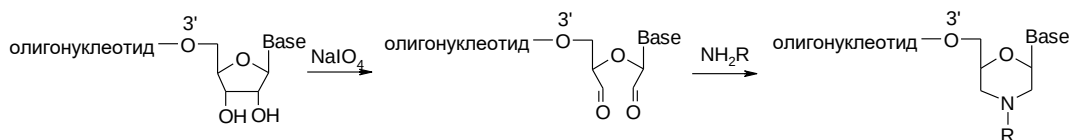


**Рисунок 1.61.** Окисление 3'-рибозного остатка периодатом натрия и последующее взаимодействие диальдегидного производного с первичным амином ( $\text{R}$  – ФМ; Base – незащищенное гетероциклическое основание).

В развитие данной стратегии в работах [320–326] предложено получение нуклеотидных модификаторов, содержащих в 2'-положении исходно защищенные диольные группировки, способные в последствии генерировать 2'-альдегидную функцию при взаимодействии с  $\text{NaIO}_4$  (рис. 1.62, структуры I–III). Наиболее часто для защиты OH-групп в составе диолов используют остатки бензоила, леулината или ацетила.

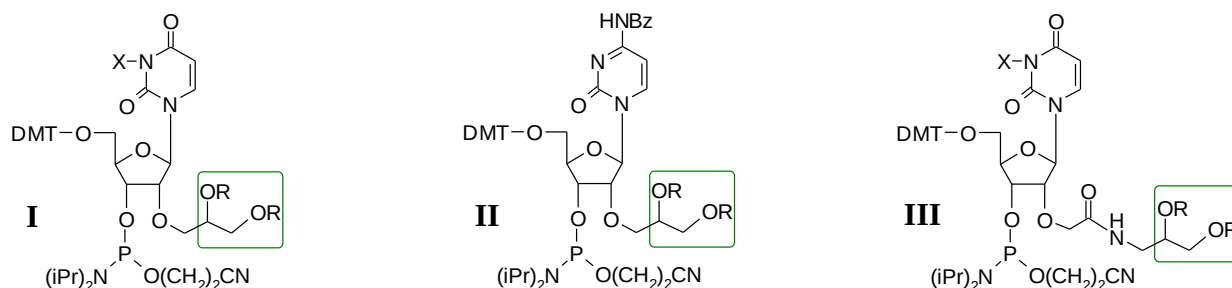


**Рисунок 1.62.** Структуры lab-made фосфитамидных модификаторов, содержащих в 2'-положении защищенные 1,2-диольные группировки ( $\text{R}$  – защитные ацетильная, леулиновая или бензоильная группы;  $\text{X} = \text{H}$ ,  $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$  или  $\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

Вышеописанные фосфитамиды (рис. 1.62) можно использовать и для опосредованного введения гидразидной группы в любое положение олигонуклеотидной цепи [322, 323, 326–330]. Так, после обработки полностью деблокированного олигонуклеотида  $\text{NaIO}_4$  и превращения 1,2-диольной группировки в альдегидную, авторы предлагают вводить по ней Fmoc-защищенный гидразид с последующим восстановлением полученной азометиновой связи цианборгидридом натрия (рис. 1.63). Удаление впоследствии Fmoc-защиты в мягких условиях приводит к получению 2'-гидразид-содержащих производных олигонуклеотидов.

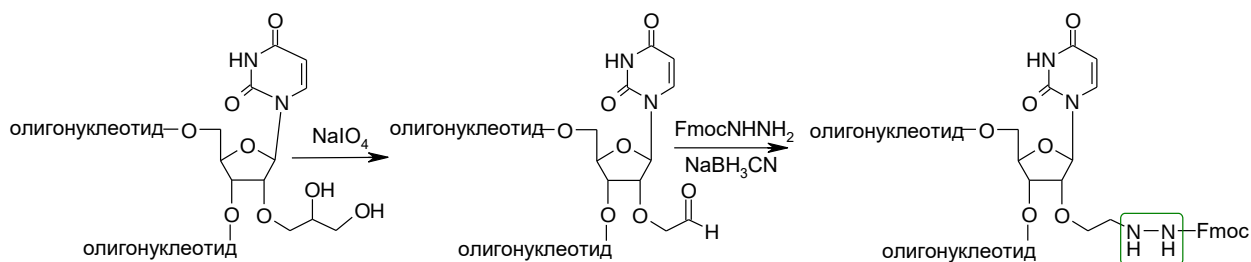


**Рисунок 1.63.** Схема введения гидразидной группы в 2'-положение уридина в составе полностью деблокированного олигонуклеотида.

Гидразид-содержащие остатки способны взаимодействовать не только с альдегидными производными олигонуклеотидов, но и, например, с олигомерами, несущими 5'-фосфорилированные цепи (аналогично подходу, описанному в подразделе г)). Так, использование пары реагентов  $\text{Ph}_3\text{P}/(\text{PyS})_2$  в сочетании с нуклеофильным катализатором DMAP позволяет с высокой эффективностью вводить коммерчески доступный остаток дигидразида адипиновой кислоты (С6, рис. 1.60Б) на конец олигонуклеотидной цепи [331] (рис. 1.64А). Авторы работы [332] использовали концевой остаток фосфата при его активации с помощью EDC в присутствии имидазола для 5'-модификации олигомера карбогидразидом (рис. 1.64Б).

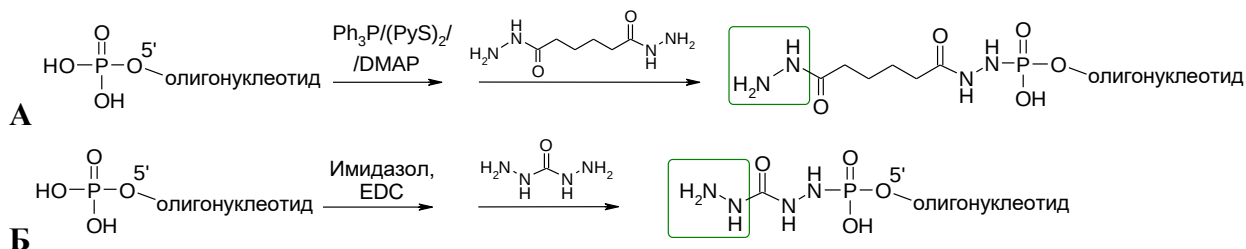


**Рисунок 1.64.** А - Схема введения дигидразида адипиновой кислоты по 5'-фосфату в составе полностью деблокированного олигонуклеотида. Б - Схема введения карбогидразида по 3'-фосфату в составе полностью деблокированного олигонуклеотида.

Типичные терминальные lab-made модификаторы, несущие альдегидную (структуры I-IV) и гидразидную (структуры V-VII) функции, представлены на рисунке 1.65 и описаны в работах [333–337]. Важно отметить, что структура VIII (рис. 1.65) представляет собой модификатор, позволяющий вводить гидразидную группу в любое положение олигонуклеотидной цепи [335].

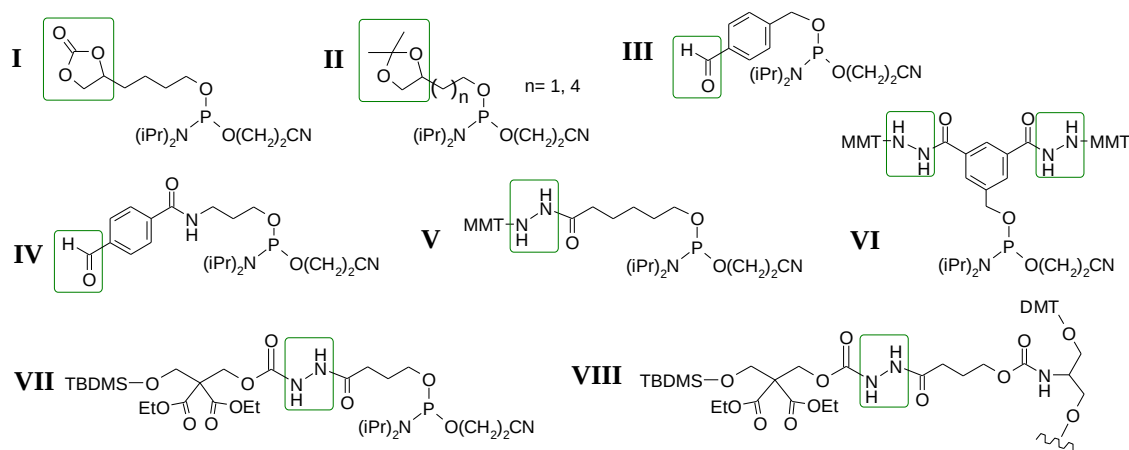


**Рисунок 1.65.** Структуры терминальных (I-VII) и внутреннего (VIII) lab-made модификаторов, содержащих альдегидную (I-IV) и гидразидную (V-VIII) функции.

Оригинальный способ получения в ходе одного автоматического синтеза двух олигонуклеотидных производных, несущих 3'- или 5'-моногидразидные остатки, предложен в работах [335, 338]. С использованием фрагментов  $\epsilon$ -капролактона, гидразина и сульфонилдиэтанола авторы создали ненуклеозидный фосфитамидный модификатор (рис. 1.66, структура I), способный генерировать концевые гидразидные группы при выщеплении сульфонилдиэтанольного (SDE) фрагмента в ходе финального аммонолизного деблокирования (по аналогии с [339, 340]), с возможностью получения сразу пары олигонуклеотидов, модифицированных гидразидным остатком по 5'- или 3'-концу.

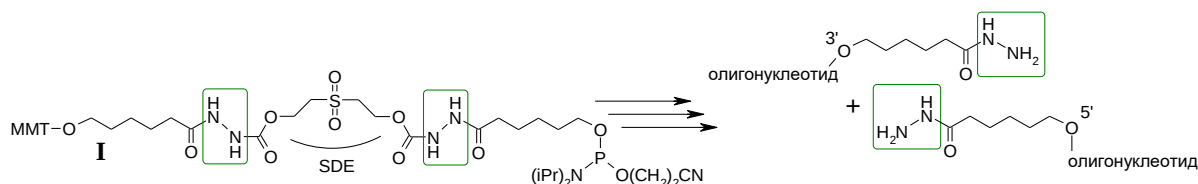


**Рисунок 1.66.** Схема введения дигидразидсодержащего фрагмента в олигонуклеотид с последующим получением двух независимых моногидразид модифицированных олигонуклеотидов.

Получение аминосодержащих ФМ, недоступных в продаже, было представлено ранее на рисунке 1.30, а lab-made варианты введения альдегидных групп в структуру ФМ-остатков сгруппированы на рисунке 1.67. Это может быть: **1)** селективное каталитическое восстановление ацилхлоридов водородом до альдегидов [341, 342] (в качестве катализатора обычно используют три(*трет*-бутокс)алюминийгидрид лития или металлический палладий на различных носителях ( $\text{BaSO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{BaCO}_3$ , асбест, уголь, кизельгур)); **2)** восстановление сложных эфиров до альдегидов гидридом диизобутилалюминия при низких температурах [343]; **3)** окисление алифатической гидроксильной группы с использованием, например, оксида меди (II), оксида марганца (IV), карбоната серебра на цеолите,

комплексных соединений оксида хрома (VI) с третичными аминами (реагент Саррета-Коллинза: комплекс с пиридином ( $\text{CrO}_3 \cdot 2\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ) [344, 345] или реагент Кори: хлорхромат пиридиния,  $[\text{C}_5\text{H}_5\text{NH}]^+[\text{CrO}_3\text{Cl}]^-$  [346]); **4)** оксалилхлорид с диметилсульфоксидом в присутствии основания (окисление по Сверну) [347, 348]; **5)** окисление в присутствии нитроксильного радикала 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксила [349].

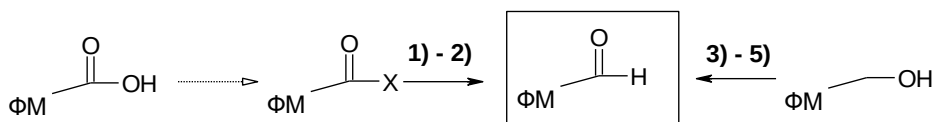


**Рисунок 1.67.** Способы получения альдегидных производных ФМ (X – Cl, O-алкильный остаток).

Наиболее распространенным способом получения гидразидов ФМ является ацилирование гидразина активированными сложными эфирами, ангидридами или хлорангидридами карбоновых кислот [350, 351]. Наиболее распространенным методом синтеза гидразидов ФМ является ацилирование гидразина сложными эфирами, ангидридами или хлорангидридами карбоновых кислот (рис. 1.68).

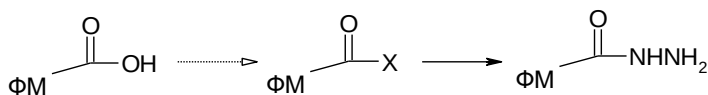


**Рисунок 1.68.** Способы получения гидразидных производных ФМ (X – Cl, O-алкильный остаток).

Суммируя изложенное, несмотря на широкий ассортимент как коммерческих, так и lab-made модификаторов, для реализации данной реакционной "пары", в случае, необходимости, можно использовать аминоксодержащие олигонуклеотиды (подраздел 1.1.2.1) в сочетании с бифункциональными реагентами SANH и SFB (рис. 1.59), что позволит получать альдегид-/гидразид-содержащие олигонуклеотиды, модифицированные по любому положению цепи.

#### 1.1.2.7. Сочетания тиол/малеимид, тиол/тиол или тиол/галогенид

Еще одним типом реакций, широко используемых для получения конъюгатов олигонуклеотидов, являются превращения с участием тиольных (SH-) группировок: алкилирование тиолов алкилгалогенидами, преимущественно иодидами (рис. 1.69А), тиол-малеимидное (тиол-еновое) присоединение (рис. 1.69Б), тиол-дисульфидный (тиольный) обмен (рис. 1.69В) или окислительное сульфидрильное присоединение (рис. 1.69Г). Реакция алкилирования тиолов/тиолятов алкилгалогенидами представляет собой адаптированную к тиолам реакцию Вильямсона [352] (названа в честь английского химика А. Williamson) - известный с 1850 года способ образования простых несимметричных эфиров. Тиол-еновая реакция известна уже более 120 лет, поскольку еще в начале 1900-

х годов Т. Posner [353] изучал взаимодействие меркаптанов с ненасыщенными углеводородами. Способ контролируемого образования S-S-связи, основанный на реакции тиол-дисульфидного обмена, был предложен в 1970 г. V.P. Saxena и D. Wetlaufer [354]. Открытие роли тиоловых групп, которые могут окисляться самым широким спектром окислителей с образованием дисульфидов, в метаболических процессах в живых системах произошло в конце 40х начале 50х годов прошлого столетия, когда немецкий биохимик F. Lippmann [355, 356] доказал, что активность кофермента А объясняется наличием тиоловой (SH) группы меркаптоэтиламина.

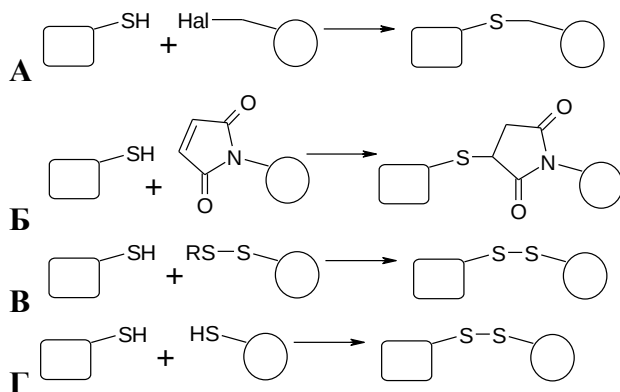


**Рис. 69.** Общие схемы реакций с участием SH-групп (R: 2-пиридил; Hal: атом галоида).

По факту, наиболее распространенным вариантом получения конъюгатов независимо от расположения реагирующих групп в паре олигонуклеотид/ФМ стало использование тиол-малеимидного присоединения - реакции образования стабильной тиоэфирной связи (рис. 1.70А,Б).

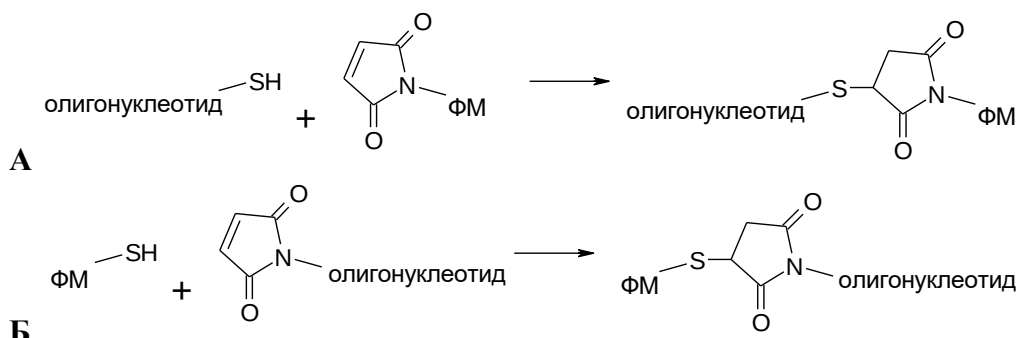


**Рисунок 1.70.** Схематичное изображение взаимодействия олигонуклеотидов и ФМ, содержащих тиольные и малеимидные группы.

Коммерческие модификаторы олигонуклеотидов, содержащие защищенные тиольные группы, широко используются в рамках автоматического синтеза производных олигонуклеотидов (рис. 1.71А). Это могут быть остатки, в которых тиольный остаток открывается при обработке дитиотреитом или нитратом серебра (I). Альтернативно, для обеспечения тиолзависимой конъюгации, может быть использован 5'-терминальный фосфитамидный синтон, несущий замаскированную малеимидную функцию,

регенерируемую по реакции [4+2] циклоэлиминирования (реакция ретро-Дильса-Альдера [357]) (рис. 1.71Б). Удобным вариантом дополнительной функционализации аминоксодержащих олигонуклеотидов (подраздел 1.1.2.1) является использование бифункциональных линкер-формирующих молекул, *N*-гидроксисукцинимидных эфиров 4-(*N*-малеимидометил)циклогексанкарбоновой (SMCC) и 3-меркаптопропионовой (NHS-SH) кислот (рис. 1.71В).

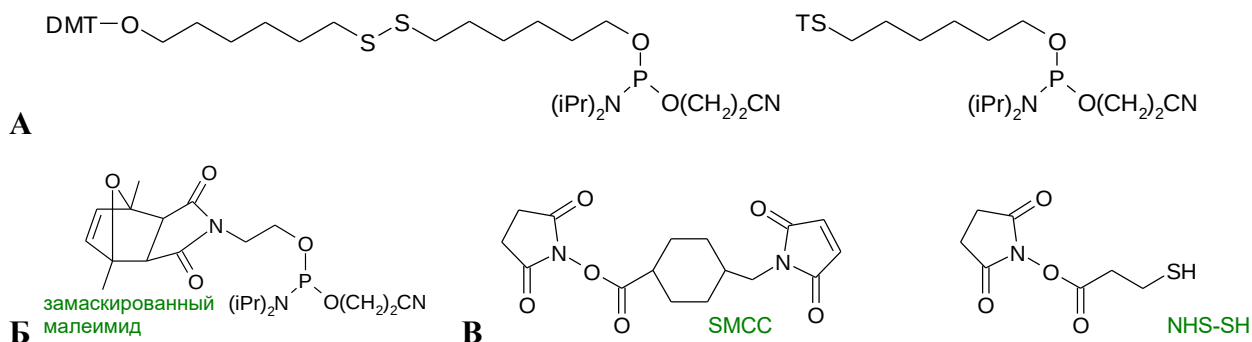


**Рисунок 1.71.** Структуры коммерчески доступных тиол- (А) и малеимид- (Б) содержащих фосфитаминов, бифункциональных реагентов (В) для опосредованного введения малеимидной или тиольной функций в аминомодифицированный олигонуклеотид (Т – тритильная защитная группа).

Набор коммерческих малеимидов включает в себя в основном различные красители. На рисунке 1.72А в качестве примера приведены малеимиды индоцианинового зеленого (ICG), цианинового (Cy5) и ксантенового (TAMRA) красителей, пиренмасляной кислоты и биотина. Коммерческие тиолсодержащие реагенты (рис. 1.72Б) в основном представлены различными полиэтиленгликолями (например, CT(PEG)<sub>12</sub>, mPEG<sub>4</sub>-SH).

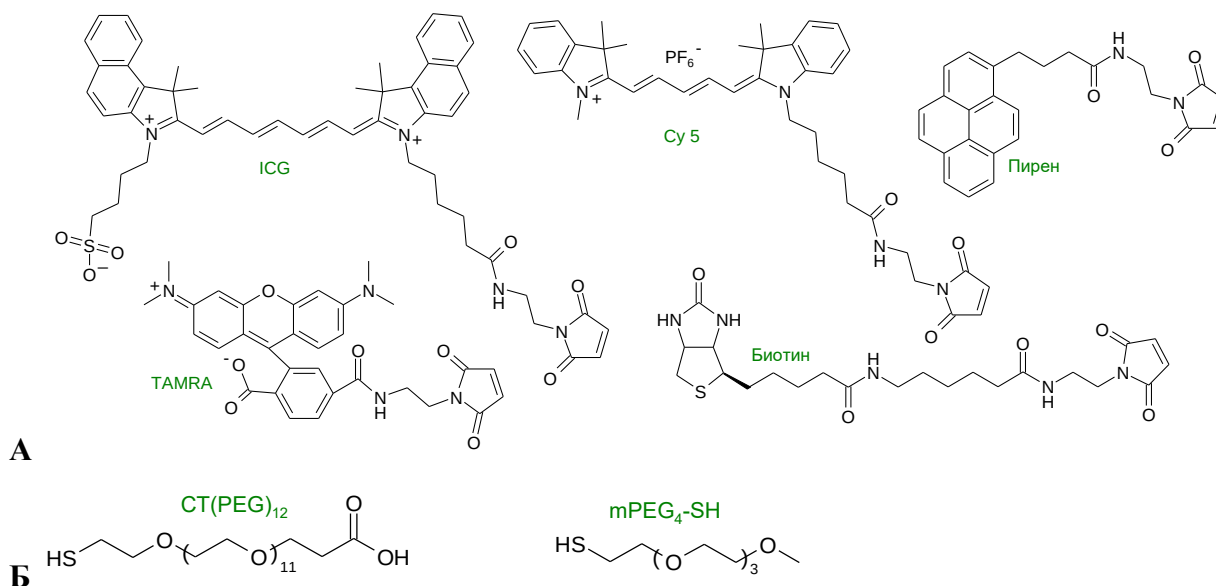


**Рисунок 1.72.** Структуры коммерчески доступных малеимидных (А) и тиольных (Б) производных ФМ.

Реакция Вильямсона (исходно предложенная для спиртов) была адаптирована для использования с тиолсодержащими олигонуклеотидами и иод- или бромацетамидными производными ФМ (рис. 1.73А). В частности, было показано, что в случае пептидов конъюгирование можно провести за несколько часов при комнатной температуре (напр., [358–361]). Окисление сульфидрильных групп, равно как и тиол-дисульфидный обмен (рис. 1.73Б) приводит к образованию конъюгатов, в которых ФМ и олигонуклеотид соединены биолабильной S-S связью (напр., [362–364]).

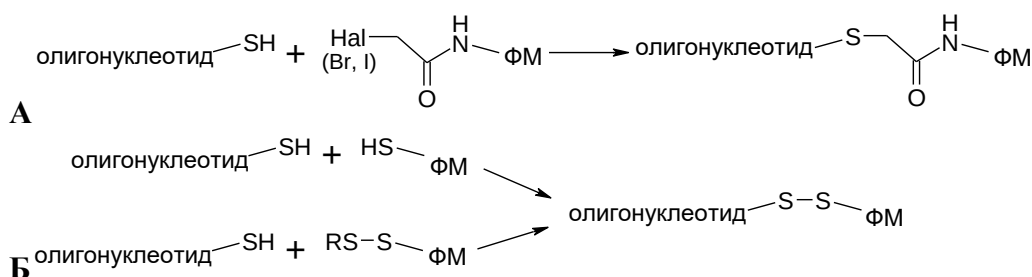


**Рисунок 1.73.** Схематичное изображение конъюгирования тиолсодержащих олигонуклеотидов (**А**) с бром(иод)ацетамидными производными ФМ по реакции Вильямсона; (**Б**) с ФМ, содержащими тиольную группу или дисульфидную связь (R: 2-пиридил).

Применительно к синтезу олигонуклеотидных конъюгатов с различными ФМ в литературе описаны lab-made варианты нуклеотидных SH-содержащих модификаторов. Так, например, в работе [365] вводили S-S-содержащий фрагмент в C5-положение тимидина, используя 3-(2-*трет*-бутилдисульфанил)-тиопропионовую кислоту (рис. 1.74А, структура I). Носитель, содержащий 2'-O-(2-*трет*-бутилдисульфанилэтил)-N<sup>6</sup>-изобутирил-аденозин (рис. 1.74А, структура II), был получен в результате 9-ти стадийного синтеза исходя из ключевого 2'-O-бромэтильного производного аденозина [366]. Примеры структур ненуклеотидных lab-made ФМ, содержащих открытую и защищенную тиольную и малеимидную функции [364, 367, 368] представлены на рисунке 1.74Б.

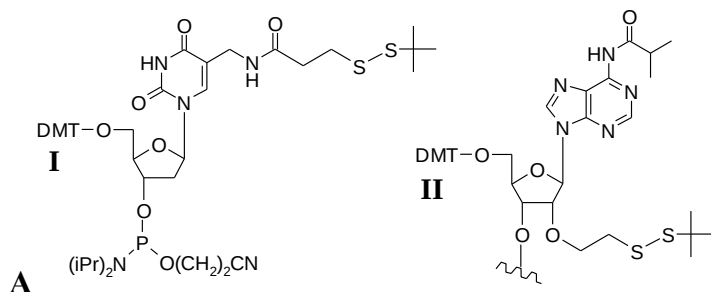


**Рисунок 1.74. А** - Структуры нуклеотидных lab-made модификаторов, содержащих замаскированную тиольную функцию в C5-положении тимидина или 2'-положении рибозы.

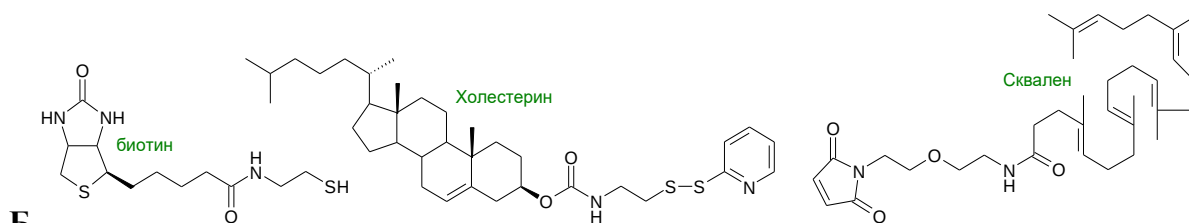


**Рисунок 1.74 (продолжение). Б** - Структуры ненуклеотидных lab-made модификаторов, содержащих тиольную и малеимидную функции.

В этом разделе также стоит обратить особое внимание на так называемую реакцию "нативного химического лигирования" – одного из эффективных способов образования пептидной связи при конъюгации производных тиокарбоновой кислоты и цистеин-содержащих молекул. Исторически этот вариант был предложен для синтеза протяженных пептидов, поскольку позволил нарастить длину пептидов, получаемых твердофазным химическим синтезом, сверх 50 аминокислотных остатков. Хемоселективная реакция "нативного лигирования" (native chemical ligation [369]) была предложена в 1994 году. Взаимодействие незащищенных пептидных фрагментов, один из которых содержит С-концевой тиоэфир, а другой – N-концевой цистеин (рис. 1.75), дает возможность получать конъюгат на основе пептидной связи. Важно, что реакция проходит не только в водном растворе, но и в присутствии денатурирующих агентов и органических растворителей и, таким образом, позволяет "сшивать" как гидрофильные, так и гидрофобные фрагменты биологически активных молекул. Такой вариант конъюгирования наилучшим образом подходит для синтеза конъюгатов олигонуклеотидов с пептидами или другими ФМ, содержащими в своем составе остаток цистеина (напр., [370–376]).

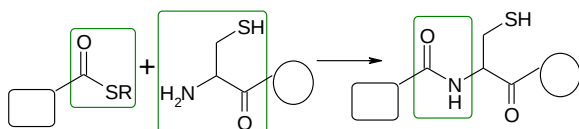


**Рисунок 1.75.** Общая схема хемоселективной реакции "нативного лигирования" (R:алкил).

Как видно из раздела реакции конъюгирования с участием SH-групп довольно популярны для модификации биомолекул, и особенно белков, пептидов и антител, которые, как правило, исходно содержат в своих структурах тиольные остатки [202, 377–385]. Реакция Вильямсона в основном применяется в синтезе пептидных конъюгатов. Важной особенностью использования малеимид-тиольного взаимодействия следует считать мягкость условий проведения реакции, обеспечивающую практически полную сохранность даже сложно организованных биомолекулярных структур. Формирование/разрыв дисульфидной S-S-связи является обратимой окислительно/восстановительной реакцией, определяющей особенности использования соответствующих конъюгатов.

### 1.1.2.8. Сочетания галоген/алкил-NH<sub>2</sub> или галоген/алкин

Молекулы, содержащие аминогруппу способны реагировать с галогеналканами, замещая атом галогена по реакции N-алкилирования (рис. 1.76А). Еще один вариант конъюгирования в котором участвует атом галогена - катализируемое палладием и медью образование связи углерод-углерод (рис. 1.76Б,В). Реакция алкинирования арилгалогенидов с использованием ароматических ацетиленов была описана в 1975 году тремя независимыми группами L.Cassar [386], H.A.Dieck и R.F.Heck [387], а также K.Sonogashira, Y.Tohda и N.Hagihara [388]. Во всех реакциях используются палладиевые катализаторы, однако в первых двух протоколах требуются жесткие условия реакции (например, высокие температуры). Использование медного сокатализатора в дополнение к палладиевым комплексам в методе K. Sonogashira позволило проводить реакции в мягких условиях с хорошим выходом. Реакция Сузуки (Сузуки–Мияуры, рис. 1.76В) - органическая реакция, в которой используется комплексный катализатор палладия для перекрестного соединения борной кислоты и ее производных с галогенорганическими молекулами, была впервые опубликована в 1979 году N.Miyaura и A.Suzuki [389]. Реакции Сузуки и Соногаширы относятся к типу реакций кросс-сочетания и могут протекать в присутствии широкого спектра других функциональных групп, что особенно важно в синтезе сложных молекул.

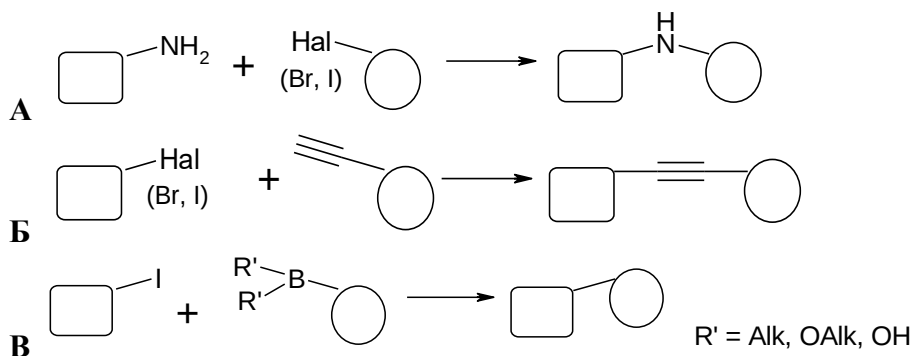


**Рисунок 1.76.** Схематичное изображение реакций алкилирования (А), Соногаширы (Б) и Сузуки (В) (Alk – алкильный остаток).

Применительно к синтезу конъюгатов олигонуклеотидов с различными ФМ преимущественно используют взаимодействие галоид-содержащих (бром или иод) олигонуклеотидов с амино-, алкинил- или бормодифицированными ФМ (рис. 1.77). Как правило такое конъюгирование проводят в гетерофазном варианте.

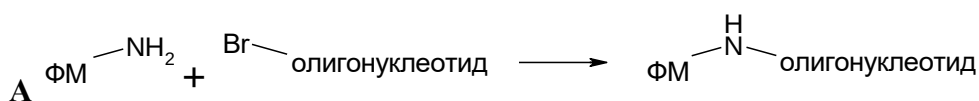


**Рисунок 1.77.** Схематичное изображение взаимодействия бром(иод)-содержащих олигонуклеотидов и амино-, алкин- или бор-модифицированных ФМ.

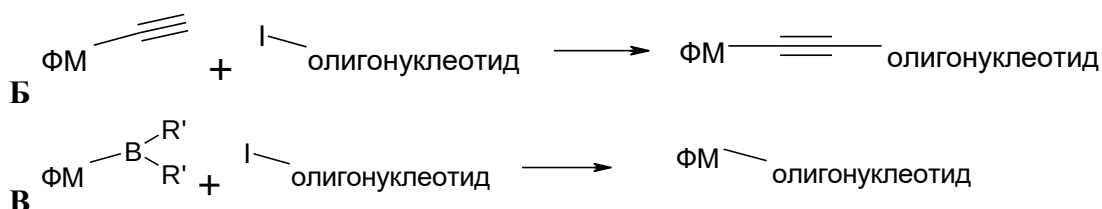


**Рисунок 1.77 (продолжение).** Схематичное изображение взаимодействия бром(иод)-содержащих олигонуклеотидов и amino-, алкин- или бор-модифицированных ФМ ( $\text{R}' = \text{Alk}$ ,  $\text{OAlk}$ ,  $\text{OH}$ ;  $\text{Alk}$  – алкильный остаток).

Линейка нуклеотидных фосфитаминов или носителей, содержащих атом галоида в гетероциклическом основании, хорошо представлена в коммерческом доступе (атом галоида: Br, F, I; нуклеозид: аденозин, уридин, цитидин, гуанозин), однако для конъюгирования по описанным выше реакциям используют только бром- и иодсодержащие модификаторы, представленные на рисунке 1.78А. В качестве примера коммерчески доступных борсодержащих ФМ можно привести пирен-1-ил и 3-(дансиламино)фенил-бороновые кислоты (рис. 1.78Б). Описание коммерческих и получение lab-made amino- и алкинил-содержащих ФМ представлено в подразделах 1.1.2.1 и 1.1.2.3, соответственно.

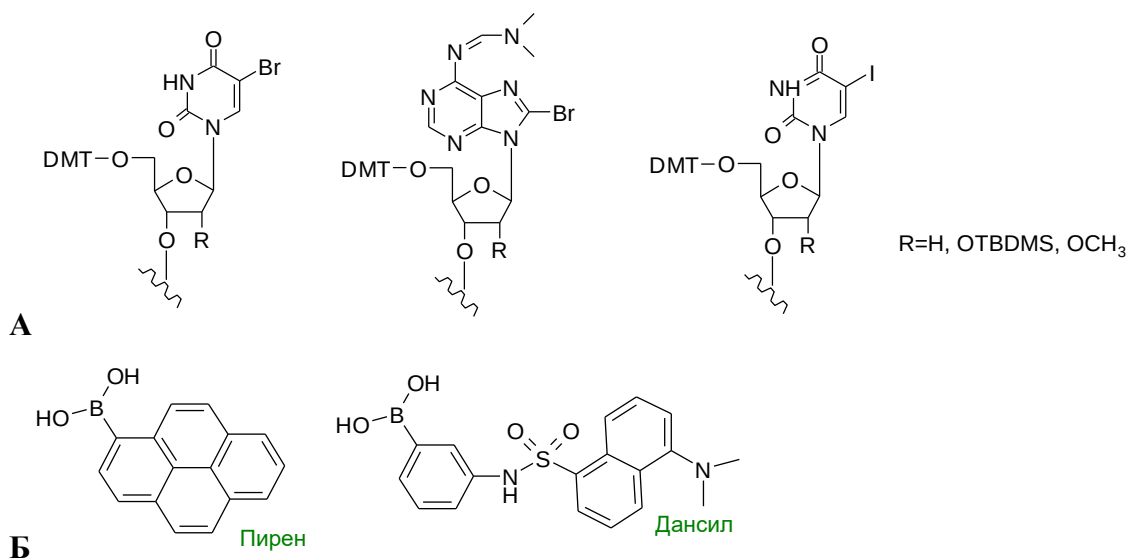


**Рисунок 1.78.** Структуры коммерчески доступных (А) - 5-бром-(иод)-уридин- и 8-бромаденозин-содержащих модификаторов; (Б) - пирен-1-ил- и 3-(дансиламино)фенил-производных бороновых кислот.

В lab-made варианте авторы работ [390–392] использовали Н-фосфонатный метод синтеза олигонуклеотидов и получали Н-фосфонаты C5-бромуридина и C8-бромаденозина для последующего введения в эти гетероциклические основания линейки диаминов (рис. 1.79). Аминомодифицированные олигонуклеотиды были использованы далее для получения производных олигонуклеотидов, содержащих нитроксильные метки или

перфторарилазидные группы для изучения, например, структурно-функциональной топографии рибосом человека [393–399].

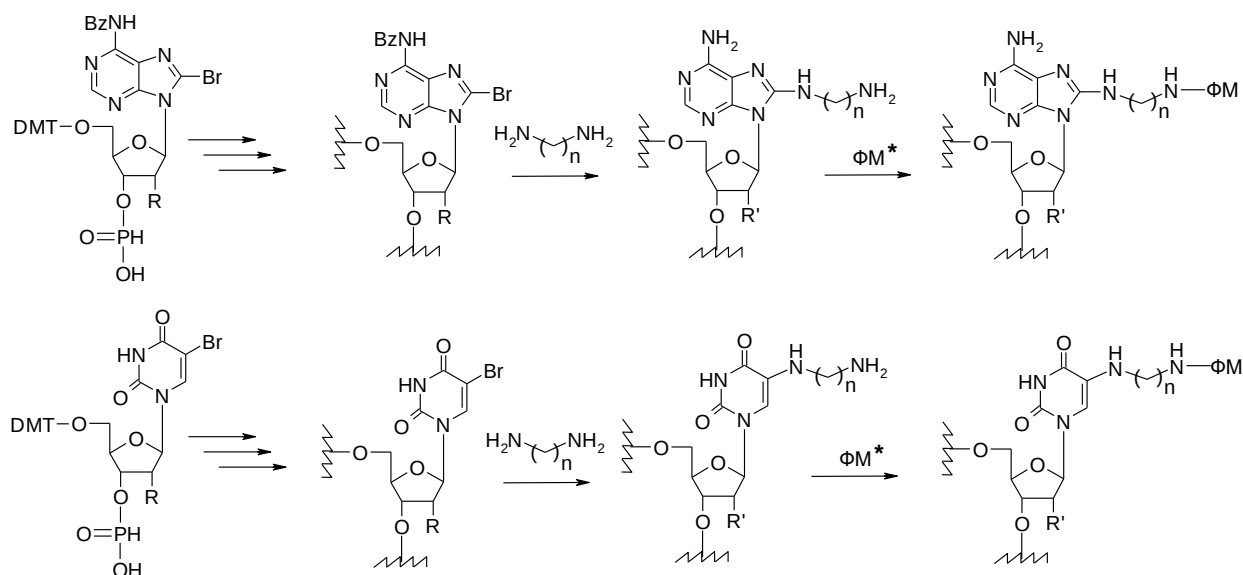


**Рисунок 1.79.** Схематичное изображение получения конъюгатов олигонуклеотидов с ФМ, введенными по гетероциклическим основаниям уридина или аденозина (~~~~ - олигонуклеотид;  $n=2,3,4,6$ ; ФМ\* - активированное производное ФМ; R - H, OTBDMS, OCH<sub>3</sub>; R' - H, OH, OCH<sub>3</sub>; TBDMS – *трет*бутилдиметилсилил-).

В работе [400] конъюгаты с нитроксильными метками были получены по реакции Соногаширы с использованием серии иод-содержащих нуклеотидных модификаторов - коммерческого 5'-*O*-диметокситритил-2'-*O*-*трет*бутилдиметилсилилнуклеозид фосфитамида для стандартного (3'→5') синтеза и lab-made 2'-бис(ацетоксиэтокс)метил- (ACE) содержащих фосфитамидов рибо-ряда для синтеза по 2'-ACE протоколу, предложенному фирмой Dharmascon™ (рис. 1.80).

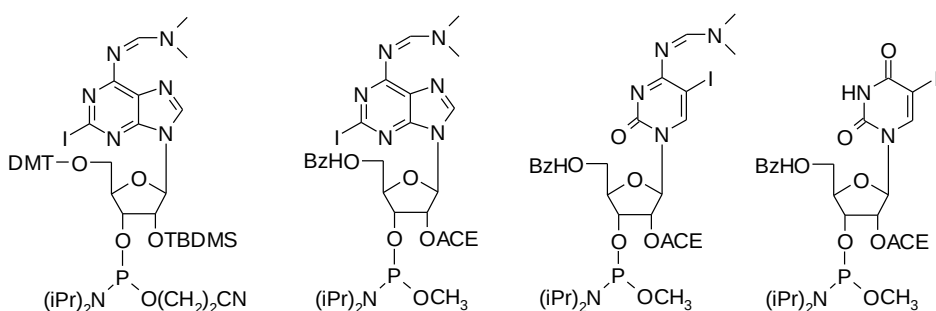


**Рисунок 1.80.** Структуры галоидсодержащих lab-made фосфитамидов.

Замена 5'-концевой гидроксильной группы на атом иода в составе олигонуклеотида также позволяет проводить успешное конъюгирование с ФМ в гетерофазном варианте. Для введения атома иода можно использовать либо 5'-концевой фосфитамид-модификатор, уже содержащий атом иода (рис. 1.81А), либо конвертировать полученный после

автоматического синтеза олигонуклеотид в 5'-иод производное [401] согласно схеме на рисунке 1.81Б.

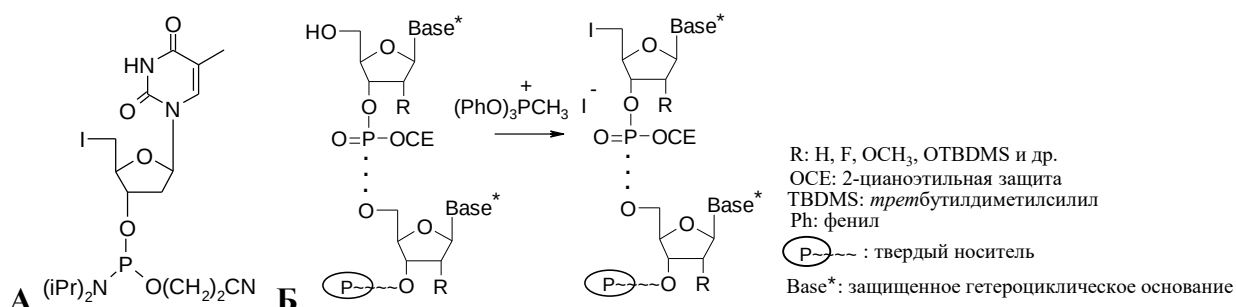


**Рисунок 1.81.** А - Структура коммерчески доступного терминального 5'-иод фосфитамида-модификатора. Б – Введение иода на 5'-конец олигонуклеотидной цепи.

Также атом иода на 5'-конце олигонуклеотидной цепи может быть трансформирован в азидо-, amino- или тиольную группы с высокими выходами, как это представлено в [402–405] (рис. 1.82). Полученные 5'-аминопроизводные можно использовать в реакциях с NHS-эфирами ФМ (рис. 1.20, 1.23) или с альдегидными производными ФМ (рис. 1.58, 1.60, 1.67). Азидо группа на 5'-конце олигонуклеотидной цепи пригодна для реакции азид-алкинового циклоприсоединения (рис. 1.41). 5'-Тиольные производные могут быть использованы для получения конъюгатов по соответствующим реакциям, представленным выше (рис. 1.70, 1.73).

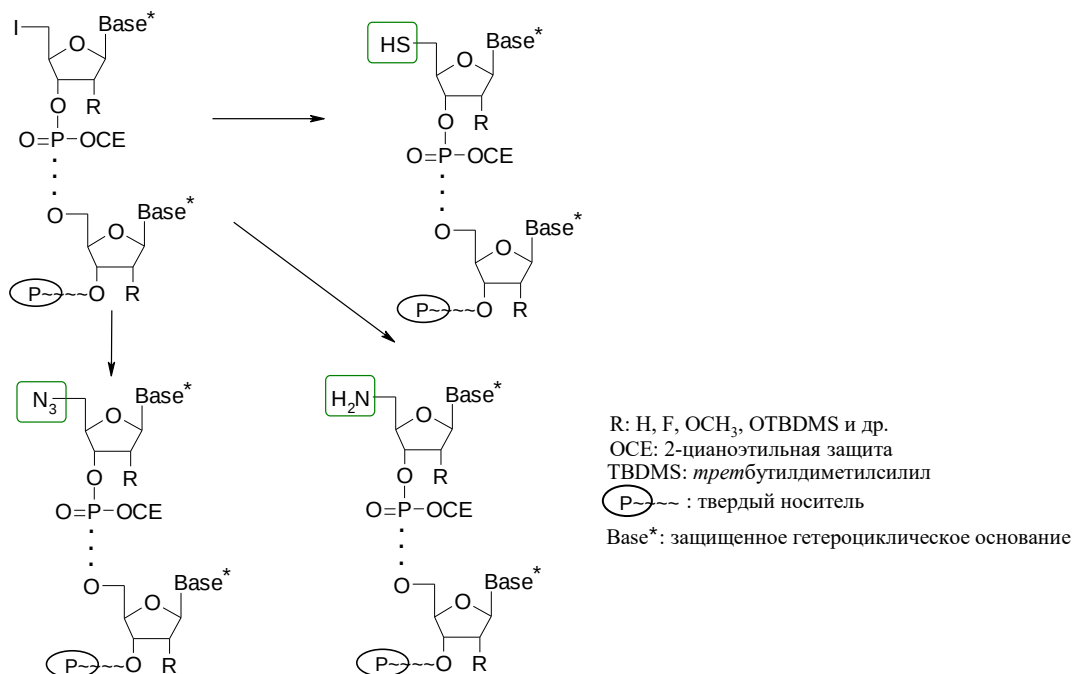


**Рисунок 1.82.** Схема превращений 5'-иод содержащего олигонуклеотида.

Описанные в подразделе варианты реакций активно используют как для модификации олигонуклеотидной цепи в целом, так и для синтеза различного типа модификаторов (напр., [406–412]).

Возможности применения *постсинтетического* подхода, с учетом разнообразия реакционноспособных группировок, представленных в данном разделе и обеспечивающих специфическое (ортогональное) взаимодействие между собой, практически безграничны и позволяют, в том числе, получение не только моно-, но и мультифункционализированных конъюгатов.

## 1.2. Заключение

Олигонуклеотиды и конъюгаты на их основе занимают одно из ключевых мест в молекулярной биологии, биомедицине и фармацевтике, выступая в роли молекулярных зондов и средств терапии генетических, инфекционных и другого типа заболеваний. Создание правильно сконструированных конъюгатов олигонуклеотидов с функциональными молекулами значительно повышает их биологическую активность и селективность, сохраняя биологическую функцию как олигонуклеотида, так и самой ФМ, минимизируя утрату ключевых свойств, обеспечивающих взаимодействие целевого конъюгата с биомишенями. Следует помнить, что нет унифицированной стратегии конъюгирования для любой пары олигонуклеотид/ФМ, в каждом случае нужен индивидуальный подход, учитывающий их структуры. Для синтеза таких конъюгатов можно использовать готовые ФМ-модификаторы в рамках *пресинтетического* подхода, обеспечивающего: 1) простоту процесса (использование готовых модификаторов значительно сокращает время и ресурсы, необходимые для синтеза конъюгатов); 2) возможность стандартизации и воспроизводимости (при использовании коммерчески доступных модификаторов можно гарантировать высокую эффективность встраивания целевых ФМ в олигонуклеотидную цепь, что облегчает масштабирование производства). *Постсинтетический* подход, основанный на использовании реакционно-комплементарных пар (биоортогональных реакций), предполагает: 1) большой выбор реакционных групп (модификаторы часто имеют разные функциональные группы, что позволяет исследователям легко адаптировать коммерческие предложения (или lab-made варианты) под конкретные экспериментальные требования); 2) вариативность (процесс синтеза олигонуклеотидов становится проще благодаря готовым синтонам, которые можно легко внедрять в синтетическую цепь в рамках постфункционализации); 3) скорость синтеза (реакционные группы, использующиеся в таких "парах", обычно демонстрируют приемлемую скорость реакции и хороший выход целевого продукта). Независимо от того какой вариант получения конъюгатов выбран это позволяет не только расширить

функциональные возможности олигонуклеотидов, но и улучшить их характеристики для успешного применения в биомедицинских исследованиях и терапии.

Несмотря на значительный прогресс в области биоконъюгации, потребность в поиске новых методологических подходов остается актуальной. Растущие запросы молекулярной биологии и фармакологии диктуют необходимость оптимизации процессов, направленных на сокращение временных, трудовых и материальных затрат. В связи с этим разработка новых химических инструментов для биомодификации сохраняет высокую значимость. Стремление исследователей к повышению выхода целевых продуктов и снижению побочных эффектов позволят не только совершенствовать таргетную терапию, но и дадут возможность оперативного варьирования молекул, предназначенных для конъюгации с нуклеиновыми кислотами.

## **Глава 2. 5'-Конъюгаты олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов с биологически активными соединениями - основа моно- и мультифункциональных НК-конструкций с сочетанием нужных характеристик как высокоселективных инструментов для молекулярно-биологических исследований (Результаты и обсуждение)**

Работа представляет собой комплексное решение задачи по созданию моно- и мультифункциональных НК-конструкций с сочетанием нужных характеристик как высокоселективных инструментов для молекулярно-биологических исследований и потенциальных терапевтических препаратов на основе 5'-конъюгатов олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов с биологически активными соединениями различной природы, включая разработку высокоэффективных протоколов синтеза олигонуклеотидов (в том числе протяженных, длиной до 100 нт и более) и их конъюгирования с функциональными молекулами.

С развитием генных технологий и успехах в синтезе модифицированных, в том числе по рибозофосфатному остову олигонуклеотидов, включая их электронеутральные аналоги, диагностика различных инфекционных заболеваний, определение геномных мутаций, изучение экспрессии генов, создание терапевтических препаратов с каждым годом наращивают свой потенциал. Секвенирование ДНК и РНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР), генная терапия, создание генетически модифицированных организмов (ГМО), химический синтез генов, белковая инженерия, ДНК-оригами, праймеры, гибридизационные зонды - вот неполный список приложений в генетике и молекулярной биологии который использует химически синтезированные олигонуклеотиды.

Как уже отмечалось выше, открытие CRISPR/Cas-технологии, регуляция экспрессии генов с использованием аналогов микроРНК или siРНК, интерес к аптамерам, как компонентам систем доставки и распознавания молекул-мишеней, а также быстрый рост числа олигонуклеотидных РНК-препаратов, одобренных к применению в терапии, сдвигает фокус исследователей в сторону синтетических нативных и модифицированных РНК как для проведения фундаментальных исследований, так и для разработки новых тест-систем и препаратов для клеточной и генной терапии.

В представленной работе для получения 5'-конъюгатов олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов было использовано два подхода к твердофазному конъюгированию: пресинтетический - использование на последнем синтетическом цикле модифицированного синтона, содержащего целевую ФМ; постсинтетический - когда защищенный носитель-

связанный олигонуклеотид содержит в своем составе реакционную группу, способную к дальнейшей функционализации уже вне синтетического цикла синтеза. Оба подхода накладывают ограничения на структуру вводимой ФМ - она должна быть стабильна в условиях присоединения к олигонуклеотиду и в условиях его финального деблокирования. Но они обладают всеми преимуществами твердофазного метода синтеза: позволяют использовать широкий набор растворителей, в том числе варьировать в широких пределах соотношение водно-органической фазы; при необходимости использовать значительные избытки вводимых биомолекул; непрореагировавшие реагенты и возможные побочные продукты реакции на всех стадиях можно легко отделять путем промывок, поскольку в процессе синтеза конъюгат все время присоединен к носителю.

Одной из ключевых проблем при рассмотрении олигонуклеотидов и их конъюгатов в качестве терапевтических агентов является их адресная доставка к органу-мишени. Поэтому в качестве биоактивных транспортных молекул для конъюгирования в данной работе был использован набор ФМ, способных потенциально улучшать доставку олигонуклеотидов в клетки-мишени.

Холестерин – представитель класса стероидов – выполняет важные структурные и регуляторные функции, входя в состав биомембран и выступая предшественником в синтезе физиологически активных соединений разных классов. Он является наиболее известной биогенной молекулой, которая может усваиваться клеткой и выводиться из нее с помощью естественных клеточных механизмов. Интернализация холестерина в клетки происходит посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза и большая часть холестерина транспортируется по кровотоку в виде сложных эфиров холестерина в форме липидо-белковых частиц, известных как липопротеины низкой плотности (ЛПНП) [413]. С ЛПНП и клеточными мембранами также взаимодействуют: литохолевая кислота – представитель класса желчных кислот – ключевых регуляторов системного метаболизма и энергетического обмена организма;  $\alpha$ -токоферол (витамин Е) – представитель класса витаминов – является антиоксидантом и антигипоксантом, защищая клеточные и митохондриальные мембраны от окислительного повреждения; эстрон – еще один представитель класса стероидов – помимо участия в регуляции гормонального фона, защищает от сердечно-сосудистых заболеваний и инсультов, способствует укреплению тканей периферических кровеносных сосудов; олеиловый спирт или олеиламин – производные олеиновой кислоты, которая относится к группе омега-9 ненасыщенных жирных кислот – в организме человека липиды омега-9 выполняют энергетическую, противовоспалительную, антипролиферативную, гипотензивную и структурную функции,

в частности, участвуют в построении клеточных мембран [27, 40, 414–418]. Глицирретиновая кислота – тритерпен, обладающий широким спектром фармакотерапевтических свойств, включая антиоксидантные, противовоспалительные, противовирусные, антимикробные, противораковые свойства [36, 72–74]. Как известно, на поверхности клеток печени имеется большое количество рецепторов к глицирретиновой кислоте [75, 76], поэтому данная кислота и ее производные широко используются в системах доставки, включая липосомы, мицеллы и наночастицы [77–79]. Анисамид – производное *p*-анисовой кислоты – низкомолекулярная ФМ, перспективная для терапии некоторых заболеваний, таких как гиперлипидемия, диабет, инсульт, рак, ВИЧ-инфекция и другие, за счет своей аффинности к сигма-рецепторам, мембранным белкам эндоплазматического ретикулума, участвующим в регуляции связей между органеллами [419–421]. В ряде работ было показано, что присоединение короткого пептида трилейцина улучшает внутриклеточную доставку и эндосомальный выход олигонуклеотидов [422, 423]. Фолиевая кислота – витамин, необходимый для роста и развития кровеносной и иммунной систем – является одной из широко используемых ФМ, т.к. способна связываться с клеточными поверхностными фолатными рецепторами с высоким сродством. Рецепторы к этому витамину стали важными молекулярными мишенями для исследований рака, так как они гиперэкспрессируются в различных типах опухолей [424].

Как видно, большинство биомолекул, использованных в работе, можно отнести к липофильным соединениям. Разработанные подходы особенно удобны для твердофазного синтеза олигонуклеотидных конъюгатов, содержащих высокогидрофобные остатки, из-за отсутствия необходимости поиска растворителей, которые подходят как для экстремальных липофилов, так и для гидрофильных олигонуклеотидов.

## 2.1. Разработка протоколов синтеза олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов средней длины и протоколов синтеза нативных и модифицированных протяженных олигорибонуклеотидов

В настоящее время на российском рынке представлены около 10 компаний<sup>3</sup>, предлагающих свои услуги по стандартному синтезу олигодезоксирибонуклеотидов (в том числе с большим разнообразием модификаторов, в частности красителей) с заявленной длиной до 60-150 звеньев, причем оговаривается возможность синтеза до 200 звеньев. Только у одной из компаний в прайс-листе заявлены к введению в олигонуклеотиды в качестве модификаций мономерные звенья *рибо*-ряда (2'-F/2'-O-Me/2'-OH). Несколько компаний предлагают синтез нестандартных олигонуклеотидов и синтез РНК по договоренности. Зарубежная фирма IDT [425] помимо стандартного синтеза олигодезоксирибонуклеотидов длиной до 100 (максимально до 200) звеньев, заявляет стандартный синтез олигорибонуклеотидов длиной до 60 звеньев, с возможностью увеличения длины до 120 звеньев. Фирма Agilent's [426] предлагает синтез гидовых РНК длиной до 120 звеньев. Синтез протяженных олигорибонуклеотидов длиной до 180 звеньев анонсируется на сайте GenScript [427]. Анализ отечественного и зарубежного рынков показывает, что спектр услуг по синтезу олигодезоксирибонуклеотидов достаточно широк и представлен множеством компаний, предлагающих синтез как нативных ДНК-фрагментов, так и их аналогов, содержащих различные модификации. В то же время синтез олигорибонуклеотидов менее распространен, поскольку получение протяженных последовательностей, особенно с введением специфических модификаций или функциональных молекул, остается сложной и дорогостоящей задачей, за решение которой берется ограниченное число исполнителей. Таким образом, в условиях тенденции сдвига научного интереса в сторону "мира РНК" разработка собственных протоколов синтеза РНК (в том числе протяженных последовательностей) является стратегически важной задачей, особенно учитывая использование отечественного оборудования. Разработанные для отечественного синтезатора ASM-800/800E протоколы синтеза протяженных РНК могут быть востребованы в рамках реализации политики импортозамещения и технологической независимости в научной и научно-технической сферах.

Как уже упоминалось выше, для синтеза олигонуклеотидов различных типов в настоящее время используют автоматический твердофазный амидофосфитный метод

<sup>3</sup> ГенТерра, genterra.ru; Евроген, evrogen.ru; Синтол, syntol.ru; Бигль, biobeagle.com; Lumiprobe, ru.lumiprobe.com; Биолабмикс, biolabmix.ru; Биоссет, biosset.com; ДНК-Синтез, oligos.ru; Медиген, medigen.ru; Группа компаний Алкор Био, <https://forpcr.ru/services/>

синтеза с использованием ДНК/РНК синтезаторов (MerMade™, Bio-Oligo, PolyGen™, Dr. Oligo™, ABI, Applied Biosystems, AKTA Synthesizer). Несмотря на разницу в конструкциях, синтез, как правило, протекает в направлении от 3'- к 5'-концу олигонуклеотидной цепи и синтетический цикл для присоединения одного нуклеотидного звена состоит из четырех последовательных стадий - детритилирование, конденсация, кэпирование, окисление (рис. 2.1.1). Синтез проводят на ненабухающих или слабонабухающих твердых носителях (ТН). В качестве таковых наиболее часто используют стекло с контролируемым размером пор или макропористый полистирол. Стекланные носители с порами размером 500 Å (50 нм) механически прочны и обычно используются при синтезе коротких олигонуклеотидов. Выходы в синтезе снижаются, когда олигонуклеотиды длиной более 40-50 оснований получают на носителях с размером пор 500 Å. Это связано с тем, что растущая олигонуклеотидная цепь уменьшает диффузию реагентов через матрицу. Хотя носители с большими порами более хрупкие, ТН размером 1000 Å рекомендуют для синтеза олигонуклеотидов длиной до 100 оснований, а для более длинных олигонуклеотидов рекомендовано использование ТН размером 2000 Å. Выход (Y) целевого олигонуклеотида после автоматического синтеза без учета процедуры очистки рассчитывается по формуле  $Y = (\text{Эф.с.ц.})^{n-1} \cdot 100$ , где Эф.с.ц. – эффективность синтетического цикла для каждого присоединенного нуклеотида, n - длина олигонуклеотида (табл. 2.1.1). Например, при синтезе 20-звенного олигомера с эффективностью присоединения каждого нуклеотидного звена 95%, максимальный выход без учета процедуры очистки составит  $Y = (0,95)^{19} \cdot 100 = 37,7\%$ .

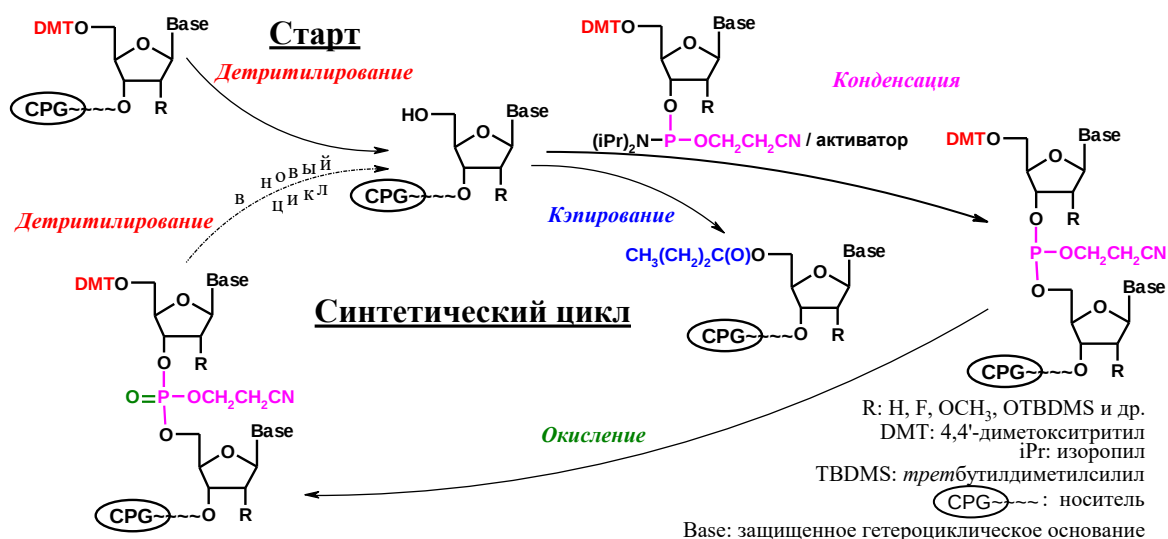


**Рисунок 2.1.1.** Общая схема синтетического цикла автоматического твердофазного фосфитамидного метода синтеза.

**Таблица 2.1.1.** Максимальный выход олигонуклеотида (в %) без учета процедуры очистки в зависимости от длины олигомера и эффективности синтетического цикла

| Эффективность | 95%   | 97%   | 98%   | 99%   | 99.5% |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Длина         |       |       |       |       |       |
| 10 звеньев    | 63.0% | 76.0% | 83.4% | 91.3% | 95.6% |
| 20 звеньев    | 37.7% | 56.1% | 68.1% | 82.6% | 90.9% |
| 50 звеньев    | 8.1%  | 22.5% | 37.2% | 61.1% | 78.2% |
| 100 звеньев   | 0.6%  | 4.9%  | 13.5% | 37.0% | 60.9% |

Как видно из приведенных расчетов, только высокая эффективность введения каждого нуклеотидного звена позволяет синтезировать протяженные олигонуклеотиды. Основные процессы, значительно влияющие на выход целевого олигомера или его производного можно условно разделить на два типа: технико-технологические, связанные в первую очередь с конструктивными особенностями синтезатора; и, химические, сопряженные с качеством всех компонентов и оптимизации условий всех химических процессов, реализуемых в рамках автоматического синтеза.

В первом случае можно выделить 4 аспекта: **1)** валидирование значений параметров синтезатора для исключения контаминации реагентов разных стадий; **2)** качество как реакторов, так и фильтров важно – они должны обеспечивать одинаковую скорость протекания реагентов и промывочных растворов, тем самым гарантируя требуемый объем и концентрацию реагентов в реакторе независимо от количества проведенных циклов синтеза; **3)** при выборе носителя, а также плотности (полноты) наполнения им реактора колоночного типа, необходимо учитывать то, какой длины предстоит синтезировать олигонуклеотид, поскольку общий объем твердой фазы увеличивается из-за роста цепи синтезируемого олигомера; **4)** обеспечение эффективного перемешивания носителя внутри реактора подачей реактивов, варьируя, например, скорость и схему прокачки промывочных растворителей и/или растворов реагентов.

К химическим аспектам можно отнести как "активность" в соответствующих реакциях используемых реагентов, так и сочетание химических группировок на каждой стадии синтеза. **1)** Олигомеры дезоксирибо-ряда, в отличие от рибо-ряда, требуют более тщательной оптимизации условий детритилирования (природа кислоты, ее концентрация, продолжительность этапа) из-за повышенной вероятности апуринизации растущей цепи ДНК. **2)** На синтез в целом значительно влияет выбор активирующего агента – в качестве таковых предложены 4,5-дицианоимдазол (DCI, pKa ~ 5.2) или 1H-тетразол (Tetr, pKa ~ 4.9) и его производные (5-этилтио-1H-тетразол (EtSTetr, pKa ~ 4.3), бензил-1H-тетразол (ВТТ, pKa ~ 4.1), 5-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-тетразол (Activator 42ТМ, pKa ~ 3.4)), так как от природы активатора существенно зависит эффективность и время реакции

конденсации [428, 429]. Выбирая активирующий агент и его концентрацию, следует учитывать, что в процессе конденсации может происходить частичное отщепление диметокситритильной группы с вновь присоединяемого мономерного звена из-за активатора кислотного типа и, как следствие этого, накопление более длинных олигомерных побочных продуктов ( $n+1$  и более) [430]. 3) При синтезе целевого олигонуклеотида (с длиной  $n$ ) существует вероятность образования укороченных последовательностей (олигомеры с длиной  $n-1$ ,  $n-2$  и т.д.), как правило, неомогенные по составу и являющиеся статистическим набором всех возможных  $n-1$ ,  $n-2$  и т.д. олигомеров. Вероятность тем выше, чем ниже эффективность этапа(ов) конденсации и/или этапа блокирования (кэпирования) непрореагировавшей 5'-гидроксильной группы. 4) В случае неполного окисления межнуклеозидный фосфиттриэфир деградирует под действием кислоты в условиях удаления диметокситритильной группы, что также может приводить к падению выхода целевого олигомера. 5) Немаловажное значение играет качество используемых в синтезе растворителей и реактивов и надежность обеспечения безводной среды на большей части синтетических этапов. 6) При получении олигомеров рибо-ряда следует учитывать главное отличие РНК от ДНК, значительно влияющее на их химический синтез - наличие защищенной 2'-гидроксильной группы в составе рибозы. Важным фактором при выборе подходящей 2'-защитной группы является стерическое влияние, которое она оказывает на амидофосфитный фрагмент в 3'-положении. Наиболее распространенным вариантом защиты 2'-ОН группы при синтезе РНК является объемная трет-бутилдиметилсилильная (TBDMS) защитная группа [59]. Для синтеза протяженных олигорибонуклеотидов были предложены рибофосфитамиды, содержащие менее стерически затрудненные триизопропилсилилоксиметильную (ТОМ), бис(2-ацетоксиэтокси)метильную (АСЕ), 1,1-диоксо-1 $\lambda$ (6)-тиоморфолин-4-карботиоатную (ТС), цианозтоксиметильную (СЕМ), пивалоилоксиметильную (PivOM), ацеталь-левулиновую (ALE) защитные группы (напр., [431–434]), что снижает стерическую нагрузку на соседнюю фосфорамидитную группировку на стадии конденсации. Однако фосфитамиды с такими защитами более дорогостоящи, а часть коммерчески не доступна.

В настоящем исследовании оптимизацию условий автоматического фосфитамидного синтеза олигорибонуклеотидов длиной до 100 и более звеньев проводили в масштабе 0.4 мкмоль (объем колонки 50 мкл) для отечественного восьмиколоночного синтезатора ASM-800/ASM-800E ("Биоссет", Новосибирск, Россия) с использованием 2'-O-TBDMS-защищенных рибонуклеозид-фосфитамидов и носителей CPG-500 (стекло с контролируемым размером пор), как широко представленных коммерчески и финансово

доступных. Для оценки рациональности (коммерческая и количественная составляющие) использования альтернативных носителей для синтеза протяженных олигонуклеотидов был взят CPG-1000. Для получения структурных аналогов РНК в работе также были использованы 2'-дезоксид-, 2'-O-Me-, 2'-F- и LNA рибонуклеозид-фосфитамида. За основу протокола операций автоматического фосфитамидного синтеза олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов была взята базовая управляющая программа по синтезу олигорибонуклеотидов для масштаба 0.4 мкмоль, входящая в комплект поставки ASM-800. Изменению подвергали параметры, соответствующие временам, объемам, скоростям и способам подачи значимых реактивов для каждой из четырех стадий. Объемы, скорости и времена для промывки колонок (реакторов) и каналов жидкостной системы между стадиями, а также для предварительного заполнения каналов от емкостей до смесителя растворами значимых реактивов оставляли без изменений, поскольку данные параметры подобраны производителем синтезатора с учетом его конструкторских особенностей. Была проведена оценка влияния качества используемых растворителей на эффективность синтеза.

В ходе экспериментов было показано:

- *носители* - Использование CPG-500Å (емкость 25-45 мкмоль/г) позволяет получать протяженные олигонуклеотиды. Ограничивающим фактором является плотность наполнения носителя в колонке – при синтезе олигомеров длиной более 70-ти звеньев наполнение не более чем на 1/2 объема. При сравнении с рекомендованным для синтеза протяженных олигомеров CPG-1000Å (емкость 15-30 мкмоль/г) показано снижение количества (нмоль) полученной реакционной смеси в 2-3 раза при одинаковом их качестве (электрофоретический анализ реакционных смесей в двух концентрациях представлен на рис. 1.2, панель Д).

- *растворители* – Растворители (исходные характеристики и их разброс см. раздел 3.3.2) перед использованием должны быть выдержаны над ситами не менее двух суток. Ацетонитрил, используемый для растворения активатора и фосфитамидов, должен быть перегнан над  $P_2O_5$  и выдержан сутки над гидридом кальция. Для дополнительного осушения полученных растворов в емкости W1, W2, CpB, а, с, g, t, Act необходимо добавлять молекулярные сита (Molecular Sieves, 3Å).

- *стадия детритилирования* – В представленной работе была использована 3 %-ная дихлоруксусной кислота в дихлорметане. Показано, что время обработки в одном цикле для олигонуклеотидов рибо-ряда не более 120 сек, дезоксирибо-ряда не более 90 сек.

- *стадия конденсации* – В ходе исследования в качестве активатора были взяты 5-этилтио-1*H*-тетразол (EtSTetr,  $pK_a \sim 4.3$ ) и 5-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1*H*-тетразол (Activator 42TM,  $pK_a \sim 3.4$ ). Показано, что использование EtSTetr позволяет эффективно синтезировать олигорибонуклеотиды длиной до 80-ти звеньев (концентрация 5-этилтио-1*H*-тетразола составляла 0.25 М, для дезокси- и 2'-*O*-метилрибонуклеозидфосфитаминов - 0.05 М (время конденсации 360 сек), а для 2'-*O*-TBDMS-, 2'-F- и LNA рибонуклеозидфосфитаминов - 0.1 М (время конденсации 660/600/720 сек)). Увеличение концентрации EtSTetr до 0.4 М и фосфитаминов до 0.15 М позволяет провести присоединение ("дошивку") еще 20 звеньев (синтез до 100 звеньев), однако заметно стабильное падение эффективности конденсации при мониторинге по диметокситритилкатиону (для модели ASM-800E). При синтезе олигорибонуклеотидов и их 2'-аналогов длиной до 40 нуклеотидов допускается использование растворов рибофосфитаминов в концентрации 0.075 М без потери в эффективности синтеза. Использование Activator 42 дает возможность не только стабильно получать фрагменты РНК длиной до 100 и более звеньев (рис. 1.2, панель Г), но и сократить, и унифицировать время стадии конденсации (общее время конденсации для 2'-*O*-TBDMS-, 2'-*O*-Me-, 2'-F- и LNA рибонуклеозидфосфитаминов – 360 сек, концентрация 0.1 М), равно как и допускается использование растворов рибофосфитаминов в концентрации 0.075 М при синтеза олигомеров длиной до 70 нуклеотидов. Если олигонуклеотидная последовательность содержит дезоксирибо-звенья, то в качестве активирующего реагента можно использовать только 5-этилтио-1*H*-тетразол.

- *стадия кэпирования* – В качестве кэпирующих реагентов были использованы смеси, содержащие пропионовый ангидрид, лутидин и 1-метилимидазол. Унифицированное время кэпирования при синтезе олигонуклеотида любой длины составило 110 сек.

- *стадия окисления* – В качестве окисляющего агента был использован молекулярный иод (концентрация 0.016-0.025М) в смеси тетрагидрофуран/вода/пиридин (90/9/1, v/v/v). Для протяженных олигонуклеотидов время окисления составило 100 сек., а в случае LNA звеньев 240 сек. Для олигонуклеотидов длиной до 60 звеньев время можно сократить до 70 сек. Для введения PS-модификации окисление проводили с использованием 0.05 М раствора *N,N*-диметил-*N'*-(3-тиооксо-3*H*-1,2,4-дитиазол-5-ил)метанимидамида в смеси пиридин/ацетонитрил (7/3, v/v) в течении 600 сек.

В качестве защитных групп экзоциклических аминотрещион гетероциклических оснований аденина, гуанина и цитозина при использовании реагентов, входящих в разработанные протоколы, показано использование бензоильной (bz), изобутирильной

(ibu), ацетильной (ac) или диметилформамидиновой (dmf) группировок. Использование Ultra Mild защитных групп (феноксиацетильная (PAC), 4-изопропилфеноксиацетильная (iPr-PAC)) нецелесообразно из-за их частичной замены на остаток пропионового ангидрида на стадии кэпирования (для фосфитаминов с Ultra Mild защитными группами на стадии кэпирования рекомендован феноксиуксусный ангидрид; использование этих реагентов ведет к удорожанию синтеза). Также следует учитывать, что при использовании dmf-защиты для аминогруппы гуанозина, концентрация окисляющего реагента не должна превышать 0.02 M, в противном случае на стадии окисления может образоваться до 20 % N-2-цианопроизводного гуанозина [435].

Для отщепления олигонуклеотида (содержащего любые комбинации 2'-дезоксиде, 2'-O-TBDMS-, 2'-O-Me-, 2'-F- или LNA-звеньев) от носителя, удаления защитных групп гетероциклических оснований и цианоэтильных защитных групп фосфатов предложенные протоколы допускают использование ряда реагентов, широко описанных в литературе: 40 %-ный водный раствор метиламина или смесь AMA (40 %-ный водный раствор метиламина/30 %-ный водный раствор аммиака, 1/1, v/v) в течении 2 ч при комнатной температуре (к.т.); 30 %-ный водный раствор аммиака 2 сут при к.т.; 0.05M раствор K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в метаноле 16 ч при к.т. [436]. В случае, если в синтезе был использован цитозин, содержащий bz-защитную группу, рекомендованы деблокирующие смеси, не содержащие метиламин, во избежание образования переаминированного цитозина [437]. Для удаления 2'-O-TBDMS защитных групп в настоящее время широко применяют смесь N-метил-2-пирролидинон/(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N/(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N·3HF (1.5/0.7/1.0) при 65 °C в течении 1.5 ч [438]. Было показано, что для олигорибонуклеотидов длиной более 80-ти звеньев необходимо увеличить в два раза объем используемой десилилирующей смеси и время реакции до 2.0 ч. Для выделения целевых олигомеров показано использование гель-электрофореза в денатурирующих условиях в 15 %-ном ПААГ. При выделении протяженных олигонуклеотидов длиной более 70-ти звеньев целесообразно использование 12 %-ного ПААГ.

На рисунке 1.2.1.а) в качестве примера приведены реакционные смеси олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов, полученные с использованием разработанных протоколов. На рисунке 1.2.1.б) приведены примеры тритилограмм при синтезе 30-, 63- и 87-звенных олигорибонуклеотидов (синтезатор ASM-800E).

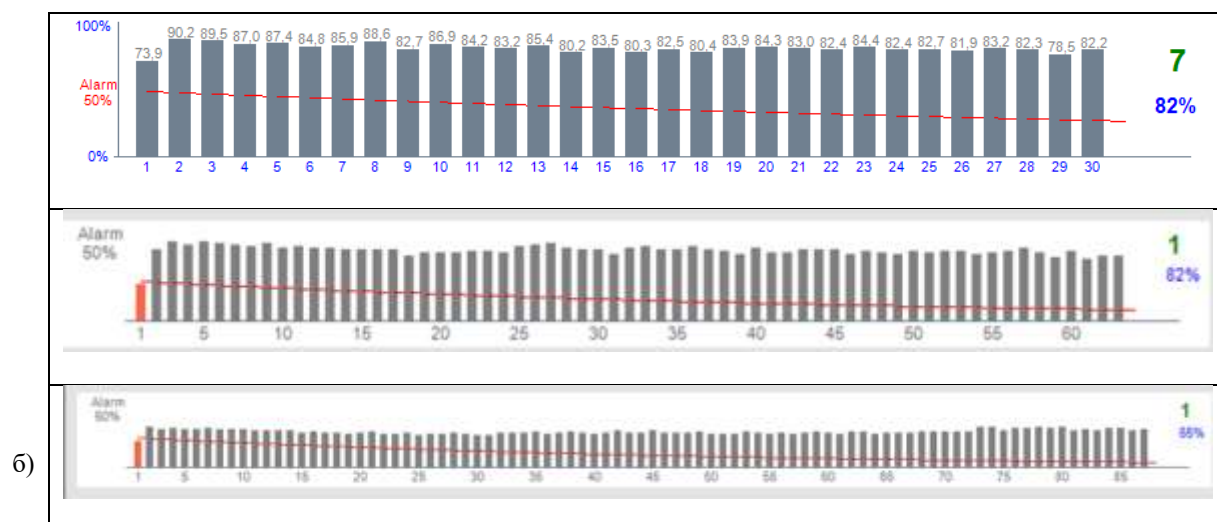
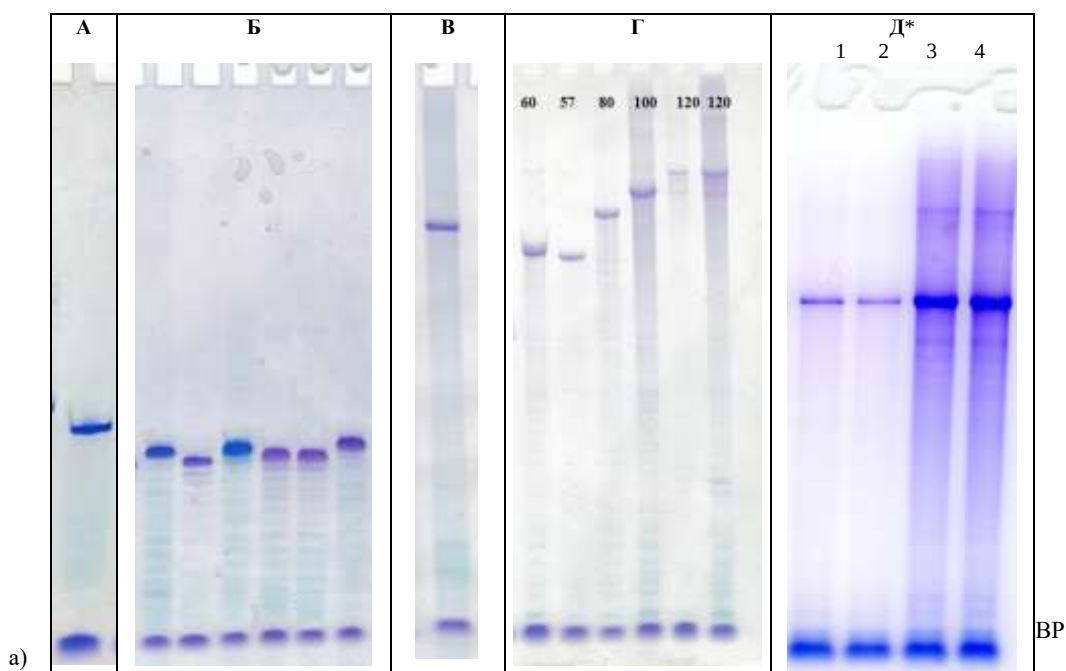


**Рисунок 2.1.2. а)** Анализ реакционных смесей олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов методом гель-электрофореза в 15 %-ном ПААГ в денатурирующих условиях (АА:бисАА 30/1, 7 М мочеви́на, ТБЕ буфер). Панели: **А** – смешанная 2'-F/2'-ОН/ сенс-цепь siРНК (21 зв.); **Б** – микроРНК смешанного состава (2'-F/2'-ОМе/2'-ОН; 19-23 зв.); **В** – смешанный 2'-F/2'-дезокси/2'-ОН/ аптамер (87 зв.); **Г** – олигорибонуклеотиды произвольного состава длиной 57, 60, 80, 100 и 120 звеньев; **Д** – гидовая РНК системы CRISPR/Cas9 (103 зв., получена на двух типах CPG-носителей с размером пор 500 Å (1, 3) и 1000 Å (2, 4)). Сканированные изображения гелей после окрашивания Stains-All. BP – краситель бромфеноловый синий. (\*) - 12 %-ный ПААГ (АА:бисАА 30/0,5, 7 М мочеви́на, ТБЕ буфер). **б)** Примеры тритилограмм при синтезе 30-, 63- и 87-звенных олигорибонуклеотидов (для синтезатора ASM-800E).

Предложенные протоколы позволяют получать с одного реактора 0.05 – 0.15 микроль реакционной смеси с содержанием целевого олигонуклеотида (длина от 10 до

100 звеньев) не менее 75 %<sup>4</sup> независимо от его длины. После препаративного выделения в ПААГ их выходы (в расчете на первое нуклеозидное звено) составили: общие – 10-25 %, на стадию – 85-97 %. Гомогенность подтверждали методом аналитического гель-электрофореза в денатурирующих условиях с последующим подтверждением структуры с помощью LC-ESI- и MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

По разработанным протоколам были получены: нативные и модифицированные малые интерферирующие РНК {2,4-6,8,10,12,13,16,19,20,25-28}<sup>5</sup>; иммуностимулирующие РНК {3,21,24}; антисмысловые олигонуклеотиды {17}; аналоги двухцепочечных РНК {14}; антирепликативные РНК и их структурные аналоги {9,23}; синтетические аналоги мРНК {7,15,18,22}. По разработанным протоколам в лаборатории химии РНК (ИХБФМ СО РАН) были синтезированы: нативные и 2'-модифицированные направляющие (sg, cr и tracr) РНК системы CRISPR/Cas9 {11}, [439–443]; модифицированные малые интерферирующие РНК для фоторегулируемой РНК-интерференции [444, 445]; смешанные 2'-F/2'-дезоксид/2'-ОН/аптамеры, обладающие способностью узнавать аутоантитела, характерные для рассеянного склероза, специфичные к гемоглобину, или способные выступать как агенты для борнейтронзахватной терапии [446–454]<sup>6</sup>.

---

<sup>4</sup> расчет см. «Экспериментальная часть».

<sup>5</sup> здесь и далее в фигурных скобках курсивом указаны ссылки на работы, в которых изложены основные результаты данной диссертации, приведенные в заключительном разделе.

<sup>6</sup> Подробнее о применении полученных олигонуклеотидов, а также их производных и конъюгатов, описанных в п.п. 2.1-2.5, представлено в разделе 2.6 «Научно-фундаментальное использование НК и/или их производных и конъюгатов, полученных по разработанным протоколам и подходам, другими научными группами».

## **2.2. Разработка подхода к твердофазному синтезу 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с адресующими функциональными молекулами, основанного на сочетании методов Н-фосфонатной и фосфитамидной химии**

Как уже отмечалось выше, в настоящее время одним из перспективных подходов к созданию терапевтических препаратов, направленных на подавление экспрессии определенных генов, является подход, основанный на использовании siРНК - медиаторов процесса РНК-интерференции - природного механизма, в ходе которого происходит специфическая деградация мРНК гена-мишени [19, 455–457]. На основе синтетических олигонуклеотидов можно получить широкий спектр биологически активных веществ, действующих на различные генетические структуры и запускающих процессы, приводящие к временному или постоянному "выключению" генов либо изменению генетических программ. С помощью подобных соединений можно подавить функционирование определенных матричных РНК живой клетки, воздействуя на синтез белков, а также защитить клетки от вирусной инфекции. Поэтому при разработке подхода в качестве представителя функциональных НК была выбрана малая интерферирующая РНК, направленная к участку 557-577 мРНК гена множественной лекарственной устойчивости MDR1 (ген множественной лекарственной устойчивости), обладающая повышенной устойчивостью к действию нуклеаз сыворотки за счет введения 2'-*O*-метильных аналогов рибонуклеотидов в нуклеазочувствительные сайты. Этот ген кодирует мембранный белок Р-гликопротеин, отвечающий за перенос многих веществ, таких как липиды, стероиды, пептиды, билирубин и др., через мембрану клетки, тем самым регулируя чувствительность организма к лекарственным препаратам. Низкая эффективность проникновения siРНК в клетки-мишени является одним из основных препятствий при их использовании. Одним из перспективных подходов к решению этой проблемы, наряду с использованием трансфектантов, проникающих в клетки пептидов, наночастиц различной природы, является конъюгирование siРНК с липофильными соединениями [25, 458]. Введение остатков таких соединений увеличивает эффективность проникновения siРНК в клетки за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза или за счет взаимодействия с гидрофобной частью клеточной мембраны.

Получение 5'-липофильных конъюгатов siРНК можно осуществить твердофазным фосфитамидным методом, вводя липофильный остаток в виде фосфитамида на последней стадии синтетического цикла сборки олигонуклеотида. Однако возможен и другой вариант получения 5'-липофильных производных, основанный на сочетании методов Н-

фосфонатной и фосфитамидной химии. Суть предложенного подхода состоит в использовании носитель-связанного защищенного олигонуклеотида, синтезированного фосфитамидным методом, и липофильного остатка в виде Н-фосфоната {25,28}. Преимуществом данного подхода является то, что Н-фосфонаты, в отличие от фосфитамидных мономерных синтонов, являются стабильными, негигроскопичными, устойчивыми к окислению кислородом воздуха соединениями, легко синтезируемыми в препаративных количествах и обладающими высокой реакционной способностью в реакциях конденсации.

Поскольку выбранный подход к синтезу 5'-липофильных конъюгатов siРНК основан на введении на последней стадии твердофазного синтеза олигонуклеотидов Н-фосфонатного синтона, первой задачей стала разработка методов синтеза Н-фосфонатов ряда липофильных соединений. В качестве таковых были выбраны стероиды (холестерин и его аминокислотные производные (рис. 2.2.1.А), литохолевая кислота и ее производные (рис. 2.2.1.Б, 2.2.1.В), олеиловый спирт и жирорастворимый витамин  $\alpha$ -токоферол и его производные (рис. 2.2.1.Г). Для последующего изучения влияния длины линкера между липофильным остатком и олигонуклеотидной цепью на эффективность проникновения в клетки и биологическую активность siРНК была поставлена цель в каждом случае (кроме олеилового спирта) создать "линейку" Н-фосфонатов, содержащих линкеры различной длины ("нулевой" линкер и линкеры на основе алифатических аминоспиртов).

Взаимодействие аминоспиртов различной длины с хлорформиатом холестерина приводило к линейке его производных (рис. 2.2.1.А, стадия *i*). Активация карбоксильной группы литохолевой кислоты пентафторфенолом (рис. 2.2.1.Б и 2.2.1.В, стадия *iii*) позволила провести дальнейшее введение алифатических аминоспиртов (рис. 2.2.1.Б, стадия *i*) или олеиламина (рис. 2.2.1.В, стадия *iv*). 3 $\alpha$ -Гидроксильную группу олеиламида литохолевой кислоты и гидроксильную группу  $\alpha$ -токоферола активировали *N,N'*-дисулфонимидилкарбонатом (DSC) по аналогии с [171] (рис. 2.2.1.В и 2.2.1.Г, стадия *v*) и вводили в реакцию с 3-аминопропан-1-олом или 6-аминогексан-1-олом с получением соответствующих производных (рис. 2.2.1.В и 2.2.1.Г, стадия *i*).

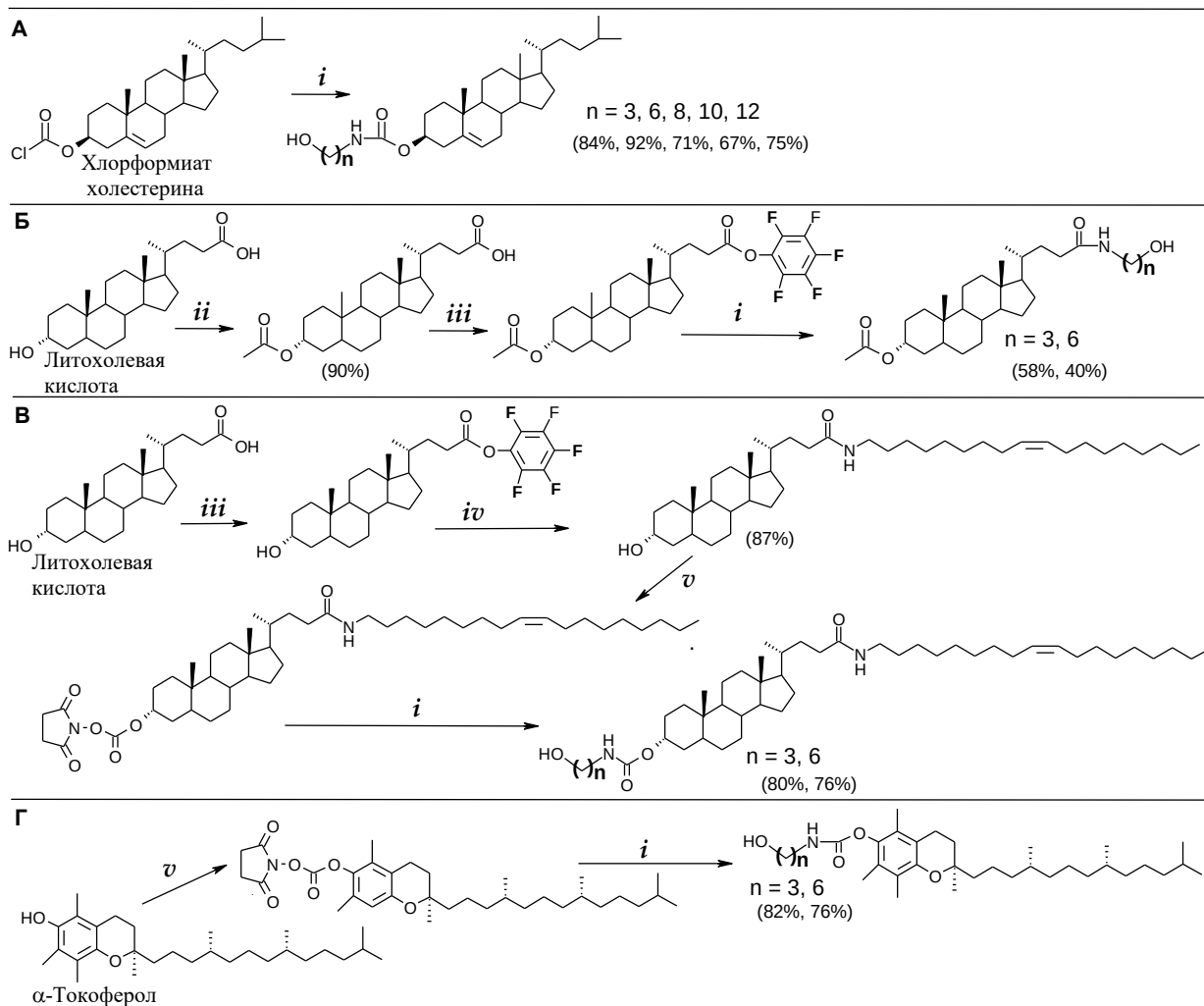


**Рисунок 2.2.1.** Общая схема синтеза аминопроизводных холестерина, литохоловой кислоты, олеиламида литохоловой кислоты и  $\alpha$ -токоферола. Реагенты: *i*) 3-аминопропан-1-ол/6-аминогексан-1-ол/8-аминооктан-1-ол/10-аминодекан-1-ол/12-аминододекан-1-ол,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , далее комнатная температура (к.т.); *ii*) ацетил хлорид, 4-диметиламинопиридин, пиридин,  $0^\circ\text{C}$ , далее к.т.; *iii*)  $N,N'$ -дициклогексилкарбодиимид, пентафторфенол,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , далее к.т.; *iv*) олеиламин,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , далее к.т.; *v*) DSC,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ , к.т. Пентафторфенольные производные литохоловой кислоты и ее 3 $\alpha$ -ацетильного аналога, а также сукцинимидные производные олеиламида литохоловой кислоты и  $\alpha$ -токоферола использовали в дальнейших превращениях без хроматографической очистки. Выходы соединений на каждой стадии представлены в скобках.

Для синтеза Н-фосфонатов холестерина, олеиламида литохоловой кислоты,  $\alpha$ -токоферола, олеилового спирта, а также аминопроизводных холестерина, литохоловой, олеиламида литохоловой кислоты и  $\alpha$ -токоферола обрабатывали полученным *in situ* триимидазолидом фосфора, с последующим разложением водой до триэтиламмонийных солей соответствующих производных фосфористой кислоты (рис. 2.2.2). Полученные Н-фосфонаты (2.2.2.I-2.2.2.XV) выделяли хроматографией на силикагеле в виде триэтиламмонийных солей. Строение целевых и промежуточных соединений было

доказано методами  $^1\text{H}$ -ЯМР и  $^{31}\text{P}$ -ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией.

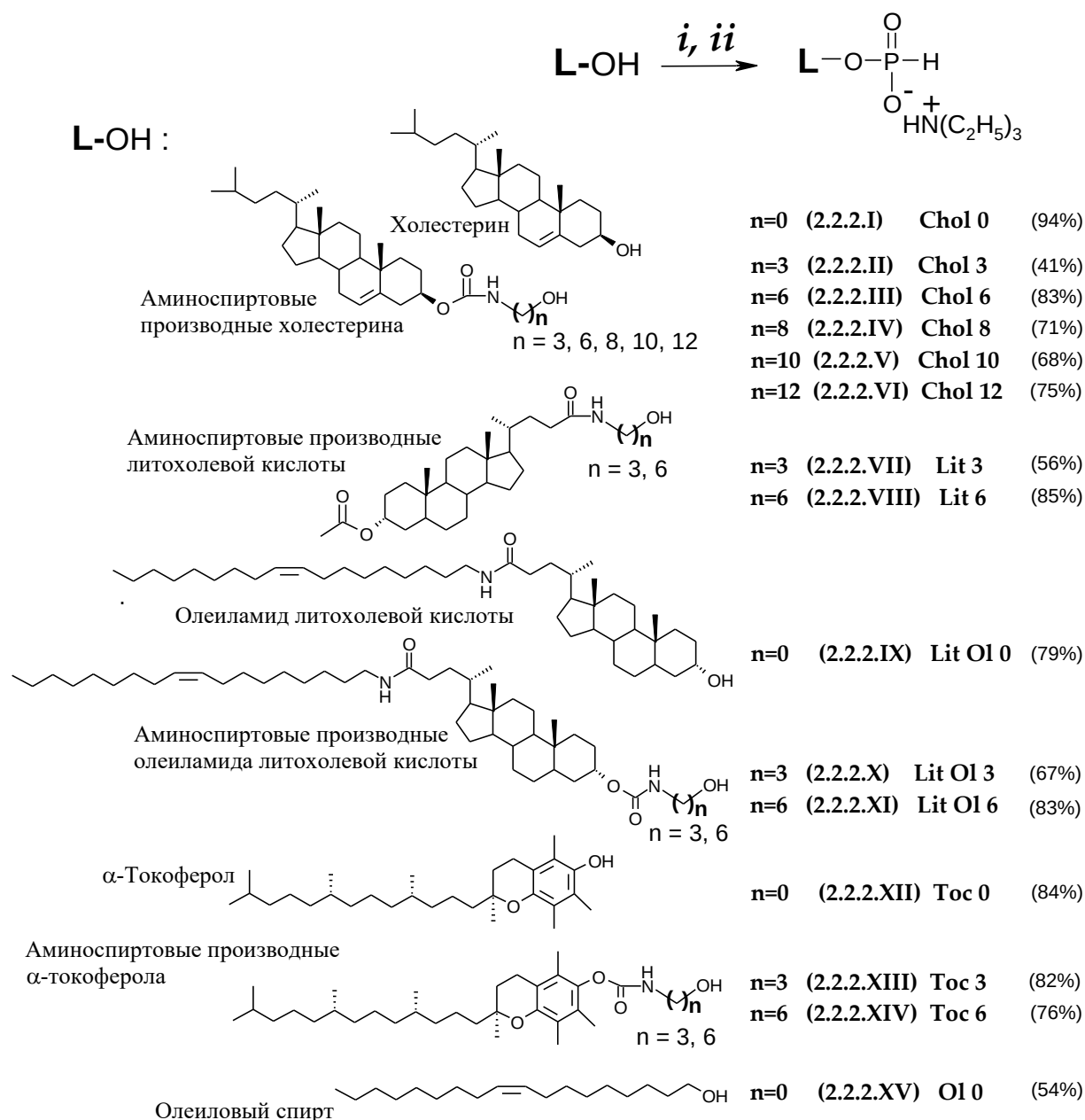


**Рисунок 2.2.2.** Общая схема синтеза липофильных Н-фосфонатов (2.2.2.I) - (2.2.2.XV). Реагенты: *i*)  $\text{PCl}_3$ , имидазол,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ ,  $0^\circ\text{C}$ ; *ii*)  $\text{H}_2\text{O}$ , комнатная температура. Выходы соединений представлены в скобках.

Ранее Веняминовой с соавт. [459] на примере твердофазного 5'-фосфорилирования олигонуклеотидов с помощью  $\beta$ -цианэтил-Н-фосфоната было показано, что в реакциях с моноалкилфосфитом в присутствии пивалоилхлорида можно использовать носитель-связанные защищенные олигонуклеотиды с 5'-гидроксилом, содержащие как Н-фосфонатные межнуклеозидные связи, так и фосфотриэфирные. Также из литературы известно, что введение модификаций на 5'-конец смысловой цепи siРНК не влияет на ее

биологическую активность [460]. Эти данные и послужили основой для разработанного подхода к 5'-конъюгированию.

Для синтеза липофильных конъюгатов смысловой цепи siРНК проводили конденсацию 5'-гидроксильной группы носитель-связанного защищенного олигонуклеотида, синтезированного фосфитамидным методом, с Н-фосфонатом липофильного соединения ((2.2.2.I) - (2.2.2.XV)) в присутствии конденсирующего реагента с последующим окислением образующейся Н-фосфонатной связи до фосфодиэфирной (рис. 2.2.3).

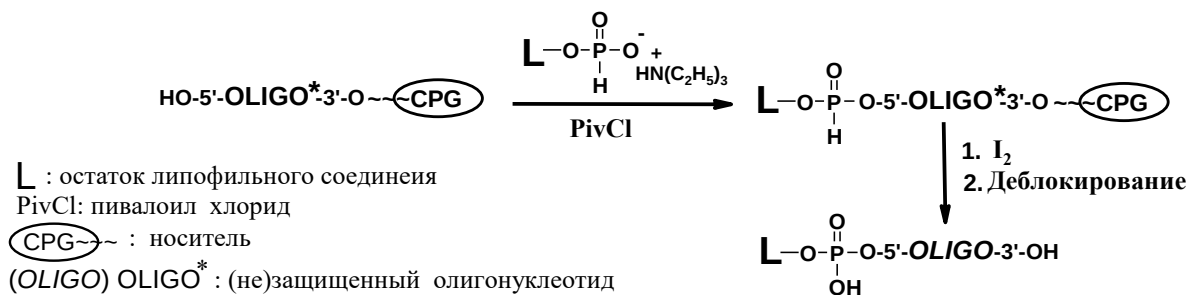


**Рисунок 2.2.3.** Общая схема синтеза 5'-липофильных конъюгатов олигонуклеотидов, основанная на сочетании методов Н-фосфонатной и фосфитамидной химии. Структуры Н-фосфонатов, использованных для синтеза конъюгатов, представлены на рисунке 2.2.2.

Модельные эксперименты проводили на гептадезокситимидилате по аналогии с [461]. С целью поиска универсального оптимального состава смеси растворителей для данной реакции были использованы ацетонитрил, пиридин, дихлорметан в различных сочетаниях. Также варьировали количество конденсаций на одну стадию присоединения Н-фосфоната. Показано, что оптимальным является смесь пиридин:ацетонитрил:дихлорметан (2:1:1), причем Н-фосфонат липофильного соединения необходимо предварительно растворять в дихлорметане и добавлять к носитель-связанному олигонуклеотиду в смеси пиридин:ацетонитрил (2:1). В случае серии Н-фосфонатов  $\alpha$ -токоферола также возможно использование смеси пиридин:ацетонитрил (1:1) для их растворения и добавления к олигонуклеотиду. Соотношение Н-фосфонат липофильного соединения / конденсирующий реагент пивалоилхлорид должно составлять 1:5. Необходимо использование минимум 7 эквивалентов Н-фосфоната липофильного соединения по отношению к носитель-связанному олигонуклеотиду и трехкратное повторении конденсации. Для окисления Н-фосфонатной связи до фосфодиэфирной был использован 0.1 М раствор иода в смеси пиридин:вода (98:2) в течении 20 мин. Использование условий, представленных выше, обеспечивает количественное конъюгирование. Отщепление полученных 5'-липофильных конъюгатов олигонуклеотидов от твердого носителя с одновременным деблокированием гетероциклических оснований и межнуклеозидных фосфатов проводили в стандартных

условиях действием смеси АМА течении 2 ч при комнатной температуре, в этих же условиях происходило деблокирование 3 $\alpha$ -гидроксильной группы литохолевой кислоты в случае конъюгатов, полученных с использованием Н-фосфонатов (2.2.2.VII) и (2.2.2.VIII) (рис. 2.2.2). Удаление 2'-O-TBDMS защитных групп проводили действием смеси N-метил-2-пирролидинон/(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N/(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N·3HF (1.5/0.7/1.0) при 65°C в течение 1.5 ч. В использованных условиях деблокирования липофильные остатки не подвергались деструкции. Характеризацию полученных новых 5'-липофильных конъюгатов смысловой цепи siРНК проводили методом LC-ESI- и MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Выходы целевых конъюгатов после препаративного выделения методом гель-электрофореза составили 87-93 % на каждую стадию (общий выход 9-23% в расчете на первое нуклеозидное звено).

**Таблица 2.2.1.** 5'-Липофильные конъюгаты смысловой цепи siРНК

| N  | Шифр         | Конъюгат, 5'-3'                                                                                                 | Молекуляр.<br>масса |                    |
|----|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------|
|    |              |                                                                                                                 | Теор. <sup>1</sup>  | Эксп. <sup>1</sup> |
| 1  | Lit 3-(S)    | <i>Lit 3-p-GGCUU<sup>m</sup>GAC<sup>m</sup>AAGUU<sup>m</sup>GU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>GG</i>    | 7333.8              | 7333.8             |
| 2  | Lit 6-(S)    | <i>Lit 6-p-GGCUU<sup>m</sup>GAC<sup>m</sup>AAGUU<sup>m</sup>GU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>GG</i>    | 7375.8              | 7376.2             |
| 3  | Lit Ol -(S)  | <i>Lit Ol 0-p-GGCUU<sup>m</sup>GAC<sup>m</sup>AAGUU<sup>m</sup>GU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>GG</i> | 7525.7              | 7525.9             |
| 4  | Lit Ol -(S)  | <i>Lit Ol 3-p-GGCUU<sup>m</sup>GAC<sup>m</sup>AAGUU<sup>m</sup>GU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>GG</i> | 7626.7              | 7628.7             |
| 5  | Lit Ol 6-(S) | <i>Lit Ol 6-p-GGCUU<sup>m</sup>GAC<sup>m</sup>AAGUU<sup>m</sup>GU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>GG</i> | 7668.7              | 7668.8             |
| 6  | Toc 0-(S)    | <i>Toc 0-p-GGCUU<sup>m</sup>GAC<sup>m</sup>AAGUU<sup>m</sup>GU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>GG</i>    | 7331.9              | 7330.9             |
| 7  | Toc 3-(S)    | <i>Toc 3-p-GGCUU<sup>m</sup>GAC<sup>m</sup>AAGUU<sup>m</sup>GU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>GG</i>    | 7433.3              | 7431.9             |
| 8  | Toc 6-(S)    | <i>Toc 6-p-GGCUU<sup>m</sup>GAC<sup>m</sup>AAGUU<sup>m</sup>GU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>GG</i>    | 7474.8              | 7473.9             |
| 9  | Oleyl 0-(S)  | <i>Oleyl 0-p-GGCUU<sup>m</sup>GAC<sup>m</sup>AAGUU<sup>m</sup>GU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>GG</i>  | 7168.2              | 7168.3             |
| 10 | Chol 0-(S)   | <i>Chol 0-p-GGCUU<sup>m</sup>GAC<sup>m</sup>AAGUU<sup>m</sup>GU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>GG</i>   | 7286.7              | 7287.3             |
| 11 | Chol 3-(S)   | <i>Chol 3-p-GGCUU<sup>m</sup>GAC<sup>m</sup>AAGUU<sup>m</sup>GU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>GG</i>   | 7387.7              | 7387.5             |
| 12 | Chol 6-(S)   | <i>Chol 6-p-GGCUU<sup>m</sup>GAC<sup>m</sup>AAGUU<sup>m</sup>GU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>GG</i>   | 7429.7              | 7429.7             |
| 13 | Chol 8-(S)   | <i>Chol 8-p-GGCUU<sup>m</sup>GAC<sup>m</sup>AAGUU<sup>m</sup>GU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>GG</i>   | 7456.5              | 7456.8             |
| 14 | Chol 10-(S)  | <i>Chol 10-p-GGCUU<sup>m</sup>GAC<sup>m</sup>AAGUU<sup>m</sup>GU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>GG</i>  | 7485.3              | 7484.8             |
| 15 | Chol 12-(S)  | <i>Chol 12-p-GGCUU<sup>m</sup>GAC<sup>m</sup>AAGUU<sup>m</sup>GU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>GG</i>  | 7513.2              | 7512.8             |

<sup>1</sup> По данным LC-ESI- и MALDI-TOF-масс-спектрометрии. *Chol*- остаток холестерина; *Oleyl*- остаток олеилового спирта; *Toc*- остаток  $\alpha$ -токоферола; *Lit*- остаток литохолевой кислоты; *Lit Ol*- остаток олеиламида литохолевой кислоты; -p-, -P(O)(OH)-; N – рибонуклеотид; N<sup>m</sup> – 2'-O-метилрибонуклеотид; (S) – сенс-цепь siРНК. Структуры лигандов приведены на рисунке 2.2.2.

Термическая стабильность siРНК является важной характеристикой при их применении. Поэтому следующим этапом работы было изучение влияния введенных липофильных группировок (на примере линеек конъюгатов с линкерами n=0, 3 и 6) на формирование дуплексов siРНК и их термическую стабильность. Формирование дуплексов siРНК (рис. 2.2.4) проводили в буфере (30 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 100 mM ацетат калия, 2 mM ацетат магния) путем нагревания и медленного охлаждения реакционной смеси, содержащей эквимольные количества смысловой и антисмысловой цепей. Методом нативного гель-электрофореза было показано, что дуплексы в используемых условиях

формируются количественно (рис. 2.2.5). При изучении влияния остатков ряда липофильных соединений в составе siРНК методом термической денатурации на стабильность дуплексов были получены кривые плавления дуплексов {28}. Температуры плавления исходной siРНК и ее 5'-липофильных конъюгатов соответствовали максимумам графиков первой производной интегральных кривых плавления термической денатурации. Согласно полученным результатам (табл. 2.2.2), введение остатков липофильных соединений посредством фосфодиэфирной связи в 5'-положение смысловой цепи siРНК незначительно меняет температуры плавления дуплекса (в пределах  $\pm 1^\circ\text{C}$ ) и, соответственно, не приводит к дестабилизации данной siРНК.



**Рисунок 2.2.4.** Структуры нативного (А) и модифицированного (Б) дуплекса siРНК. (S) – сенс-цепь, (AS) – антисенс-цепь, L – остаток липофильного соединения (структуры Н-фосфонатов, использованных для синтеза конъюгатов, представлены на рисунке 2.2.2), р – фосфодиэфирная связь, N – рибонуклеозид, N – 2'-O-метилрибонуклеозид.

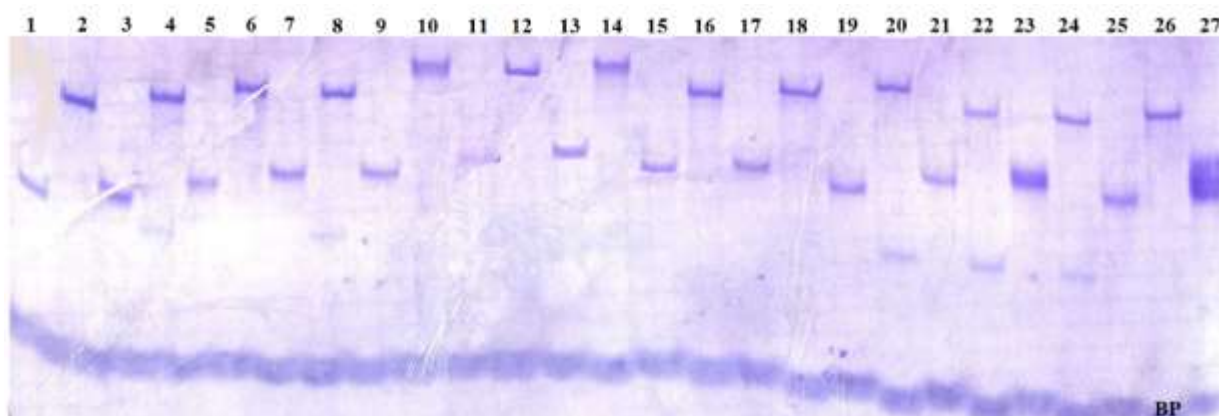


**Рисунок 2.2.5.** Анализ дуплексов siРНК с помощью гель-электрофореза в 15 %-ном ПААГ в нативных условиях ((акриламид/*N,N'*-метиленбисакриламид 19:1, ТБЕ): дорожка 1 – (AS), дорожка 2 – (S)/(AS), дорожка 3 – (S), дорожка 4 – Ol 0-(S)/(AS), дорожка 5 – Ol 0-(S), дорожка 6 – Lit 3-(S)/(AS), дорожка 7 – Lit 3-(S), дорожка 8 – Lit 6-(S)/(AS), дорожка 9 – Lit 6-(S), дорожка 10 – Lit Ol 0-(S)/(AS), дорожка 11 – Lit Ol 0-(S), дорожка 12 – Lit Ol 3-(S)/(AS), дорожка 13 – Lit Ol 3-(S), дорожка 14 – Lit Ol 6-(S)/(AS), дорожка 15 – Lit Ol 6-(S), дорожка 16 – Chol 0-(S)/(AS), дорожка 17 – Chol 0-(S), дорожка 18 – Chol 3-(S)/(AS), дорожка 19 – Chol 3-(S), дорожка 20 – Chol 6-(S)/(AS), дорожка 21 – Chol 6-(S), дорожка 22 – Tos 0-(S)/(AS), дорожка 23 – Tos 0-(S), дорожка 24 – Tos 3-(S)/(AS), дорожка 25 – Tos 3-(S), дорожка 26 – Tos 6-(S)/(AS), дорожка 27 – Tos 6-(S). Фотография геля после окрашивания Stains-All, BP – краситель бромфеноловый синий, (S) – сенс-цепь, (AS) – антисенс-цепь. Структуры Н-фосфонатов, использованных для синтеза конъюгатов, представлены на рисунке 2.2.2.

**Таблица 2.2.2.** Температуры плавления исходной siРНК и ее 5'-липофильных конъюгатов

| siРНК               | T <sub>пл.</sub> , °C * | ΔT <sub>пл.</sub> , °C |
|---------------------|-------------------------|------------------------|
| (S)/(AS)            | 78.9                    | -                      |
| Chol 0-(S) / (AS)   | 78.8                    | -0.1                   |
| Chol 3-(S) / (AS)   | 80.0                    | +1.1                   |
| Chol 6-(S) / (AS)   | 79.0                    | +0.1                   |
| Lit 3-(S) / (AS)    | 79.0                    | +0.1                   |
| Lit 6-(S) / (AS)    | 79.0                    | +0.1                   |
| Lit Ol 0-(S) / (AS) | 78.0                    | -0.9                   |
| Lit Ol 3-(S) / (AS) | 78.9                    | 0                      |
| Lit Ol 6-(S) / (AS) | 78.0                    | -0.9                   |
| Toc 0-(S) / (AS)    | 78.0                    | -0.9                   |
| Toc 3-(S) / (AS)    | 79.9                    | +1.0                   |
| Toc 6-(S) / (AS)    | 78.6                    | -0.3                   |
| Ol 0-(S) / (AS)     | 78.5                    | -0.4                   |

\* 30 мМ НЕРЕС-КОН (рН 7.4), 100 мМ ацетат калия, 2 мМ ацетат магния, концентрация сенс и антисенс цепи 1·10<sup>-6</sup>М; Cary 300 Bio, "Varian", Австралия; измерения проведены Ломзовым А.А (ИХБФМ СО РАН).

В совместных работах при проведение биологических экспериментов было показано, что такие липофильные конъюгаты siРНК способны проникать в клетки в отсутствие трансфектантов. Наиболее эффективной оказалась siРНК состава Chol6-(S)/(AS) {25}. По предложенному подходу, для исследования их биологических свойств, были получены 5'-липофильные конъюгаты ряда иммуностимулирующих и малых интерферирующих РНК, их димерных и тримерных форм, а также конкатемерные конструкции на основе антисенс олигонуклеотидов {10,12,13,17,19,21}.

### **2.3. Разработка твердофазного варианта синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с адресующими функциональными молекулами, введенными посредством кислотолабильной гидразоновой связи**

Как уже отмечалось, при синтезе конъюгатов олигонуклеотидов с различными биоактивными молекулами можно варьировать линкеры, соединяющие их, и как длина, так и природа этих линкеров в определенной степени определяют биологические эффекты конъюгатов. Способность химических связей, соединяющих две молекулярные единицы, разрушаться внутри клетки с высвобождением олигонуклеотида и биоактивной молекулы из конъюгата позволяет разрабатывать перспективные лекарственные препараты и диагностические инструменты. Был предложен ряд лабильных линкеров, адаптированных для условий расщепления различными ферментами, электрофильными/кислотными реагентами, восстановителями или окислителями, фотооблучением и пр. [462–468]. Химическое конъюгирование терапевтической НК посредством чувствительных к кислоте связей предотвращает разрушение олигонуклеотидных конъюгатов в кровотоке (pH 7.4) и тем самым защищает нормальные здоровые клетки от неблагоприятного воздействия терапевтических препаратов. После попадания в клетку-мишень кислотолабильная связь разрушается в компартментах (эндо)лизосомального пути (pH 5.0–6.0) [469], освобождая терапевтическую НК для ее специфического действия.

В качестве биodeградируемых кислотолабильных линкеров используются ацетали, кетали, бета-тиопропионаты, оксимы, ортоэфиры, гидразоны и др. [465, 470–474]. Кислотолабильные гидразоны вызывают особый интерес в этом плане, поскольку, варьируя их окружение, можно добиваться максимальной степени их гидролиза при определенных значениях pH.

Гидразоны ( $RX-C=N-N-YR'$ ) образуются в результате взаимодействия по механизму присоединения-отщепления карбонильной группы ( $RX-C=O$ ) с производными гидразина ( $NH_2-NYR'$ ), что позволяет разрабатывать эффективные способы синтеза конъюгатов олигонуклеотидов. Следует учитывать, что соединения, содержащие первичную аминогруппу, вступают с гидразонами в реакцию переаминирования [475]. Гидразоны гидролизуются при кислых значениях pH, однако, следует отметить, что электронные эффекты окружения ( $R, R', X, Y$ ) гидразонового фрагмента ( $-C=N-N-$ ) оказывают сильное влияние на скорость и степень гидролиза азометиновой связи ( $-C=N-$ ). Реакция взаимодействия производных гидразинов с карбонильными соединениями достаточно проста и при этом эффективна - продукт образуется при непосредственном смешивании

растворов реагентов в мягких условиях. Также может быть использован целый ряд растворителей, таких как вода, бензол, простые эфиры, диметилформамид, диметилсульфоксид, спирты, часто в систему добавляют каталитические количества кислот. Все это позволяет выбрать систему, не агрессивную по отношению к олигонуклеотиду при проведении реакции конъюгирования.

Как правило, pH-чувствительные конъюгаты олигонуклеотидов, содержащие гидразоновую связь, синтезируют путем взаимодействия между полностью незащищенными альдегидсодержащими олигонуклеотидами и гидразидами малых молекул, антител, пептидов, белков и других [320, 476]. С этой целью олигонуклеотиды с альдегидной группой в различных положениях цепи (5'- или 3'-конец, гетероциклическое основание, а также 1'- или 2'-положение рибозы) получают несколькими способами: (1) с помощью 1,2-диолов с последующим окислением периодатом [322, 325, 330, 477]; (2) путем синтеза олигонуклеотидов с альдегидной группой, защищенной замещенными 1,3-пропандиолами, которые удаляются при обработке слабой кислотой [478–480]; (3) с использованием олигонуклеотидов с замаскированным AP-сайтом [481, 482]; (4) с помощью специальных альдегида-сукцинимидных модификаторов [483–485]. Гораздо реже используется обратный порядок взаимодействия: ФМ, несущие альдегидную функцию, взаимодействуют с незащищенными гидразидсодержащими олигонуклеотидами [319, 337].

Выбор структур альдегидной и гидразидной компонент был обоснован работами Kratz с соавт. [315, 486–488], где была изучена гидролитическая стабильность гидразонов на серии модельных веществ. Согласно этим данным, введение алифатического заместителя/линкера в гидразидную компоненту увеличивает стабильность гидразона и затрудняет гидролиз, а в карбонильную компоненту - наоборот. Было показано, что природа карбонильной компоненты влияет на стабильность гидразона - гидразоны, полученные присоединением альдегидов, стабильнее, чем аналогичные гидразоны, полученные при использовании кетонов. Таким образом, использование ароматического альдегида в качестве карбонильной компоненты и неароматического гидразида в качестве гидразиновой для синтеза гидразона является оптимальным и обеспечивает высокую скорость гидролиза при относительной стабильности самого соединения.

Гидразонсодержащие конъюгаты олигонуклеотидов можно синтезировать с использованием двух основных подходов, предполагающих автоматический фосфитамидный синтез соответствующих олигонуклеотидов, их 5'-альдегидную

модификацию и дальнейшее взаимодействие с гидразидными производными функциональных молекул (рис. 2.3.1).

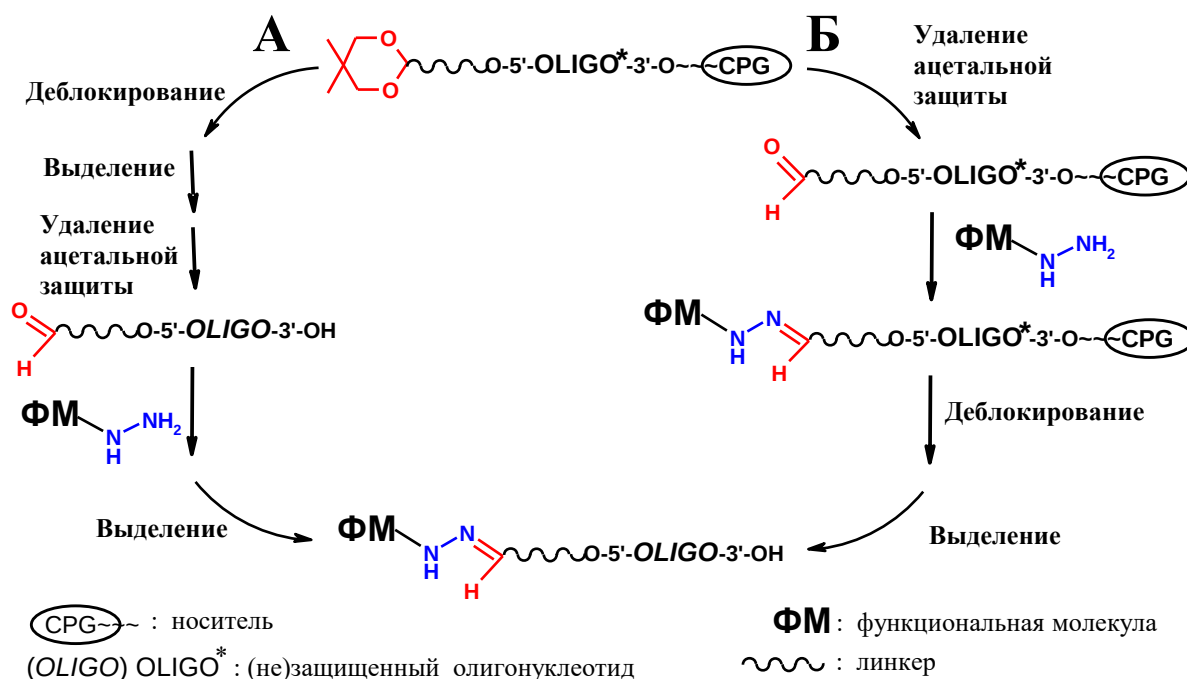


**Рисунок 2.3.1.** Два подхода к синтезу конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих кислотолабильный гидразоновый фрагмент.

Первый способ (рис. 2.3.1, путь А), вариант синтеза "в растворе", был предложен и реализован ранее в лаборатории химии РНК [364] на примере 5'-холестериновых конъюгатов олигонуклеотидов. Он предполагает удаление с носителя и деблокирование 5'-ацетальдегидмодифицированного олигонуклеотида, снятие ацетальной защиты и последующее проведение гомофазной реакции присоединения-отщепления с гидразидным производным вводимой ФМ. Однако значительная гидрофильность олигонуклеотида и, напротив, гидрофобность (особенно в случае липофильных соединений) ФМ требуют тщательного подбора концентраций вводимых в реакцию компонент и системы растворителей для полного их растворения. Также потребуется провести двойную очистку для получения целевого конъюгата.

Разработанный твердофазный вариант синтеза (рис. 2.3.1, путь Б) подразумевает присоединение гидразидного производного ФМ к носитель-связанному 5'-альдегидмодифицированному защищенному олигонуклеотиду и последующее удаление полученного конъюгата с носителя с дальнейшим его деблокированием [8,9]. Данный способ позволяет варьировать в широких пределах соотношение водно-органической фазы, а также легко отделяться от непрореагировавших компонент реакции на всех стадиях, поскольку в процессе синтеза конъюгат все время присоединен к носителю.

В работе в качестве ФМ были выбраны холестерин и  $\alpha$ -токоферол, гидразиды которых были получены на первом этапе по схеме, представленной на рисунке 2.3.2. Синтез гидразида *N*-(холестерилкарбонил)-6-аминогексановой кислоты был разработан Довыденко И.С. (ЛХРНК ИХБФМ СО РАН) и описан в [364]. Синтез гидразида 6-[2,5,7,6-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-илоксикарбонил]-аминогексановой кислоты вели по аналогии с [364] с некоторыми модификациями. В качестве исходных соединений были взяты коммерчески доступный хлорформат холестерина (рис. 2.3.2) и активированное производное  $\alpha$ -токоферола (**2.3.I**), полученное с использованием *N,N'*-дисуццинимидилкарбоната (DSC) (рис. 2.3.2, стадия *i*). Их взаимодействие с 6-аминогексановой кислотой (**2.3.II**) через *N,O*-бис-триметилсилильный интермедиат (**2.3.IIa**) [489] приводило к получению производных триметилсилильного эфира 6-аминогексановой кислоты холестерина и  $\alpha$ -токоферола, которые легко трансформировались в кислых условиях в (**2.3.III**) и (**2.3.IV**) (рис. 2.3.2, стадии *ii,iii*).

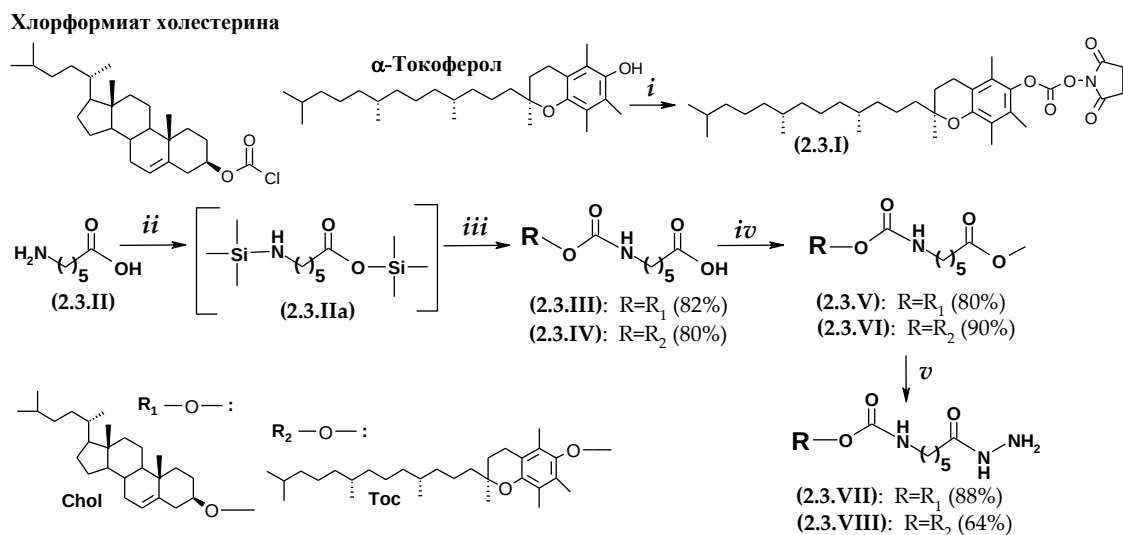


**Рисунок 2.3.2.** Общая схема синтеза гидразидов холестерина (**2.3.VII**) и  $\alpha$ -токоферола (**2.3.VIII**). Реагенты: *i*) DSC, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN, (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N, комнатная температура (к.т.); *ii*) (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SiCl, пиридин, 4°C; *iii*) CholOC(O)Cl или (**2.3.I**), пиридин, к.т.; 0.7 М HCl; *iv*) PCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, аргон, к.т.; CH<sub>3</sub>OH абс, к.т.; *v*) NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>OH, к.т. Выходы соединений на каждой стадии представлены в скобках.

Карбоксильные группы соединений (**2.3.III**) и (**2.3.IV**) переводили в метиловые эфиры действием трихлорида фосфора и метанола (рис. 2.3.2, стадия *iv*), с последующим взаимодействием соединений (**2.3.V**) и (**2.3.VI**) с гидразин моногидратом с получением целевых гидразидов холестерина (**2.3.VII**) и  $\alpha$ -токоферола (**2.3.VIII**) (рис. 2.3.2, стадия *v*). Все реакции проходили с хорошими выходами, продукты выделяли хроматографией на силикагеле. Структуры полученных соединений подтверждали методами <sup>1</sup>H-ЯМР и <sup>13</sup>C-ЯМР спектроскопии и ESI-MS-спектрометрии.

При разработке описываемого подхода (рис. 2.3.1, путь Б) в качестве представителей функциональных НК были выбраны модельный гептадезоксирибонуклеотид, малая интерферирующая РНК, направленная к мРНК гена MDR1, митохондриальные антирепликативные РНК, а также гидовые и сгРНК для редактирования митохондриальной ДНК (см. далее табл. 2.3.1).

Предложенный подход к получению 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих кислотолабильную гидразоновую связь включает в себя несколько стадий (рис. 2.3.3): введение замаскированной альдегидной функции в олигонуклеотидную цепь с использованием на последнем цикле автоматического синтеза фосфитамида, содержащего остаток 4-(2-гидроксиэтокси)бензальдегида, защищенного 2,2-диметилпропан-1,3-диолом (стадия *i*); селективное удаление ацетальной защиты в мягких условиях с получением защищенного носитель-связанного олигонуклеотида, содержащего на 5'-конце олигонуклеотидной цепи альдегидную группу (стадия *ii*; выбор условий обоснован далее); взаимодействие этой группы в водно-органической среде в слабокислых условиях с соответствующим гидразидом (стадия *iii*); полное деблокирование полученного конъюгата (стадии *iv*, *v*; выбор условий обоснован далее).

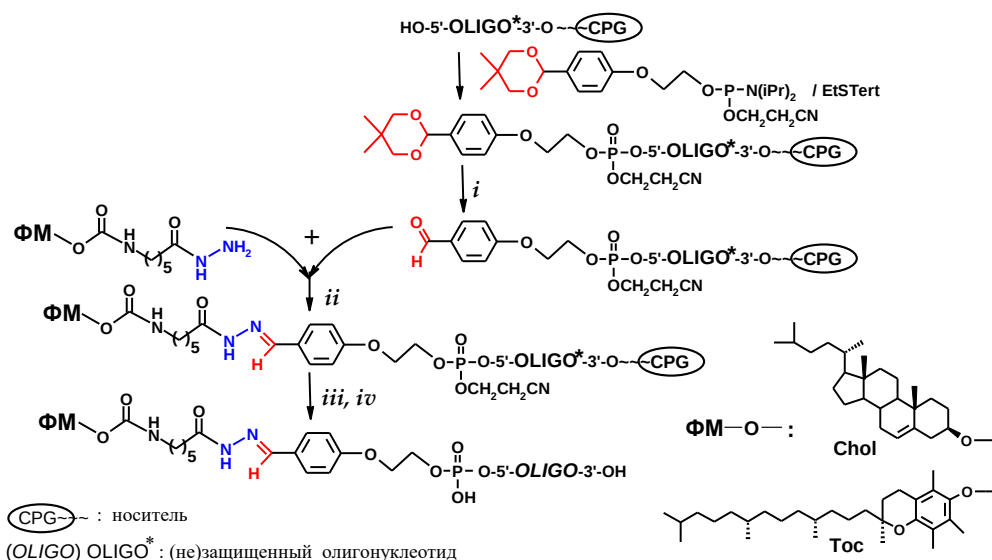


**Рисунок 2.3.3.** Схема синтеза 5'-липофильных конъюгатов олигонуклеотидов. Реагенты: *i*) цикл автоматического синтеза с использованием фосфитамида, содержащего остаток 4-(2-гидроксиэтокси)бензальдегида, защищенного 2,2-диметилпропан-1,3-диолом; *ii*) 80 %-ная уксусная кислота, комнатная температура (к.т.); *iii*) 0.1 М ацетат натрия (pH 5.2)/диоксан (1/1, v/v), к.т.; *iv*) 0.05M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в метаноле, к.т.; *v*) *N*-метил-2-пирролидинон/(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N/(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N·3HF (1.5/0.7/1.0, v/v/v), 65°C.

В работах Орецкой с соавт. (напр., [325, 327, 330, 490]), посвященных синтезу и использованию альдегидных производных олигонуклеотидов для создания конъюгатов различной структуры и устойчивости, авторы отмечают нестабильность гидразоновой

связи в щелочных условиях, в том числе при обработке аммиаком. Поэтому на первом этапе была проверена устойчивость гидразоновой связи в условиях, используемых для деблокирования олигонуклеотидов, с тем, чтобы оценить принципиальную возможность разработки данного подхода для олигонуклеотидов различных типов.

5'-Холестериновый конъюгат гептадезоксинуклеотида с гидразоновой связью (5'-Chol-L-dT<sub>7</sub>) был синтезирован методом "в растворе" [364] и выдержан с рядом реагентов для отщепления олигонуклеотидов от носителя и удаления щелочелабильных и 2'-*O*-трет-бутилдиметилсилильных защитных групп (рис. 2.3.4). Было показано, что гидразоновая связь в 5'-Chol-L-dT<sub>7</sub> стабильна при обработке (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N·3HF, а также в присутствии 0.05 М К<sub>2</sub>СО<sub>3</sub> в метаноле (условия d и e, рис. 2.3.4). Во всех остальных основных условиях наблюдалась деградация синтезированного конъюгата до исходного альдегидсодержащего олигонуклеотида.

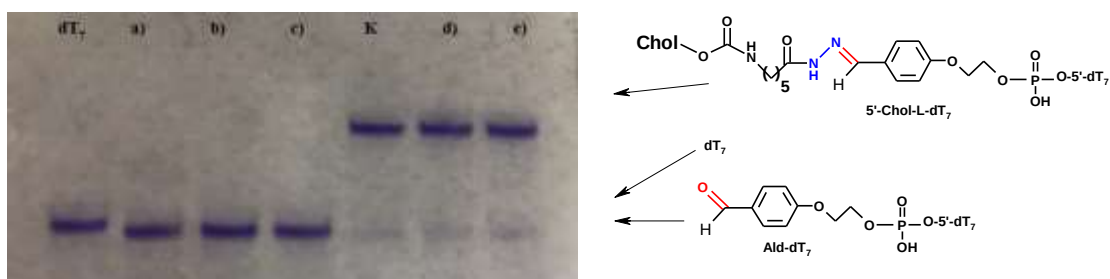


**Рисунок 2.3.4.** Стабильность гидразоновой связи 5'-Chol-L-dT<sub>7</sub> при обработке в различных условиях деблокирования: а) 30 %-ный раствор аммиака, 55°C, 16 ч; б) смесь АМА (40%-ный водный раствор метиламина/30%-ный водный раствор аммиака, 1/1, v/v), 65°C, 15 мин; с) смесь АМА, комнатная температура, 16 ч; d) 0.05M К<sub>2</sub>СО<sub>3</sub> в метаноле, комнатная температура, 16 ч; e) *N*-метил-2-пирролидинон/(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N/(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N·3HF (150/75/100, v/v/v), 65°C, 1.5 ч. К – исходная реакционная смесь при синтезе 5'-Chol-L-dT<sub>7</sub>; L: - ОС(О)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>С(О)NH-N=CH-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OP(O)(OH)-; Chol: остаток холестерина. Денатурирующий 15 %-ый ПААГ, окрашивание "Stains-all".

| NaOAc (pH 5.2):dioxane | 1:1   |       |     | 1:3   |       |     | 1:9   |       |     |
|------------------------|-------|-------|-----|-------|-------|-----|-------|-------|-----|
| [NaOAc]                | 0.1 M | 0.5 M | 1 M | 0.1 M | 0.5 M | 1 M | 0.1 M | 0.5 M | 1 M |
| Chol-L-dT <sub>7</sub> |       |       |     |       |       |     |       |       |     |
| dT <sub>7</sub>        |       |       |     |       |       |     |       |       |     |
| Ald-dT <sub>7</sub>    |       |       |     |       |       |     |       |       |     |

**Рисунок 2.3.5.** Оптимизация условий твердофазного синтеза 5'-Chol-L-dT<sub>7</sub>. Chol: остаток холестерина; L: - ОС(О)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>С(О)NH-N=CH-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OP(O)(OH)-; Ald: НС(О)С<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OP(O)(OH)-; dT<sub>7</sub> = 5'-d(TTTTTT); d(N), дезоксирибонуклеотиды. Денатурирующий 15 %-ый ПААГ, окрашивание "Stains-all".

При выборе оптимальных условий твердофазного синтеза гидразонсодержащего Chol-L-dT<sub>7</sub> варьировали концентрацию ацетатного буфера и соотношение водной и органической фаз (рис. 2.3.5).

Таким образом в ходе оптимизации условий синтеза и деблокирования было показано: при образовании гидразоновой связи соотношение диоксан/вода играет бóльшую роль нежели концентрация ацетатного буфера; отщепление от твердого носителя и удаление защитных групп аммиаком, метиламином или их смесью (смесь АМА) при любом температурном режиме приводит к деструкции этой связи; при использовании ультрамягких условий щелочного деблокирования (0.05 М раствор K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в метаноле), а также смеси реагентов для удаления 2'-O-TBDMS-защитных групп связь стабильна. На рисунке 2.3.6 приведены результаты гель-электрофоретического анализа реакционных смесей при синтезе конъюгатов (1-3, 5, 7-16, табл. 2.3.1), содержащих гидразоновую связь.

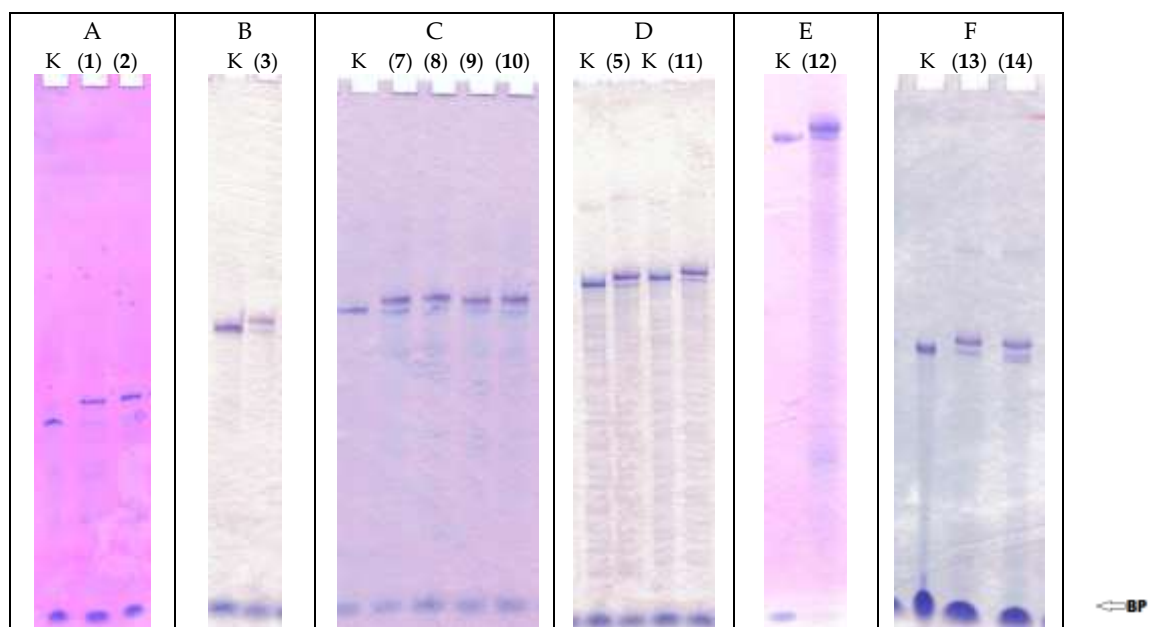


**Рисунок 2.3.6.** Анализ реакционных смесей после синтеза конъюгатов (1-3,5,7-16) с гидразоновой связью: (А) 5'-липофильные конъюгаты смысловой цепи siРНК (1,2); (Б) 5'-липофильный конъюгат митохондриальной антирепликативной РНК (3); (В) 5'-липофильные конъюгаты митохондриальных антирепликативных РНК (7-10); (Г) 5'-липофильные конъюгаты митохондриальной антирепликативной РНК (5) и направляющей РНК (11); (Д) 5'-липофильный конъюгат митохондриальной направляющей РНК (12); (Е) 5'-липофильные конъюгаты sgРНК (13,14); (Ж) 5'-липофильные конъюгаты sgРНК (15,16) (табл. 2.3.1). К – исходный альдегидсодержащий олигонуклеотид. Денатурирующий 15 %-ый ПААГ, окрашивание "Stains-all", BP – бромфеноловый синий.

В случае целесообразности получения стабильных аналогов целевых 5'-конъюгатов (например, при изучении влияния природы связи, соединяющей ФМ и терапевтическую НК на эффективность действия последней), предложенный подход позволяет провести

восстановление гидразоновой связи боргидридом/борциангидридом натрия в мягких условиях без изменения структуры самого олигонуклеотида (**4**, **6**, табл. 2.3.1) до или после стадий деблокирования. Общие выходы полученных конъюгатов после препаративного выделения составили 10-24 % в расчете на первое нуклеозидное звено.

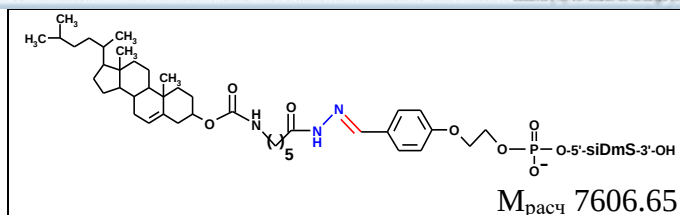
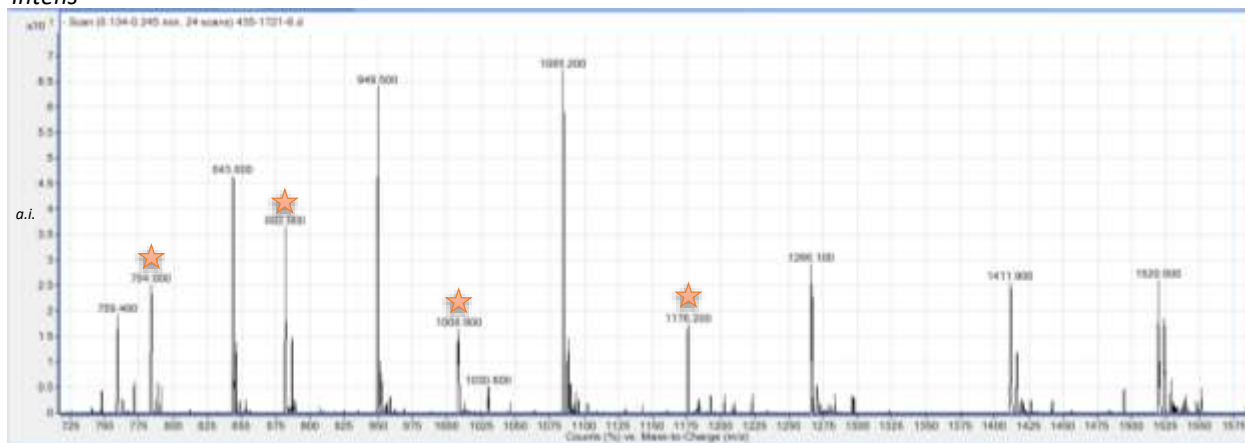
**Таблица 2.3.1.** Структуры 5'-липофильных конъюгатов олигонуклеотидов.

| N  | Конъюгат                      | Последовательность 5' → 3' <sup>1</sup>                                                                                                          | Тип                                                 |
|----|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 1  | Chol-L-siDmS                  | Chol-L-GGCUU <sup>m</sup> GAC <sup>m</sup> AAGUU <sup>m</sup> GU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> GG (21нт)                          | siPHK <sup>2</sup>                                  |
| 2  | Toc-L-siDmS                   | Toc-L-GGCUU <sup>m</sup> GAC <sup>m</sup> AAGUU <sup>m</sup> GU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> GG (21нт)                           |                                                     |
| 3  | Chol-L-mCR57/16               | Chol-L-CAAAUUUUAAACUCUCCAAACGAGCCCCC<br>UACAGGGCUCUU (40нт)                                                                                      | Митохондриальные антирепликативные РНК <sup>3</sup> |
| 4  | Chol-L <sub>1</sub> -mCR57/16 | Chol-L <sub>1</sub> -CAAAUUUUAAACUCUCCAAACGAGCCCCC<br>UACAGGGCUCUU (40нт) <sup>6</sup>                                                           |                                                     |
| 5  | Chol-L-mCR57                  | Chol-L-GCGCAAUCGGUAGCGCCAAAUUUUAACUC<br>UCCAAACGAGCCCCCUACAGGGCUCUU (56нт)                                                                       |                                                     |
| 6  | Chol-L <sub>1</sub> -mCR57    | Chol-L <sub>1</sub> -GCGCAAUCGGUAGCGCCAAAUUUUAACUC<br>UCCAAACGAGCCCCCUACAGGGCUCUU (56нт) <sup>6</sup>                                            |                                                     |
| 7  | Chol-L-mCRC57L                | Chol-L-GCGC <sup>m</sup> AAUC <sup>m</sup> GGU <sup>m</sup> AGCGCCAAAUUUU<br>AACUCUCCAAACGAGCCCCCU <sup>m</sup> AC <sup>m</sup> AGGGCUCUU (56нт) |                                                     |
| 8  | Chol-L-mCRC57H                | Chol-L-GCGC <sup>m</sup> AAUC <sup>m</sup> GGU <sup>m</sup> AGCGCGUUUGGAGAGUU<br>AAAAUUUGGAGCCCCCU <sup>m</sup> AC <sup>m</sup> AGGGCUCUU (56нт) |                                                     |
| 9  | Chol-L-mCRHBL                 | Chol-L-GCGC <sup>m</sup> AUC <sup>m</sup> GGU <sup>m</sup> AGCGCAUCUUAACUCUC<br>UUUUAAACUGAGCCCCCU <sup>m</sup> AC <sup>m</sup> AGGGCUCUU (56нт) |                                                     |
| 10 | Chol-L-mCRHBH                 | Chol-L-GCGC <sup>m</sup> AAUC <sup>m</sup> GGU <sup>m</sup> AGCGCAGUAAAAAGAGAG<br>UUAAGAUGAGCCCCCU <sup>m</sup> AC <sup>m</sup> AGGGCUCUU (56нт) |                                                     |
| 11 | Chol-L-KSS62                  | Chol-L-GAGAAGUAAGCACUGUAAAAGGUUUUAGAG<br>CUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG (62нт)                                                                | Митохондриальные sgPHK <sup>4</sup>                 |
| 12 | Chol-L-KSS84                  | Chol-L-GAGAAGUAAGCACUGUAAAAGGUUUUAGAGCUAG<br>AAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG<br>UUGAGCCCCCUACAGGGCUCUU (84нт)                                      |                                                     |
| 13 | Chol-L-RNA40                  | Chol-L-UAAUUUCUACUCUUGUAGAUGAU<br>GAUGUGGUCUUUGGAGU (40нт)                                                                                       | Митохондриальные crPHK <sup>5</sup>                 |
| 14 | Toc-L-RNA40                   | Toc-L-UAAUUUCUACUCUUGUAGAUGAU<br>GAUGUGGUCUUUGGAGU (40нт)                                                                                        |                                                     |

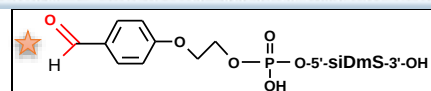
<sup>1</sup> dN: дезоксирибонуклеотид; N: рибонуклеотид; N<sup>m</sup>: 2'-О-метилрибонуклеотид. <sup>2</sup> Сенс-цепь siPHK, направленная к участку 557-577 мРНК гена множественной лекарственной устойчивости MDR1 {27}. <sup>3</sup> Антирепликативные РНК {23}, направленные на контрольную область митохондриальной ДНК (мтДНК) мыши, гаплотипы HB и C57BL/6N [491]. <sup>4</sup> Гидовые РНК, распознающие границы KSS делеции m.8363-15438del мтДНК [492]. <sup>5</sup> crPHK для системы CRISPR/Cas12a, направленной на мтДНК человека [493]. <sup>6</sup> Конъюгаты, содержащие восстановленную гидразоновую связь. Chol: остаток холестерина; Toc: остаток α-токоферола; L: -O-C(O)NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-C(O)NH-N=CH-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-P(O)(OH)-; L<sub>1</sub>: -O-C(O)NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-C(O)NH-NH-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-P(O)(OH)-.

При анализе конъюгатов, гомогенных по данным гель-электрофореза, с помощью ESI-MS, помимо пиков, соответствующих целевому гидразонсодержащему конъюгату, также наблюдали пики, относящиеся к исходному альдегидсодержащему олигонуклеотиду, что указывает на деструкцию гидразоновой связи во время масс-анализа и, тем самым, затрудняет его проведение (рис. 2.3.7). В случае конъюгата Toc-L-siRNA/s (**2**, табл. 2.3.1), помимо пиков, относящихся к Toc-L-siRNA/s и Ald-siRNA/s, третья серия пиков была отнесена к изоцианатному производному siRNA/s, образовавшемуся после "отрыва" остатка α-токоферола, что согласуется с литературными данными [494] (рис. 2.3.7Б).

## Intens



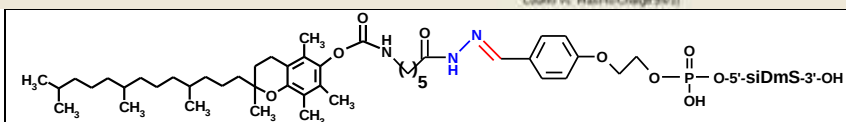
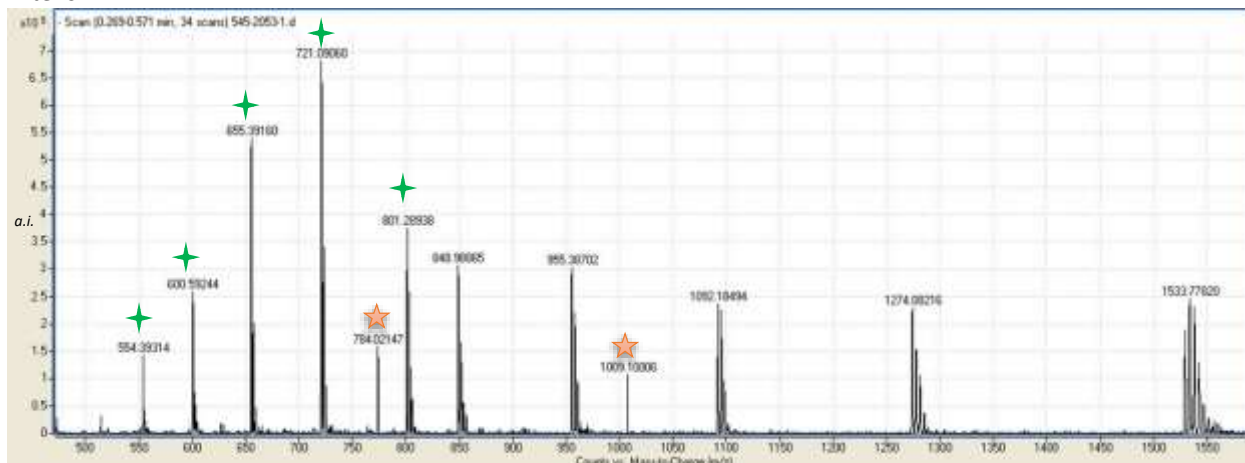
|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| [H10] / 759.40            | M 7604.00 |
| [H9] / 843.80             | M 7603.20 |
| [H8] / 949.50             | M 7604.00 |
| [H7] / 1085.20            | M 7603.40 |
| [H6] / 1266.10            | M 7602.60 |
| [H5] / 1520.00            | M 7605.00 |
| M <sub>эксп</sub> 7603.70 |           |

M<sub>расч</sub> 7066.34

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| [H9] / 784.00             | M 7065.00 |
| [H8] / 882.00             | M 7064.00 |
| [H7] / 1008.90            | M 7069.30 |
| [H6] / 1176.20            | M 7063.20 |
| M <sub>эксп</sub> 7065.38 |           |

A

## Intens

M<sub>расч</sub> 7650.7

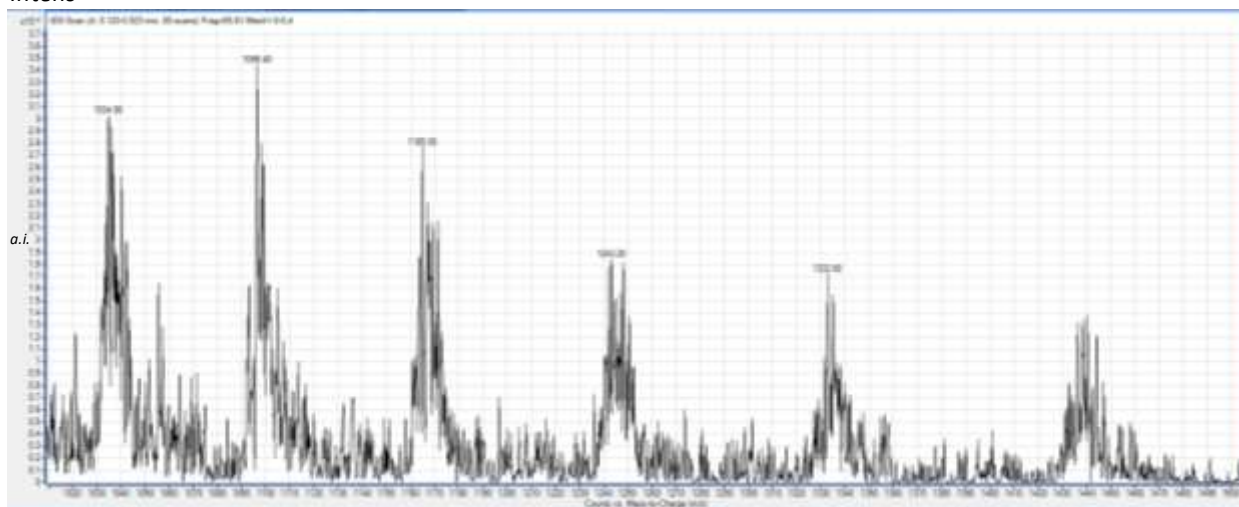
|                           |                                                                     |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| [H9] / 848.99             | M 7649.9                                                            |
| [H8] / 955.39             | M 7651.1                                                            |
| [H7] / 1092.18            | M 7652.29                                                           |
| [H6] / 1274.08            | M 7650.49                                                           |
| [H5] / 1533.78            | M 7673.89 – 23(M <sub>Na+</sub> ) + 1(M <sub>H+</sub> ) = M 7651.89 |
| M <sub>эксп</sub> 7651.13 |                                                                     |

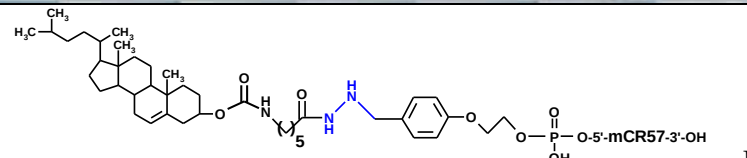
|                           |                           |
|---------------------------|---------------------------|
|                           |                           |
| M <sub>расч</sub> 7221.00 |                           |
| [H13] / 554.39            | M 7220.07                 |
| [H12] / 600.59            | M 7219.08                 |
| [H11] / 655.39            | M 7220.29                 |
| [H10] / 721.09            | M 7220.9                  |
| [H9] / 801.29             | M 7220.61                 |
|                           | M <sub>ЭКСП</sub> 7220.19 |

|                            |                                                                         |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| [H13] / 1033.00            | $M\ 13442.00 - 2 \cdot 23(M_{Na^+}) + 2 \cdot 1(M_{H^+}) = M\ 13398.00$ |
| [H12] / 1120.70            | $M\ 13460.40 - 3 \cdot 23(M_{Na^+}) + 3 \cdot 1(M_{H^+}) = M\ 13394.40$ |
| [H11] / 1222.60            | $M\ 13459.60 - 3 \cdot 23(M_{Na^+}) + 3 \cdot 1(M_{H^+}) = M\ 13393.60$ |
| M <sub>эксп</sub> 13391.16 |                                                                         |

А

Intens



|                                                                                     |                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
|  |                                                                         |
| M <sub>расч</sub> 18587.28                                                          |                                                                         |
| [H18] / 1034.90                                                                     | $M\ 18646.20 - 3 \cdot 23(M_{Na^+}) + 3 \cdot 1(M_{H^+}) = M\ 18580.20$ |
| [H17] / 1096.40                                                                     | $M\ 18655.80 - 3 \cdot 23(M_{Na^+}) + 3 \cdot 1(M_{H^+}) = M\ 18589.80$ |
| [H16] / 1165.00                                                                     | $M\ 18656.00 - 3 \cdot 23(M_{Na^+}) + 3 \cdot 1(M_{H^+}) = M\ 18590.00$ |
| [H15] / 1243.20                                                                     | $M\ 18660.00 - 3 \cdot 23(M_{Na^+}) + 3 \cdot 1(M_{H^+}) = M\ 18594.00$ |
| [H14] / 1332.80                                                                     | $M\ 18673.20 - 4 \cdot 23(M_{Na^+}) + 4 \cdot 1(M_{H^+}) = M\ 18585.20$ |
| M <sub>эксп</sub> 18587.86                                                          |                                                                         |

Б

**Рисунок 2.3.8.** ESI-MS спектры Chol-L<sub>1</sub>-C57/1 (А) и Chol-L<sub>1</sub>-C57/2 (Б). Chol: остаток холестерина; L: -OC(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>C(O)NH-NH-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>OP(O)(OH)-.

Лабильность гидразоновой связи при различных значениях pH была протестирована на примере конъюгатов siРНК с холестерином и α-токоферолом (Chol-L-siRNA/s (1), Тос-L-siRNA/s (2), табл. 2.3.1), инкубированных в течение 1, 2, 3, 4, 5, и 24 ч при 37°C в фосфатном буфере при pH 4.8-7.8 (рис. 2.3.9).

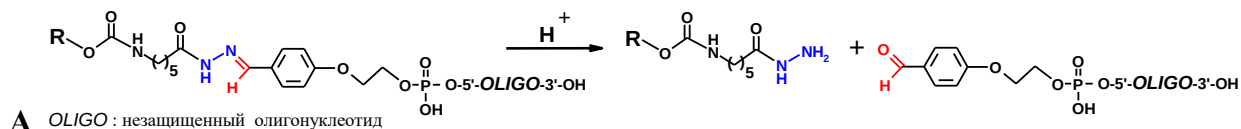


**Рисунок 2.3.9.** Схема гидролиза (А) и кинетические кривые расщепления гидразоновых связей в липофильных конъюгатах Chol-L-siRNA/s (Б) и Тос-L-siRNA/s (В) при различных значениях pH. Количественное определение полноразмерного конъюгата (% , ось Y) в зависимости от pH и времени инкубации.

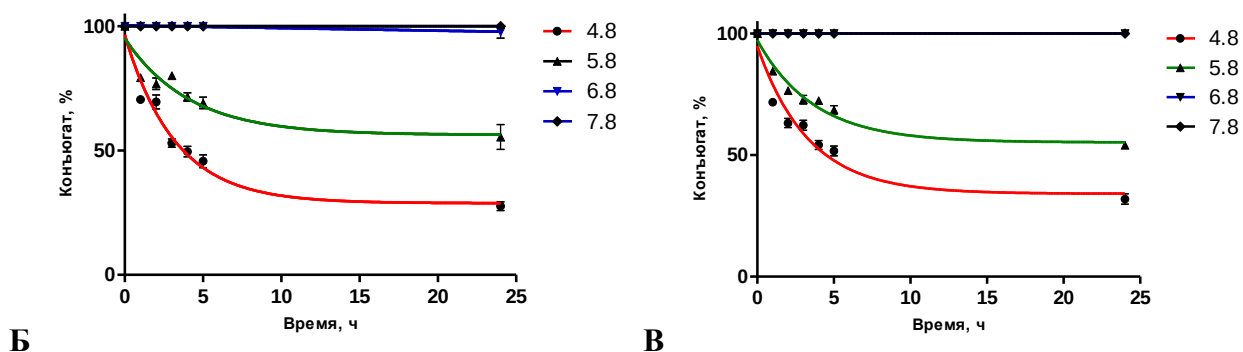


**Рисунок 2.3.9 (продолжение).** Схема гидролиза (А) и кинетические кривые расщепления гидразоновых связей в липофильных конъюгатах Chol-L-siRNA/s (Б) и Tos-L-siRNA/s (В) при различных значениях pH. Количественное определение полноразмерного конъюгата (% , ось Y) в зависимости от pH и времени инкубации. Результаты представляют собой среднее значение ( $\pm$ SD) по результатам трех независимых экспериментов.

Исследование показало, что при значениях pH, близких к нейтральным, эти конъюгаты сохраняют стабильность. Напротив, при pH 4,8 - близком к внутриэндосомальному - более 70% обоих конъюгатов гидролизуются в течение суток.

Резюмируя представленные в разделе данные, можно заключить, что разработанный подход позволяет синтезировать 5'-липофильные конъюгаты олигонуклеотидов, содержащие гидразоновую связь либо ее стабильный аналог, с высокой эффективностью. Подход может быть распространен на синтез pH-чувствительных конъюгатов олигонуклеотидов различных типов (рибо-, дезоксирибо-, 2'-O-метилрибо- и др.) с биомолекулами различной природы.

## 2.4. Разработка подхода к твердофазному синтезу 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с остатками функциональных молекул различной природы с использованием $N,N'$ -дисукцинимидилкарбоната как активирующего агента

Еще один предложенный подход к твердофазному получению 5'-конъюгатов олигонуклеотидов основан на активации единственной свободной 5'-гидроксильной группы защищенного носитель-связанного олигонуклеотида  $N,N'$ -дисукцинимидилкарбонатом с последующим взаимодействием такого активированного олигонуклеотида с аминокислотами ФМ (рис. 2.4.1) [3,16].

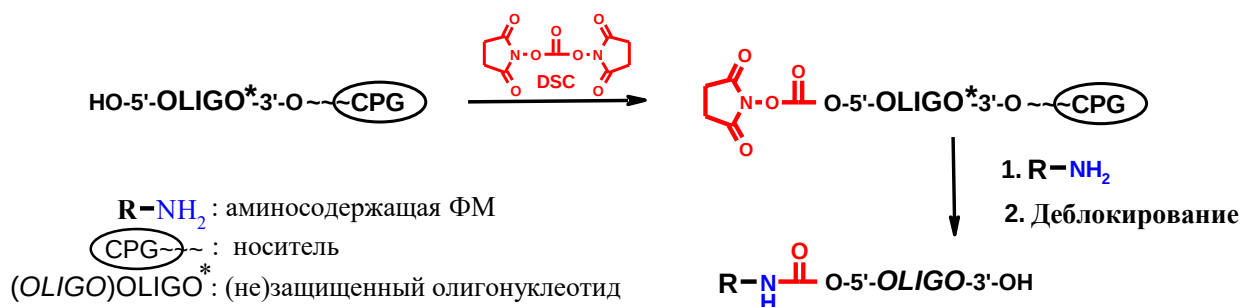


**Рисунок 2.4.1.** Общая схема синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, основанная на активации 5'-гидроксильной группы защищенного носитель-связанного олигонуклеотида  $N,N'$ -дисукцинимидилкарбонатом.

Возможности подхода были продемонстрированы с использованием ряда коммерчески доступных аминокислотных соединений (короткий пептид трилейцин, олеиламин, пиперазин, этилендиамин, 1,6-диаминогексан, 1,12-диаминододекан, пропаргиламин), аминокислотных борного кластера и эстрогена (любезно предоставлены Сильниковым В.Н. и Новопашиной Д.С., ИХБФМ СО РАН), монопиперазинового производного тритильной спиновой метки (любезно предоставлено Тормышевым В.М., НИОХ СО РАН), а также аминокислотных  $\alpha$ -токоферола, фолиевой кислоты и холестерина, схемы синтеза которых представлены на рисунке 2.4.2. Гидроксильная группа  $\alpha$ -токоферола была активирована  $N,N'$ -дисукцинимидилкарбонатом (DSC) (рис. 2.4.2.А, стадия i) с последующим взаимодействием с 1,6-диаминогексаном (рис. 2.4.2.А, стадия ii) [495]. Введение 1,6-диаминогексана по  $\gamma$ -карбоксильной группе фолиевой кислоты проводили после ее активации  $N,N'$ -дициклогексилкарбодиимидом и  $N$ -гидроксисукцинимидом по аналогии с [496] (рис. 2.4.2.Б). Взаимодействие коммерчески доступного хлорформиата холестерина с алифатическими гекса- и додека-диаминами приводило к двум его производным (рис. 2.4.2.В) [497]. Структура целевых соединений

после хроматографического выделения было доказано методами  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией.

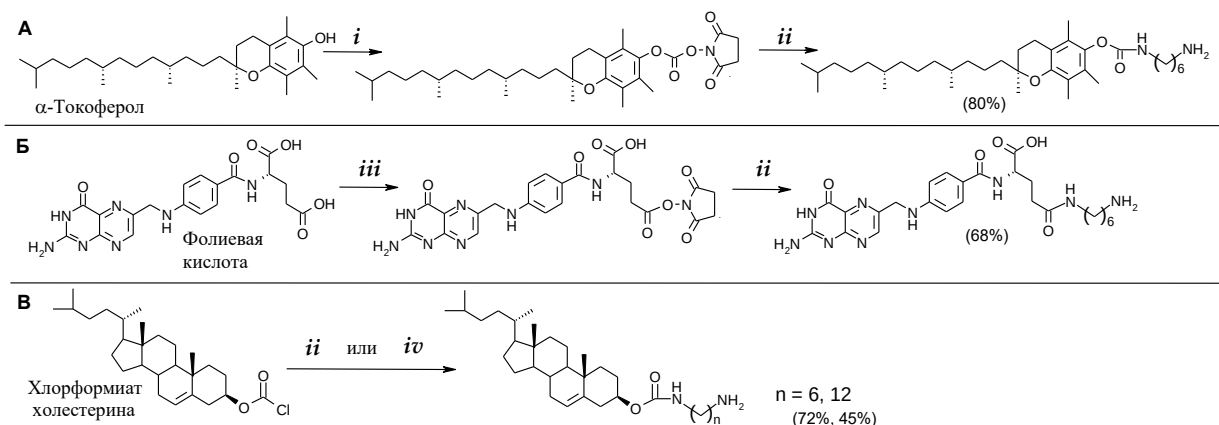


**Рисунок 2.4.2.** Схема синтеза аминопроводных  $\alpha$ -токоферола (А), фолиевой кислоты (Б) и холестерина (В). Реагенты: *i*) DSC,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ , комнатная температура (к.т.); *ii*) 1,6-диаминогексан,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , далее к.т.; *iii*)  $N,N'$ -дициклогексилкарбодиимид,  $N$ -гидроксисукцинимид,  $50^\circ\text{C}$ , далее к.т.; *iv*) 1,12-диаминододекан,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , далее к.т. Активированные производные  $\alpha$ -токоферола и фолиевой кислоты использовали в реакции с 1,6-диаминогексаном без предварительной очистки. Выходы целевых соединений представлены в скобках.

При разработке и апробации подхода в качестве олигонуклеотидов были использованы гекса-, гепта-, дека- и эйкозидезоксирибонуклеотиды, а также малая интерферирующая РНК, направленная к мРНК гена MDR1.

Два гомо-бифункциональных реагента обычно используются в органической и биоорганической химии для активации amino- и гидроксильных фрагментов: 1,1'-карбонилдиимидазол (CDI) и  $N,N'$ -дисукцинимидилкарбонат (DSC) [498]. Реакционная способность  $N$ -сукцинимидилкарбонатного производного, образующегося при активации DSC, выше, чем имидазолкарбонатного производного, полученного после активации CDI. Карбаматная связь, образующаяся после соединения сукцинимидилкарбоната с аминоксодержащими ФМ, химически стабильна [499]. В контексте химии нуклеиновых кислот активация 5'-амино-группы посредством DSC для синтеза олигонуклеотид-пептидных конъюгатов описана в работах [500, 501]. Для активации 5'-гидроксильной группы олигодезоксирибонуклеотидов описано использование CDI [209, 211–214]. На момент разработки описываемого подхода не сообщалось о использовании DSC для таких целей, таким образом, мы впервые реализовали данный вариант конъюгации.

На рисунке 2.4.4. представлены возможности предложенного подхода, основанного на активации 5'-гидроксильной группы защищенного носитель-связанного олигонуклеотида  $N,N'$ -дисукцинимидилкарбонатом. Последующее взаимодействие

олигонуклеотида, активированного сукцинилкарбаматным остатком, с аминокосодержащими ФМ позволяет получать 5'-конъюгаты олигонуклеотидов различных типов.

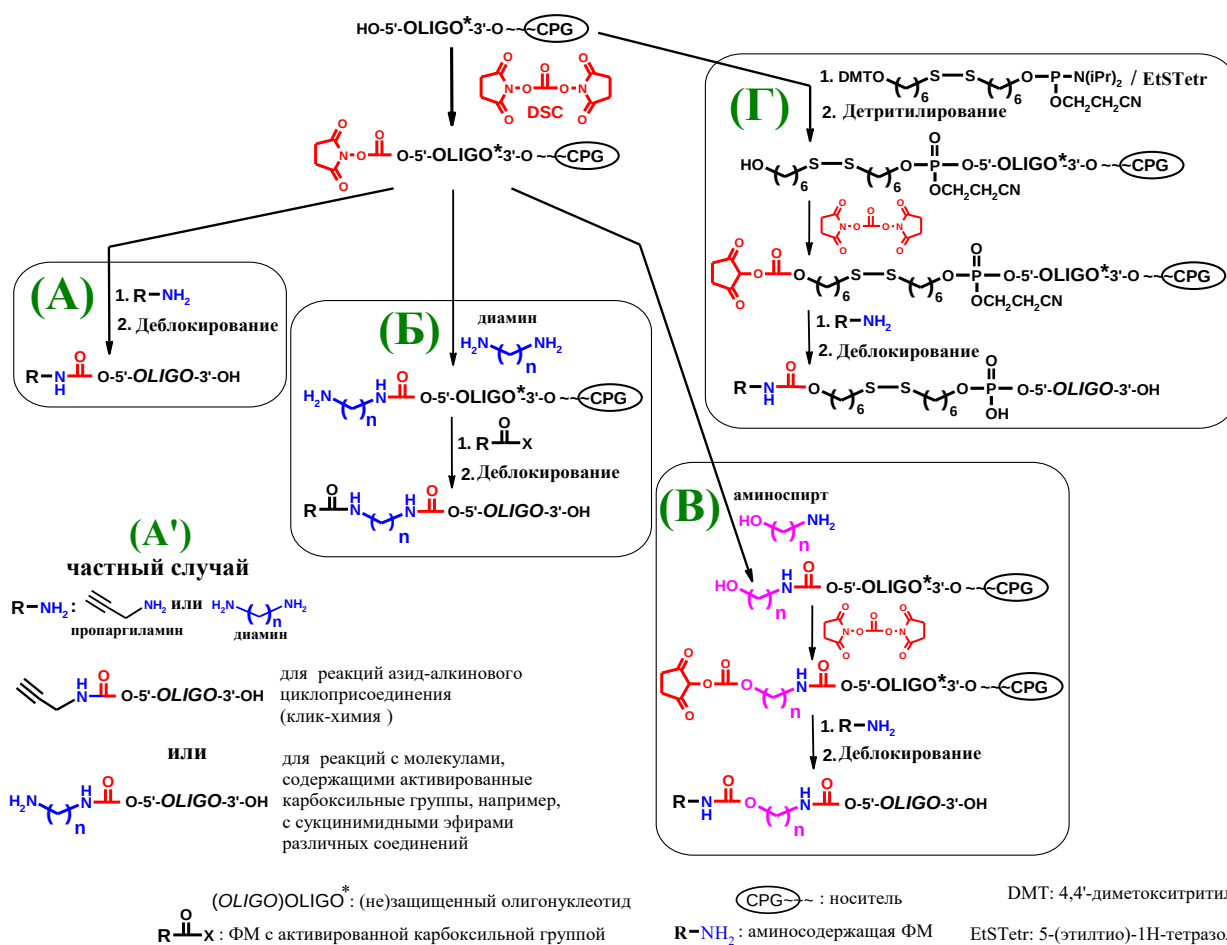


**Рисунок 2.4.3.** Возможности подхода к синтезу 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, основанного на активации 5'-гидроксильной группы защищенного носитель-связанного олигонуклеотида *N,N'*-дисукцинимидилкарбонатом.

Оптимизацию условий "основного" пути синтеза (рис. 2.4.3, Вариант А) проводили на модельном гептадезокситимидилате. Было показано: а) для активации 5'-гидроксильной группы добавление DSC к носитель-связанному олигонуклеотиду необходимо проводить дважды по 30-40 мин, в качестве растворителя лучше всего использовать абсолютный ацетонитрил; б) требуется обязательная двукратная промывка носителя с активированным олигонуклеотидом перед добавлением аминокосодержащей ФМ таким же объемом ацетонитрила; в) растворитель для аминокосодержащей ФМ должен обеспечивать ее максимальное растворение (показаны к использованию: ацетонитрил, дихлорметан, тетрагидрофуран, диметилсульфоксид, диметилформамид, толуол), в случае необходимости можно использовать смесь нескольких растворителей; г) температура проведения обеих реакций 37°C; д) в качестве основания можно использовать пиридин, триэтиламин,

диизопропилэтиламин, причем их качество играет ключевую роль в эффективности протекания обеих реакции; е) необходимо обеспечить эффективное перемешивание.

При апробации оптимизированных условий для синтеза конъюгатов гетерогенных по составу олигомеров было показано, что при взаимодействии DSC-активированных носитель-связанных олигонуклеотидов с диаминами в реакционной смеси помимо полосы, соответствующей целевому 5'-аминопроизводному олигонуклеотида (**9,10,12,19-21**, табл. 2.4.1), присутствует продукт с большей электрофоретической подвижностью. Было сделано предположение, что это 5',5'-димерный продукт сшивки двух олигонуклеотидов посредством диамина. Соотношение целевого и побочного продуктов менялось в зависимости от длины олигонуклеотида, избытка диамина и используемых растворителей. При синтезе производных (**12**) и (**19**) (табл. 2.4.1) побочные димерные продукты были выделены методом препаративного гель-электрофореза и охарактеризованы методом ESI-MS ( $dT_6$ -C(O)-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-C(O)-dT<sub>6</sub>: М.теор.3694.4/М.эксп.3695.5;  $d(CAGCGGCGTG)$ -C(O)-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>NH-C(O)-d(CAGCGGCGTG): М.теор.6250/М.эксп.6247.9). В ходе дополнительной оптимизации были подобраны условия минимизирующие образование таких побочных продуктов. В качестве альтернативного решения этой проблемы предложено использование монозащищенных диаминов (см. далее описание Варианта Б, рис. 2.4.3).

На рисунке 2.4.4 в качестве примера приведены электрофоретический (панель А) и хроматографический (панель Б) профили анализа реакционных смесей при синтезе конъюгатов модельного гептадезоксинуклеотида (**1-11**, табл. 2.4.1).

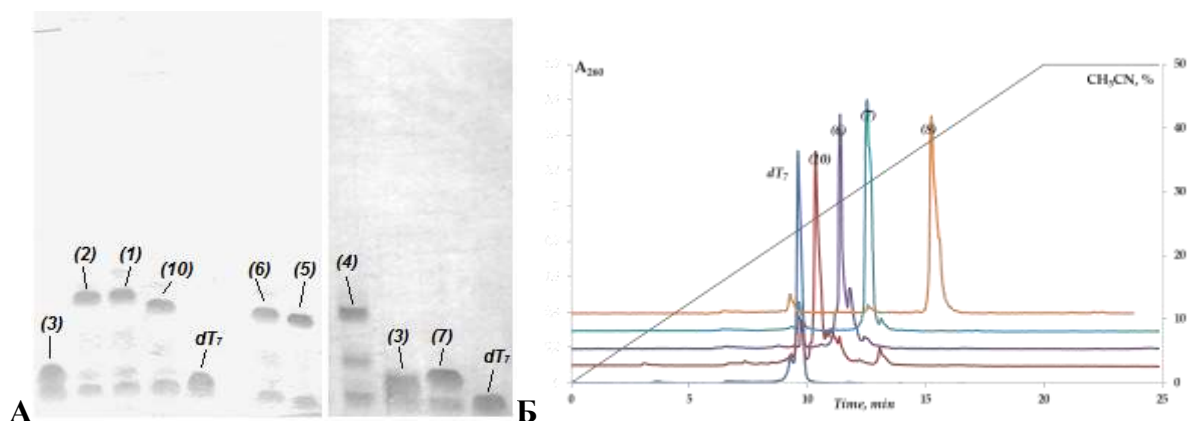


**Рисунок 2.4.4. (А)** Анализ реакционных смесей олигонуклеотида dT<sub>7</sub> и его конъюгатов в ПААГ: (3) - *Oleyl*-NHC(O)-dT<sub>7</sub>, (2) - *CholL*<sub>12</sub>-NHC(O)-dT<sub>7</sub>, (1) - *CholL*<sub>6</sub>-NHC(O)-dT<sub>7</sub>, (10) - *NH<sub>2</sub>L*<sub>6</sub>-NHC(O)-dT<sub>7</sub>, (6) - *FolL*<sub>6</sub>-NHC(O)-dT<sub>7</sub>, (5) - *TocL*<sub>6</sub>-NHC(O)-dT<sub>7</sub>; (4) - *EstL*<sub>6</sub>-NHC(O)-dT<sub>7</sub>, (3) - *Oleyl*-NHC(O)-dT<sub>7</sub>, (7) - (*Leu*)<sub>3</sub>-NHC(O)-dT<sub>7</sub>; Денатурирующий 15 %-ый ПААГ, окрашивание "Stains-all", ВР – бромфеноловый синий. **(Б)** ОФ ВЭЖХ-анализ реакционных смесей исходного олигонуклеотида dT<sub>7</sub> и конъюгатов (**12, 13**). Условия аналитической ОФ-ВЭЖХ см. экспериментальную часть. dT<sub>7</sub> = 5'-d(TTTTTTTT); d(N), дезоксирибонуклеотиды (табл. 2.4.1).

Полученные 5'-конъюгаты выделяли методом препаративного гель-электрофореза. Их гомогенность подтверждали методом аналитического гель-электрофореза в денатурирующих условиях с последующим подтверждением структуры методом масс-спектрометрии. По разработанному протоколу (рис. 2.4.3, Вариант А) были получены конъюгаты гекса- и гептадезокситимидилата (**1-12**), декадезоксирибонуклеотидов (**19-23**), эйкозадезоксирибонуклеотида (**24, 25**) и siРНК (**26, 27**) (табл 2.4.1).

**Таблица 2.4.1.** Структуры 5'-конъюгатов олигонуклеотидов

| N  | Конъюгат, 5'-3' <sup>1</sup>                                                                                                                                                     | Молекуляр. масса |                    |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------|
|    |                                                                                                                                                                                  | Теор.            | Эксп. <sup>2</sup> |
| 1  | <i>CholL</i> <sub>6</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (А)                                                                                                                                 | 2623.2           | 2624.7             |
| 2  | <i>CholL</i> <sub>12</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (А)                                                                                                                                | 2707.0           | 2708.6             |
| 3  | <i>Oleyl</i> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (А)                                                                                                                                              | 2361.9           | 2361.3             |
| 4  | <i>EstL</i> <sub>6</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (А)                                                                                                                                  | 2506.9           | 2507.6             |
| 5  | <i>TocL</i> <sub>6</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (А)                                                                                                                                  | 2667.3           | 2668.2             |
| 6  | <i>FolL</i> <sub>6</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (А)                                                                                                                                  | 2677.9           | 2676.2             |
| 7  | ( <i>Leu</i> ) <sub>3</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (А)                                                                                                                               | 2451.9           | 2352.1             |
| 8  | <i>c-B</i> <sub>12</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (А)                                                                                                                                  | 2303.0           | 2301.6             |
| 9  | <i>NH<sub>2</sub>L</i> <sub>6</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (А)                                                                                                                       | 2210.6           | 2210.4             |
| 10 | <i>NH<sub>2</sub>L</i> <sub>12</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (А)                                                                                                                      | 2294.8           | 2293.4             |
| 11 | <i>CH</i> ≡ <i>C-CH</i> <sub>2</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (А)                                                                                                                      | 2149.5           | 2149.5             |
| 12 | <i>NH<sub>2</sub>L</i> <sub>6</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (А)                                                                                                                       | 1905.2           | 1905.5             |
| 13 | <i>MBL</i> <sub>6</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (Б)                                                                                                                                   | 2039.4           | 2039.6             |
| 14 | <i>GlyL</i> <sub>6</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (Б)                                                                                                                                  | 2357.9           | 2358.4             |
| 15 | <i>FolL</i> <sub>6</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (Б)                                                                                                                                  | 2328.6           | 2329.0             |
| 16 | <i>Phn-NHL</i> <sub>6</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (А')                                                                                                                              | -                | -                  |
| 17 | <i>Phn-NHL</i> <sub>12</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (А')                                                                                                                             | -                | -                  |
| 18 | <i>Cy3L-CH</i> <sub>2</sub> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (А')                                                                                                                              | -                | -                  |
| 19 | <i>NH<sub>2</sub>L</i> <sub>2</sub> -NH-C(O)-d(CACGCCGCTG) (А)                                                                                                                   | 3075.0           | 3073,6             |
| 20 | <i>NH<sub>2</sub>L</i> <sub>2</sub> -NH-C(O)-d(CAGCGGCGTG) (А)                                                                                                                   | 3155.0           | 3153,5             |
| 21 | <i>piperazin</i> -C(O)-d(CACGCCGCTG) (А)                                                                                                                                         | 3101.0           | 3099,6             |
| 22 | <i>piperazin</i> -C(O)-d(CAGCGGCGTG) (А)                                                                                                                                         | 3181.0           | 3179,6             |
| 23 | <i>Tr-piperazin</i> -C(O)-d(CAGCGGCGTG) (А)                                                                                                                                      | 4111.0           | 4109,7             |
| 24 | <i>c-B</i> <sub>12</sub> -NH-C(O)-d(ATACGTTAACGATCCTTCAC) (А)                                                                                                                    | 6281.2           | 6282.0             |
| 25 | <i>Oleyl</i> -NH-C(O)-d(ATACGTTAACGATCCTTCAC) (А)                                                                                                                                | 6330.4           | 6330.2             |
| 26 | ( <i>Leu</i> ) <sub>3</sub> -NH-C(O)-GGCUU <sup>m</sup> GAC <sup>m</sup> AAGUU <sup>m</sup> GU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> GG (А)                               | 7221.7           | 7222.4             |
| 27 | <i>CholL</i> <sub>6</sub> -NH-C(O)-GGCUU <sup>m</sup> GAC <sup>m</sup> AAGUU <sup>m</sup> GU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> GG (А)                                 | 7394.2           | 7393.8             |
| 28 | ( <i>Leu</i> ) <sub>3</sub> -NH-C(O)- <i>LSSL</i> -GGCUU <sup>m</sup> GAC <sup>m</sup> AAGUU <sup>m</sup> GU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> GG (Г)                 | 7549.6           | 7551.9             |
| 29 | <i>CholL</i> <sub>6</sub> -NH-C(O)- <i>LSSL</i> -GGCUU <sup>m</sup> GAC <sup>m</sup> AAGUU <sup>m</sup> GU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> GG (Г)                   | 7722.5           | 7722.8             |
| 30 | <i>CholL</i> <sub>6</sub> -NH-C(O)- <i>L</i> <sub>12</sub> -NHC(O)-GGCUU <sup>m</sup> GAC <sup>m</sup> AAGUU <sup>m</sup> GU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> GG (Б) | 7620.5           | 7619.5             |
| 31 | <i>MBL</i> <sub>6</sub> -NHC(O)-GGCUU <sup>m</sup> GAC <sup>m</sup> AAGUU <sup>m</sup> GU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> GG (Б)                                    | 7114.3           | 7115.2             |
| 32 | <i>GlyL</i> <sub>6</sub> -NHC(O)-GGCUU <sup>m</sup> GAC <sup>m</sup> AAGUU <sup>m</sup> GU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> GG (Б)                                   | 7432.8           | 7433.7             |
| 33 | <i>FolL</i> <sub>6</sub> -NHC(O)-GGCUU <sup>m</sup> GAC <sup>m</sup> AAGUU <sup>m</sup> GU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> AU <sup>m</sup> GG (Б)                                   | 7403.8           | 7404.5             |

<sup>1</sup> В скобках указан вариант синтеза на рисунке 2.4.1. <sup>2</sup> По данным LC-ESI- и MALDI-TOF-масс-спектрометрии. *Chol*- остаток холестерина; *Oleyl*-NH- остаток олеиламина; *Est*- остаток эстрона; *Toc*- остаток α-токоферола; *Fol*- остаток γ-фолата; *Gly*- остаток глицирритиновой кислоты; *MB*- остаток 4-метоксибензойной кислоты; (*Leu*)<sub>3</sub>-NH- остаток трилейцина; *c-B*<sub>12</sub>-NH- остаток *closo*-додекабората; *CH*≡*C-CH*<sub>2</sub>-NH- остаток пропаргиламина; *piperazin* - остаток пиперазина; *Tr-piperazin* - остаток пиперазинового производного тритильной спиновой метки; *LSSL* - -O-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-S-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-O-P(O)(OH)-; *L*<sub>2</sub> - -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-; *L*<sub>6</sub> - -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-; *L*<sub>12</sub> - -(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-; *Phn* - остаток *N*-(2-гидроксиэтил)феназиния; *Cy3L* - краситель Cy3 с 1,2,3-триазольным линкером (клик-реакция); N<sup>m</sup> - 2'-*O*-метилрибонуклеотид; d(N) - дезоксирибонуклеотид.

Также предложенный подход позволяет получать конъюгаты, в которых олигонуклеотид и ФМ соединены деградируемыми связями (рис. 2.4.3, Вариант Г). Так,

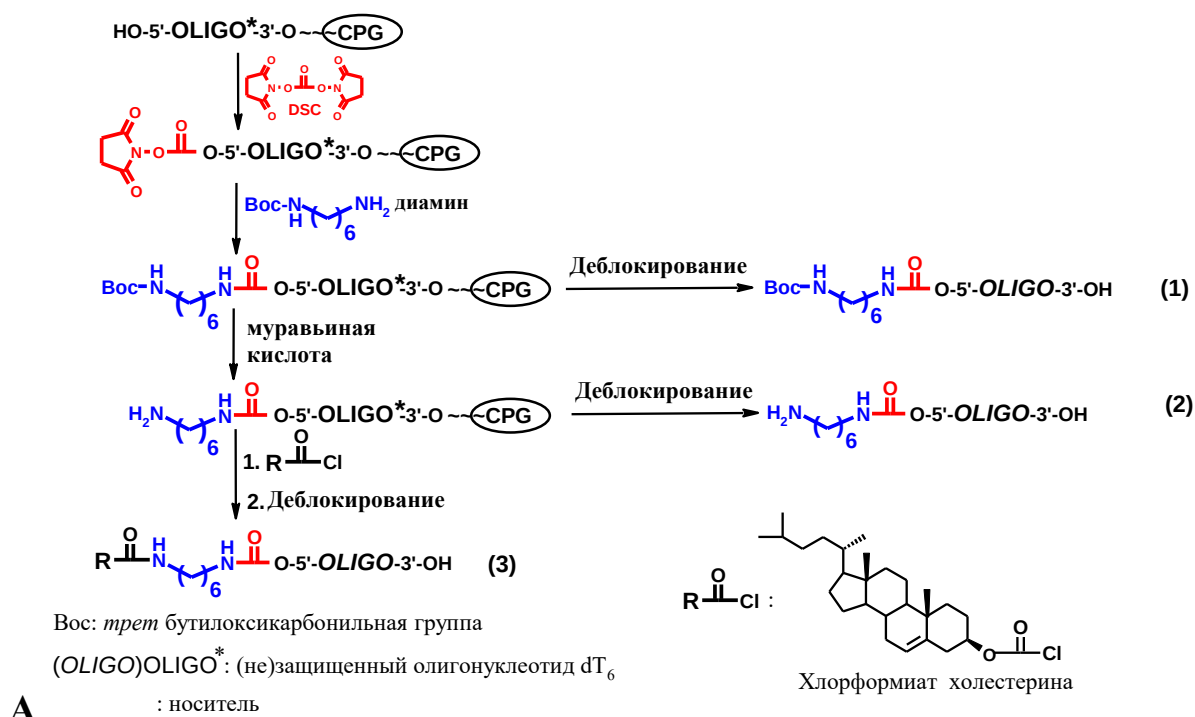
например, для введения восстанавливаемой дисульфидной связи на последней стадии олигонуклеотидного синтеза был использован коммерчески доступный SS-содержащий фосфитамид-модификатор. Далее проводили активацию 5'-гидроксильной группы и получали конъюгаты siРНК с трилейцом или холестеринам (**28, 29**, табл 2.4.1). Такая связь может быть восстановлена при помощи дитиотреитола или глутатиона. В работе [444], по аналогичной схеме, остаток холестерина был введен в siРНК посредством фотолабильного линкера на основе 1-(2-нитрофенилэтан)-1,2-диола.

Предлагаемый подход позволяет, при необходимости, удлинять линкеры между олигонуклеотидом и ФМ путем нескольких последовательных твердофазных реакций активации/добавления с помощью DSC (рис. 2.4.3, Вариант В). Эта возможность была продемонстрирована при последовательном введении 12-аминододекан-1-ола и холестерил-6-аминогексилкарбамата с получением конъюгата (**30**, табл 2.4.1).

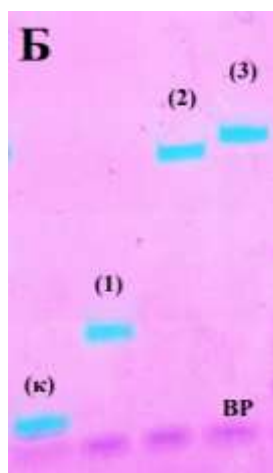
Вариант Б (рис. 2.4.3) позволяет варьировать линкер между олигонуклеотидом и функциональной молекулой, используя диамины различного строения, но ограничен только молекулами, содержащими карбоксильную группу в виде их в активированных производных либо ацилхлоридов. Оптимизацию условий синтеза проводили на модельном гексадезокситимидилате. Для этого варианта было решено использовать монозащищенные диамины. Для оптимизации условий был выбран коммерчески доступный моно-*N*-Вос-защищенный 1,6-диаминогексан. Было показано, что его введение в DSC-активированный олигонуклеотид проходит количественно и побочных димерных продуктов не наблюдается.

Вос-группа является одной из часто используемых для защиты аминогрупп, в частности, в синтезе пептидов. В литературе предложено несколько вариантов условий удаления кислотолабильной *N*-Вос-защитной группы. Для скрининга были выбраны: разбавленная трифторуксусная кислота [502], смесь 2,6-лутидина и триметилсилилтрифторметилсульфоната (TMSOTf) при различных температурах [503, 504], смесь триметилхлорсилана (TMSCl) и метанола [505], а также муравьиная кислота [506]. По данным аналитического гель-электрофореза можно сделать вывод, что обработка *N*-Вос-защищенного аминопроизводного dT<sub>6</sub> муравьиной и разбавленной трифторуксусной кислотами при комнатной температуре, а также смесью TMSOTf/2,6-лутидин при 4°C приводит к полному удалению Вос-защиты, в то время как выдерживание в смесях TMSOTf/2,6-лутидин при -20°C или TMSCl/метанол при комнатной температуре приводит либо к частичному деблокированию, либо ее удаления не происходит. На основании полученных данных, а также принимая во внимание значения показателей констант

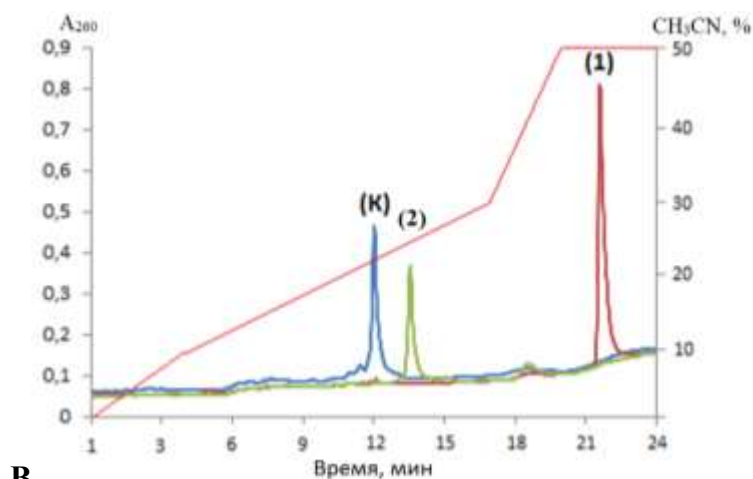
кислотности ( $pK_a$  муравьиной кислоты 3.77,  $pK_a$  трифторуксусной кислоты 1.5), далее в работе использовали муравьиную кислоту.



А



Б



В

**Рисунок 2.4.5.** А - Схема получения 5'-аминопроизводного олигонуклеотида dT<sub>6</sub> и его последующее взаимодействие с хлорформиатом холестерина. Б - Электрофореграмма реакционных смесей олигодезоксирибонуклеотида dT<sub>6</sub> и его производных: (1) – производное dT<sub>6</sub>, содержащее N-Вос-защищенный остаток 1,6-диаминогексана на 5'-конце; (2) – 5'-аминопроизводное dT<sub>6</sub>; (3) – 5'-холестериновый конъюгат dT<sub>6</sub>. (К) – Исходный dT<sub>6</sub>; Денатурирующий 15 %-ный ПААГ, окрашивание "Stains-all", ВР – бромфеноловый синий. В – Результат анализа реакционных смесей при синтезе dT<sub>6</sub>, 5'-аминопроизводного dT<sub>6</sub> и производного dT<sub>6</sub>, содержащего N-Вос-защищенный остаток 1,6-диаминогексана на 5'-конце, методом аналитической ОФ ВЭЖХ. Условия аналитической ОФ-ВЭЖХ см. экспериментальную часть.

Учитывая, что в кислой среде олигонуклеотиды, в частности, дезоксирибоолигонуклеотиды, склонны к апуринизации, были синтезированы защищённые

носитель-связанные двенадцатизвенные олигонуклеотиды гетерогенного состава (дезоксирibo-, рibo- и 2'-*O*-метилированные рибонуклеотиды). Показано, что при их выдерживании в муравьиной кислоте в выбранных условиях с последующим полным деблокированием разрушение цепи олигонуклеотида не происходит.

Специально проведенный эксперимент подтвердил реакционную способность аминогруппы, введенной на 5'-конце носитель-связанного олигонуклеотида. Для этого аминсодержащий олигонуклеотид, модифицированный холестерином через его хлорформат, подвергали дальнейшему деблокированию (рис. 2.4.5.А) и полученные производные олигонуклеотида dT<sub>6</sub> с открытой и защищенной 5'-аминогруппой исследовали методом гель-электрофореза и ОФ ВЭЖХ (рис. 2.4.5.Б, 2.4.5.В).

В качестве функциональных молекул (ФМ) для данного варианта были использованы 4-метоксибензойная, фолиевая и глицирретиновая кислоты; их переводили в активированные гидроксibenзотриазольные производные по методике, аналогичной работе [507]. Карбоксильную группу активировали с использованием как эквимольных количеств, так и двукратного избытка или недостатка дициклогексикарбодиимида (DCC) и гидроксibenзотриазола (HOBT) относительно каждой кислоты. Образовавшиеся бензотриазольные эфиры применяли без дополнительной очистки для обработки 5'-аминсодержащих защищённых носитель-связанных олигонуклеотидов (рис. 2.4.6.А).

При активации с двукратным избытком DCC и HOBT в гель-электрофоретических профилях наряду с ожидаемыми полосами, соответствующими 5'-конъюгатам dT<sub>6</sub>, появлялись дополнительные продукты с более высокой электрофоретической подвижностью (продукт (4), рис. 2.4.6.Б). Было выдвинуто предположение, что при введении моно-*N*-Вос-защищённого 1,6-диаминогексана происходит частичное удаление цианоэтильных защитных групп межнуклеозидных фосфатов, а избыток DCC может активировать фосфат, приводя к его взаимодействию с 5'-аминогруппой олигонуклеотида.

Чтобы проверить эту гипотезу, 5'-аминсодержащий носитель-связанный олигонуклеотид выдерживали в диметилсульфоксиде с десятикратным избытком DCC в течение 2 ч при 25 °С, затем проводили деблокирование и электрофоретический анализ. Показано, что помимо 5'-аминопроизводного олигонуклеотида (2) в смеси присутствовал продукт (4), совпадающий по подвижности с ранее наблюдаемым побочным продуктом (рис. 2.4.6.Б). После препаративного выделения этот побочный компонент охарактеризовали методом ESI-MS: его молекулярная масса оказалась на 18 а.е. меньше, чем у 5'-аминсодержащего олигонуклеотида dT<sub>6</sub>, что указывает на возможное образование циклических структур с потерей молекулы воды.

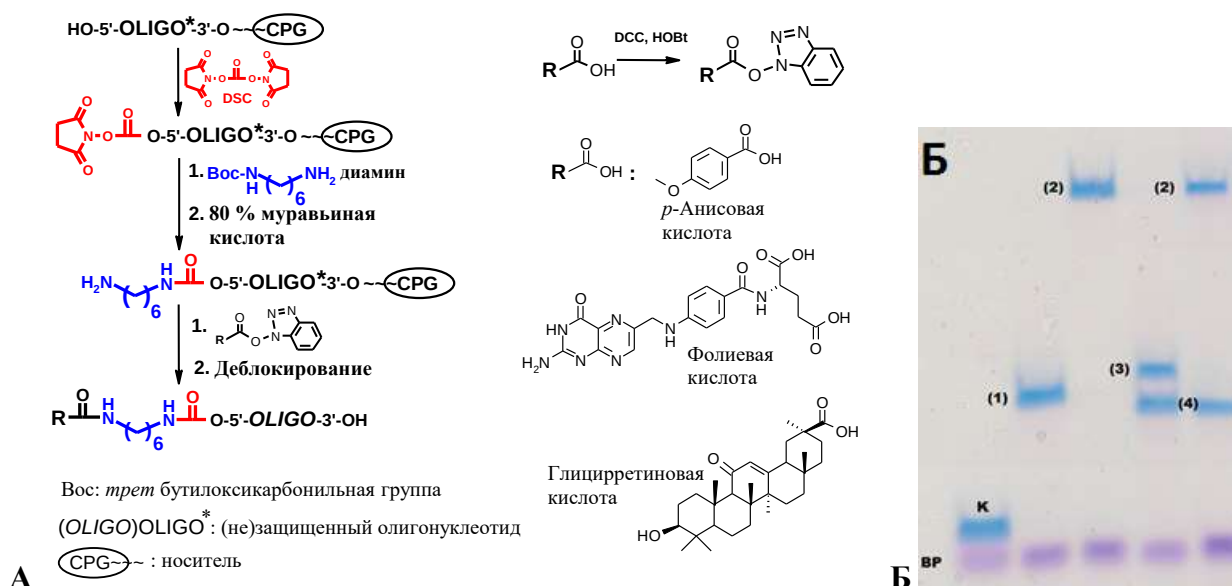


**Рисунок 2.4.6. А** – Схема получения конъюгатов олигонуклеотида dT<sub>6</sub> и 4-метоксибензойной, фолиевой и глицирретиновой кислотами. **Б** - Электрофореграмма реакционных смесей олигодезоксирибонуклеотида dT<sub>6</sub> и его производных: (1) – полоса, соответствующая производному dT<sub>6</sub>, содержащему *N*-Вос-защищенный остаток 1,6-диаминогексана на 5'-конце; (2) – полоса, соответствующая производному dT<sub>6</sub>, содержащему аминогруппу на 5'-конце; (3) – полоса, соответствующая конъюгату dT<sub>6</sub>, с остатком 4-метоксибензойной кислоты на 5'-конце; (4) – полоса, соответствующая побочному продукту. (К) - Исходный олигодезоксирибонуклеотид dT<sub>6</sub>. Денатурирующий 15 %-ный ПААГ, окрашивание "Stains-all", ВР – бромфеноловый синий.

В результате оптимизации условий синтеза было установлено, что использование соотношений 5'-аминосодержащий носитель-связанный олигонуклеотид / карбокси-содержащая ФМ / DCC / HOBT (1/50/50/100) позволяет получать целевые конъюгаты с низкомолекулярными ФМ с количественной конверсией и не приводит к образованию побочного продукта. Полученные по разработанному протоколу конъюгаты гексадезокситимидилата (13-15) и сенс-цепи siРНК (31-33) были выделены методом препаративного гель-электрофореза и охарактеризованы методом ESI-MS (табл 2.4.1).

Общие выходы (до 25 % в расчете на первое нуклеозидное звено) целевых конъюгатов, полученных после препаративного выделения по Вариантам А, Б, В или Г (рис. 2.4.3), и нативных олигомеров аналогичной длины сопоставимы между собой, что подтверждает эффективность предложенного подхода.

5'-Амино- и 5'-алкинил-модифицированные олигонуклеотиды являются хорошо известной платформой для получения различных конъюгатов (рис. 2.4.3, Вариант А', частный случай) и позволяют дальнейшее взаимодействие с (а) молекулами, содержащими электрофильные центры, например, *N*-(2-гидроксиэтил)феназиний хлоридом с получением конъюгатов (16, 17) (табл. 2.4.1, рис. 2.4.7) или активированные карбоксильные группы,

например, с сукцинимидными эфирами различных соединений, или (б) с азидосодержащими соединениями по реакции азид-алкинового циклоприсоединения или "клик"-реакции, например, с азидом красителя цианинового ряда Cy3 (на примере конъюгата **(18)**), табл. 2.4.1, рис. 2.4.8).

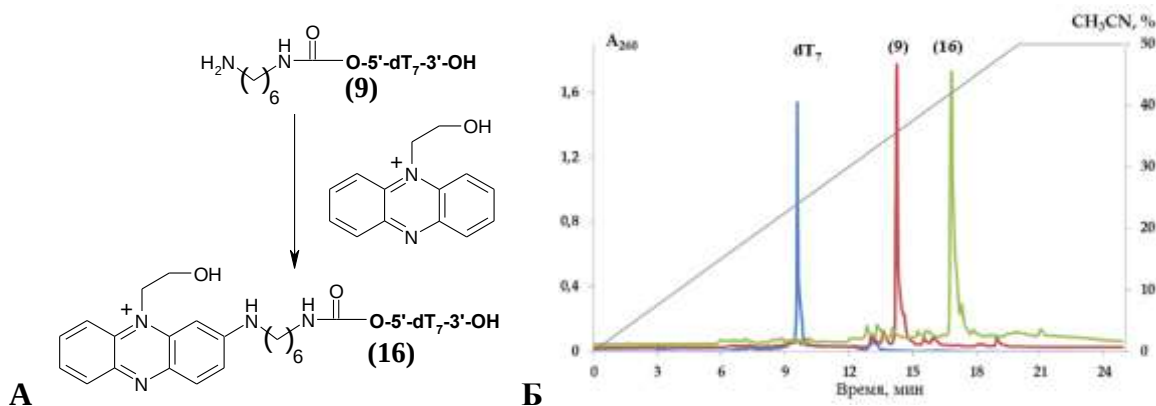


**Рисунок 2.4.7. А** - Схема получения 5'-феназиниевого производного олигонуклеотида dT<sub>7</sub> (**(16)**, табл. 2.4.1). **Б** - Результат анализа реакционных смесей при синтезе dT<sub>7</sub>, 5'-гексаметилендиаминопроизводного dT<sub>7</sub> (**(9)**, табл. 2.4.1) и производного dT<sub>7</sub>, содержащего остаток феназиния на 5'-конце (**(16)**, табл. 2.4.1), методом аналитической ОФ ВЭЖХ. Условия аналитической ОФ-ВЭЖХ см. экспериментальную часть.

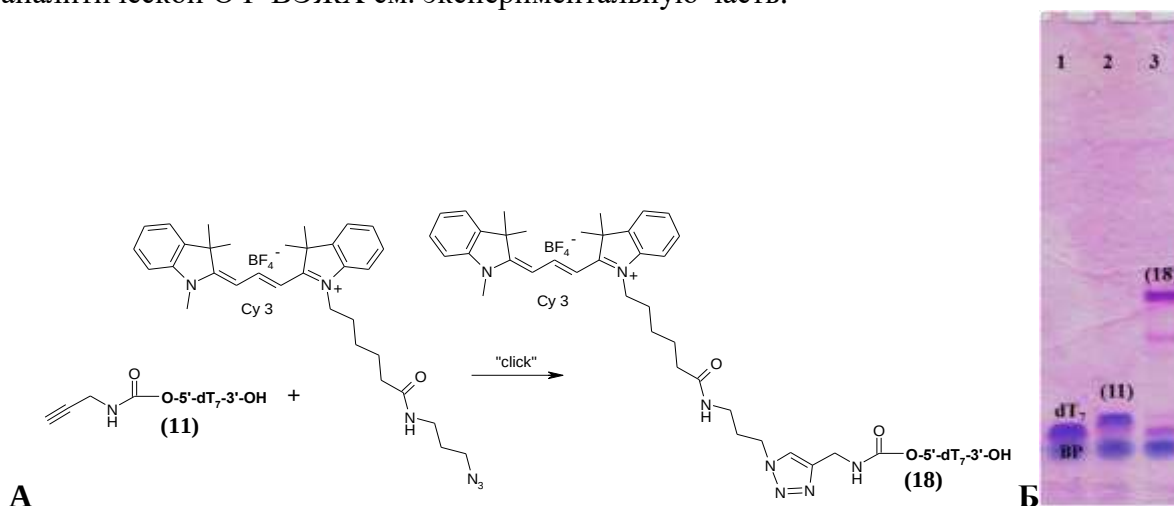


**Рисунок 2.4.8. А** - Схема получения 5'-цианинового производного олигонуклеотида dT<sub>7</sub> (**(18)**, табл. 2.4.1). **Б** - электрофореграмма реакционных смесей олигодезоксирибонуклеотида dT<sub>7</sub> и его производных: дорожка 1 – dT<sub>7</sub>; дорожка 2 – 5'-алкинильное производное dT<sub>7</sub> (**(11)**, табл. 2.4.1); дорожка 3 – 5'-Cy3 конъюгат dT<sub>7</sub> (**(18)**, табл. 2.4.1). Денатурирующий 15 %-ный ПААГ, окрашивание "Stains-all", ВР – бромфеноловый синий.

Вариант с использованием "клик"-химии был применен к получению аптамеров с борным кластером для VNCT-терапии [450–453]. Также был оформлен патент [454] на получение конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих 4 кластера бора на 5'-конце.

Таким образом, предложен инновационный гибкий подход к введению функциональных молекул различных типов (от малых молекул до коротких пептидов) в НК, основанный на модульной стратегии, которая позволяет адаптировать процесс в зависимости от химических свойств конъюгируемых компонент и требуемых терапевтических эффектов. Ключевым преимуществом предложенного подхода является универсальность в выборе линкеров, в том числе стимулчувствительных.

## **2.5. Разработка твердофазного варианта синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с биоактивными функциональными молекулами, введенными посредством кислотолабильной фосфамидной (P-N) связи**

Еще одним представителем класса кислотолабильных связей наряду с гидразонами является фосфамидная P-N-связь.

В литературе описано несколько методов получения конъюгатов нуклеотидов и олигонуклеотидов, содержащих P-N-связь по концевым или межнуклеозидным фосфатам. Одним из самых распространенных и часто используемых вариантов синтеза фосфамидной связи является реакция Аттертона-Тодда - взаимодействие диалкилфосфита с первичным амином в присутствии четыреххлористого углерода [274, 275] или окисление N-фосфонатной связи в присутствии элементарного иода с последующим взаимодействием с аминоксодержащими ФМ как, например, в [276]. Эти реакции используют, вводя модификацию в ходе твердофазного синтеза олигонуклеотидов. Еще одним вариантом получения такого рода модификаций олигонуклеотидов в твердофазном варианте является реакция Штаудингера. Например, в статьях [285, 294] описан метод синтеза конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих фосфамидную связь основанный на реакции Штаудингера между азидалкильным производным пирена, холестерина или додецил- или гексадецилфенилсульфонилазидами и носитель-связанным межнуклеозидным 2-цианозтилфосфитом, который образуется на стадии конденсации в стандартном синтетическом фосфитамидном цикле. Вариант твердофазного фосфотриэфирного подхода к синтезу 5'-амидофосфатных производных олигонуклеотидов ДНК и РНК, был предложен в работе [508]. 5'-Арилфосфодиэфирное активное производное вводили в защищенный олигонуклеотид на носителе и далее проводили замещение азольной части на алкинамин. Введение ФМ на 5'- или 3'-конец олигонуклеотида через P-N-связь можно также проводить и в полностью деблокированный олигонуклеотид, активируя остаток 5'/3'-концевой фосфорной кислоты 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом в присутствии 1-метилимидазола или используя окислительно-восстановительную пару трифенилфосфин/2,2'-дипиридилдисульфид ( $\text{Ph}_3\text{P}/(\text{PyS})_2$ ) [83, 265, 266]. Именно последний вариант был взят за основу для разработки описываемого подхода.

В качестве аминоксодержащих ФМ был использован ряд коммерчески доступных соединений (олеиламин, 1,6-диаминогексан, 3-аминопропан-1-ол, пропаргиламин, пиренметиламин), а также аминоксодержащие производные холестерина (схему синтеза см. рис. 2.4.2.Г, n=6) и *p*-анисовой кислоты (рис. 2.5.1). Карбоксильную группу *p*-анисовой кислоты

активировали  $N,N'$ -дициклогексилкарбодиимидом в присутствии 1-гидроксибензотриазола (стадия *i*) по аналогии с [509]. Полученное активированное производное без очистки вводили в реакцию с моно- $N$ -Вос-защищенным гексаметилендиамином (стадия *ii*) с последующим удалением Вос-защитной группы и получением целевого  $N$ -(6-аминогексил)-4-метоксибензамида (стадия *iii*). Строение соединений после хроматографического выделения было подтверждено методом  $^1\text{H}$ -ЯМР спектроскопии.

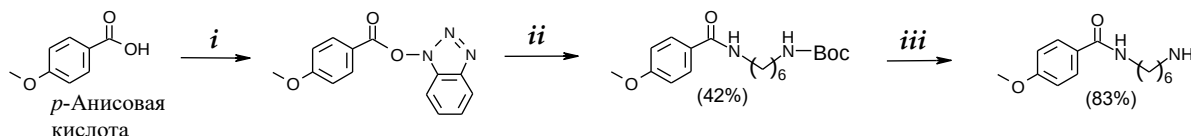


**Рисунок 2.5.1.** Схема синтеза  $N$ -(6-аминогексил)-4-метоксибензамида Реагенты: *i*)  $N,N'$ -дициклогексилкарбодиимид, 1-гидроксибензотриазол,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ , комнатная температура (к.т.); *ii*) моно- $N$ -Вос-защищенный гексаметилендиамин,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ , к.т.; *iii*) муравьиная кислота, к.т. Вос – *трет*-бутилоксикарбонил. Выходы соединений представлены в скобках.

Оптимизацию условий синтеза конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих фосфамидную связь, проводили на модельном гептадезокситимидилате (dT<sub>7</sub>). В качестве целевой последовательности была выбрана siРНК, направленная к мРНК гена MDR1 (siDmS). Также в литературе показано, что использование siРНК, в которых сенс-цепь разделена на два фрагмента (sisDmS), является перспективным подходом к подавлению экспрессии генов [510].

Основная схема предложенного твердофазного подхода включает в себя шесть стадий (рис. 2.5.2): 1) введение фосфатной группы на 5'-конец олигонуклеотидной цепи в автоматическом варианте, 2) удаление диметокситритильной группы, 3) деблокирование концевого и межнуклеозидных фосфатов, 4) активация 5'-фосфатной группы защищенного носительсвязанного олигонуклеотида окислительно-восстановительной парой  $\text{Ph}_3\text{P}/(\text{PyS})_2$  с последующим добавлением 4-диметиламинопиридина (DMAP) и образованием 5'-DMAP-интермедиата, 5) взаимодействие этого интермедиата с аминокислотой ФМ, 6) полное деблокирование полученного 5'-конъюгата {6}.

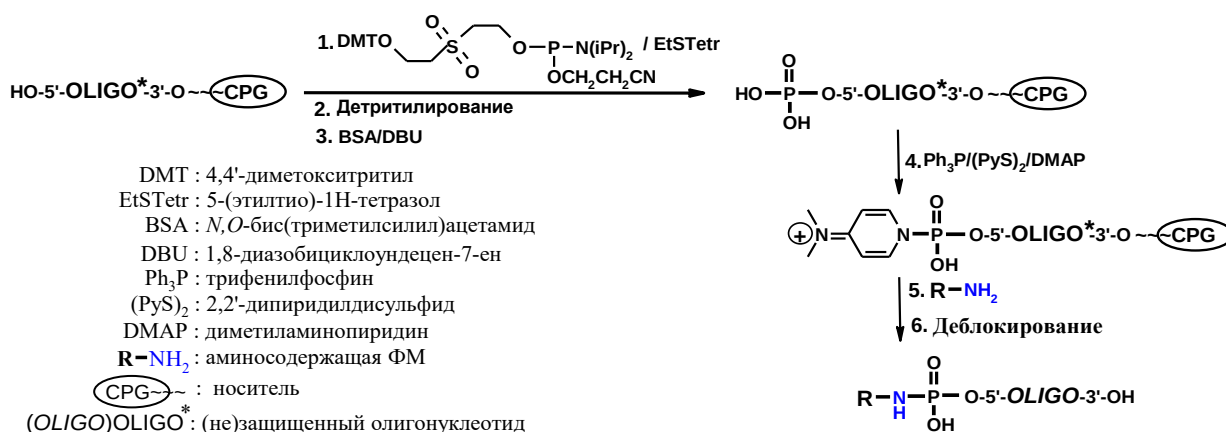


**Рисунок 2.5.2.** Общая схема синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих кислотолабильную фосфамидную связь.

После введения 5'-фосфатной группировки на последнем цикле автоматического синтеза необходимо провести ее деблокирование (удалить остаток сульфонилдиэтанола и цианоэтильную защитную группу). Для этого последовательно использовали *N,O*-бис(триметилсилил)ацетамид (BSA) и 1,8-дiazобисциклоундец-7-ен (DBU) по аналогии с [264]. В работе [511] было показано, что BSA фиксирует связь между олигонуклеотидом и носителем, а DBU мягко удаляет цианоэтильные защитные группы с фосфатов, оставляя при этом олигонуклеотид присоединенным к носителю.

Ранее [512] было показано, что при использовании реагентов  $\text{Ph}_3\text{P}/(\text{PyS})_2/\text{DMAP}$  для активации 5'-фосфата полностью деблокированного олигонуклеотида (метод "в растворе") возможно образование 5',5'-биспиреновых конъюгатов. В ходе данного исследования была поставлена задача по синтезу 5'-моно-конъюгатов сенс-цепи в виде рибо-олигонуклеотида (siDmS), и 5'-моно-конъюгатов фрагмента сенс-цепи (sisiDmS), в виде 2'-*O*-метилированного олигонуклеотида. Поэтому для оптимизации условий твердофазного получения моноконъюгатов в качестве ФМ использовали аминокислотное производное пирена. Также методом "в растворе" (см. п.3.3.6.1.а) были получены моно- и бис- 5'-пиренметиаминовые конъюгаты dT<sub>7</sub> как контрольные образцы для мониторинга их подвижности в ПААГ при оптимизации условий синтеза и деблокирования.

На примере синтеза конъюгатов модельного олигонуклеотида dT<sub>7</sub> с пиренметиамином были опробованы два варианта поведения реакции: "без удаления" и "с удалением" реагентов для активации 5'-фосфата. После деблокирования проводили электрофоретический анализ полученных реакционных смесей. Для первого варианта было показано, что в реакционной смеси в основном присутствует 5'-биспиренильное производное и наблюдаются следовые количества 5'-монопиренильного производного dT<sub>7</sub> (рис. 2.5.3.А, дорожка 12). В случае варианта "с удалением" активирующих реагентов и

трехкратной промывкой носителя с присоединенным олигонуклеотидом перед добавлением аминоксодержащей ФМ в реакционной смеси в основном присутствует 5'-монопиренильное производное (рис. 2.5.3.А, дорожка **10**). Показано, что при использовании ряда стандартных условий щелочного деблокирования для отщепления 5'-монопиренильного конъюгата dT<sub>7</sub> от носителя и удаления защитных групп (0.05 М раствор поташа в метаноле, аммиак, метиламин или их смесь АМА) при любом температурном режиме Р-Н-связь в составе конъюгата стабильна. Также было показано, что обработка конъюгатов, содержащих фосфамидную связь, стандартной смесью *N*-метил-2-пирролидинон/(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N/(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N·3HF (1.5/0.7/1.0) для удаления 2'-*O*-TBDMS защитных групп приводит к деструкции этой связи с образованием исходного 5'-фосфатсодержащего олигонуклеотида. При использовании альтернативных условий 2'-деблокирования - обработка 1М раствором тетрабутиламмоний фторида в тетрагидрофуране с последующей нейтрализацией триэтиламмоний ацетатным буфером (pH 7.0) и обессоливанием на С18 картридже (по аналогии с [508]) - Р-Н-связь остается интактной.

В оптимизированных условиях был проведен синтез 5'-моно-конъюгатов модельного олигонуклеотида dT<sub>7</sub>, сенс-цепи в виде рибо-олигонуклеотида (siDmS) и половины сенс-цепи в виде метилированного олигонуклеотида (sisiDmS) (табл. 2.5.1).

На рисунке 2.5.3 представлен электрофоретический анализ реакционных смесей dT<sub>7</sub>, sisiDmS и siDmS с различными ФМ. В ряде случаев в реакционных смесях при синтезе конъюгатов и производных модельного dT<sub>7</sub> наблюдали продукт с несколько меньшей электрофоретической подвижностью, чем исходный 5'-фосфатсодержащий олигонуклеотид (рис. 2.5.3.А). Было сделано предположение, что это побочный продукт, содержащий остаток метиламина, введенный по 5'-фосфату. Для проверки этой гипотезы носитель-связанный 5'-фосфатсодержащий dT<sub>7</sub>, активировали смесью Ph<sub>3</sub>P/(PyS)<sub>2</sub>/DMAP, промывали и сразу обрабатывали раствором метиламина. При этом происходит деблокирование и отщепление олигонуклеотида от носителя с одновременным "встраиванием" метиламина по 5'-концевому фосфату (рис. 2.5.3.А, дорожка **9**). Побочный продукт был выделен методом препаративного гель-электрофореза, охарактеризован методом ESI-MS и идентифицирован как 5'-метиламинсодержащий dT<sub>7</sub> (CH<sub>3</sub>-NH-p-dT<sub>7</sub>: М.теор. 2161.1/М.эксп. 2159.7). При синтезе конъюгатов sisiDmS и siDmS полосы, соответствующее побочному продукту, не наблюдали. Возможно, с увеличением длины исходный 5'-фосфатсодержащий олигонуклеотид и его производное с метиламином не отличаются по подвижности при анализе реакционных смесей методом аналитического гель-электрофореза.

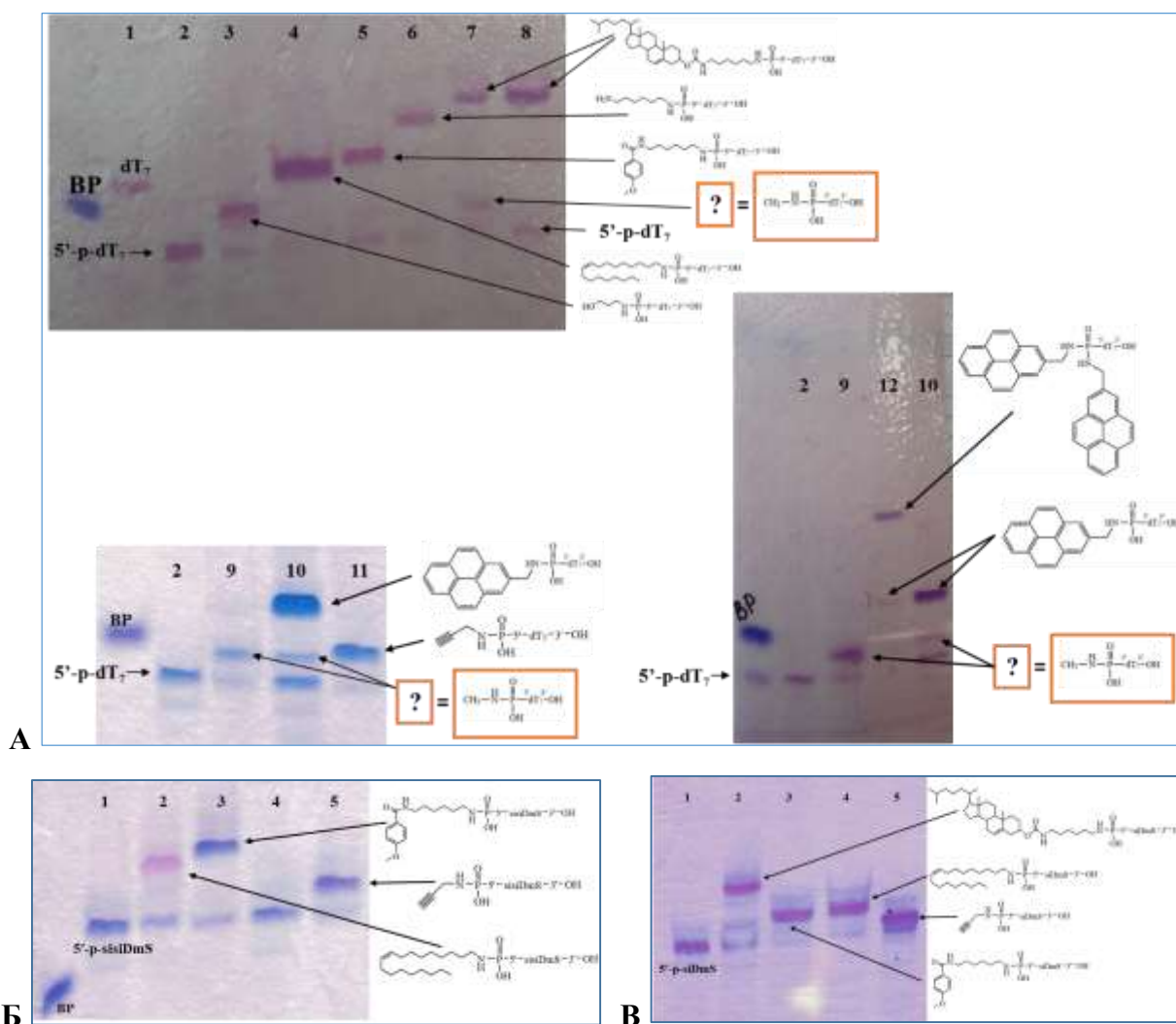


**Рисунок 2.5.3.** Анализ реакционных смесей олигонуклеотидов и их конъюгатов в ПААГ. **(А)** дорожка 1 - dT<sub>7</sub>, дорожка 2 - 5'-p-dT<sub>7</sub>, дорожка 3 - HO-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-p-dT<sub>7</sub> (6), дорожка 4 - Oleyl-NH-p-dT<sub>7</sub> (3), дорожка 5 - MB-L<sub>6</sub>-NH-p-dT<sub>7</sub> (1), дорожка 6 - NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-p-dT<sub>7</sub> (7), дорожки 7 и 8 - Chol-C(O)-L<sub>6</sub>-NH-p-dT<sub>7</sub> (2), дорожка 9 - CH<sub>3</sub>-NH-p-dT<sub>7</sub> (9), дорожка 10 - Pyr-CH<sub>2</sub>-NH-p-dT<sub>7</sub> (5); дорожка 11 - CH≡C-CH<sub>2</sub>-NH-p-dT<sub>7</sub> (4); дорожка 12 - (Pyr-CH<sub>2</sub>-NH)<sub>2</sub>-p-dT<sub>7</sub>. **(Б)** дорожки 1 и 4 - 5'-p-siDmS, дорожка 2 - Oleyl-NH-p-siDmS (11), дорожка 3 - MB-L<sub>6</sub>-NH-p-siDmS (12), дорожка 5 - CH≡C-CH<sub>2</sub>-NH-p-siDmS (13); **(В)** дорожка 1 - 5'-p-siDmS, дорожка 2 - Chol-C(O)-L<sub>6</sub>-NH-p-siDmS (15), дорожка 3 - MB-L<sub>6</sub>-NH-p-siDmS (14), дорожка 4 - Oleyl-NH-p-siDmS (16), дорожка 5 - CH≡C-CH<sub>2</sub>-NH-p-siDmS (17). dT<sub>7</sub> = 5'-d(TTTTTTT); 5'-p-dT<sub>7</sub> = 5'-p-d(TTTTTTT); 5'-p-siDmS = 5'-p-G<sup>m</sup>G<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>U<sup>m</sup>G<sup>m</sup>A<sup>m</sup>C<sup>m</sup>A<sup>m</sup>; 5'-p-siDmS = 5'-p-GGCUUGACAAGUUGUAUAUGG<sup>m</sup>; -p-, -P(O)(OH)-; d(N), дезоксирибонуклеотиды; N<sup>m</sup>, 2'-О-метилрибонуклеотиды; N, рибонуклеотиды (табл. 2.5.1). Денатурирующий 15 %-ый ПААГ, окрашивание "Stains-all", BP – бромфеноловый синий.

Полученные 5'-конъюгаты выделяли методом препаративного гель-электрофореза. Общие выходы целевых конъюгатов после препаративного выделения (15-24 % в расчете на первое нуклеозидное звено) и нативных олигомеров аналогичной длины сопоставимы между собой, что подтверждает эффективность предложенного метода. Их гомогенность подтверждали методом аналитического гель-электрофореза в денатурирующих условиях с

последующим подтверждением структуры методом масс-спектрометрии. В ряде случаев при проведении масс-анализа происходит деструкция Р-N-связи.

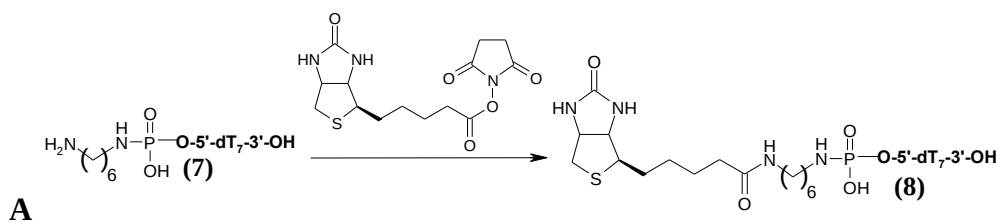
**Таблица 2.5.1.** Структуры 5'-конъюгатов олигонуклеотидов

| N  | Конъюгат, 5'-3'                                                                                                                                                           | Молекуляр. масса |                    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------|
|    |                                                                                                                                                                           | Теор.            | Эксп. <sup>1</sup> |
| 1  | MB-NH- <i>L</i> <sub>6</sub> -NH-p-d(TTTTTTT)                                                                                                                             | 2379.7           | 2378.5             |
| 2  | Chol-C(O)-NH- <i>L</i> <sub>6</sub> -NH-p-d(TTTTTTT)                                                                                                                      | 2658.2           | 2656.5             |
| 3  | Oleyl-NH-p-d(TTTTTTT)                                                                                                                                                     | 2396.8           | 2395.5             |
| 4  | CH≡C-CH <sub>2</sub> -NH-p-d(TTTTTTT)                                                                                                                                     | 2184.4           | 2183.0             |
| 5  | Pyr-CH <sub>2</sub> -NH-p-d(TTTTTTT)                                                                                                                                      | 2360.3           | 2358.9             |
| 6  | HOL <sub>3</sub> -NH-p-d(TTTTTTT)                                                                                                                                         | 2204.4           | 2203.2             |
| 7  | NH <sub>2</sub> <i>L</i> <sub>6</sub> -NH-p-d(TTTTTTT)                                                                                                                    | 2245.6           | 2244.0             |
| 8  | Biot-NH <i>L</i> <sub>6</sub> -NH-p-d(TTTTTTT)                                                                                                                            | 2471.6           | 2470.2             |
| 9  | Oleyl-NH-p-G <sup>m</sup> G <sup>m</sup> C <sup>m</sup> U <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup>                         | 3310.3           | 3309.0             |
| 10 | MB-NH- <i>L</i> <sub>6</sub> -NH-p-G <sup>m</sup> G <sup>m</sup> C <sup>m</sup> U <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup> | 3293.3           | 3291.3             |
| 11 | CH≡C-CH <sub>2</sub> -NH-p-G <sup>m</sup> G <sup>m</sup> C <sup>m</sup> U <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup>         | 3098.1           | 3096.2             |
| 12 | FAM-click-CH <sub>2</sub> -NH-p-G <sup>m</sup> G <sup>m</sup> C <sup>m</sup> U <sup>m</sup> U <sup>m</sup> G <sup>m</sup> A <sup>m</sup> C <sup>m</sup> A <sup>m</sup>    | 3555.5           | 3554.5             |
| 13 | MB-NH- <i>L</i> <sub>6</sub> -NH-p-GGCUUGACAAGUUGUAUAUGG <sup>m</sup>                                                                                                     | 7080.4           | 7080.28            |
| 14 | Oleyl-NH-p-GGCUUGACAAGUUGUAUAUGG <sup>m</sup>                                                                                                                             | 7097.6           | 7097.2             |
| 15 | Chol-C(O)-NH- <i>L</i> <sub>6</sub> -NH-p-GGCUUGACAAGUUGUAUAUGG <sup>m</sup>                                                                                              | 7358.9           | 7358.98            |
| 16 | CH≡C-CH <sub>2</sub> -NH-p-GGCUUGACAAGUUGUAUAUGG <sup>m</sup>                                                                                                             | 6885.1           | 6886.4             |
| 17 | GalNAc-click-CH <sub>2</sub> -NH-p-GGCUUGACAAGUUGUAUAUGG <sup>m</sup>                                                                                                     | 7263.7           | 7263.87            |

<sup>1</sup> По данным LC-ESI- и MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Chol- – остаток холестерина; Oleyl-NH- – остаток олеиламина; Pyr- – остаток пирена; MB- – остаток *p*-анисовой (4-метоксибензойной) кислоты; CH≡C-CH<sub>2</sub>-NH- – остаток пропаргиламина; *L*<sub>3</sub> – -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>; *L*<sub>6</sub> – -(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>; Biot- – остаток биотина; FAM-click – краситель FAM с 1,2,3-триазольным линкером; GalNAc-click – остаток *N*-ацетилгалактозамина с 1,2,3-триазольным линкером (клик-реакция); N – рибонуклеотид; N<sup>m</sup> – 2'-*O*-метилрибонуклеотид; d(N) – дезоксирибонуклеотид.

Предлагаемый подход достаточно универсален и позволяет получать 5'-алкин- и 5'-амино-модифицированные олигонуклеотиды для проведения дальнейшей функционализации азид-содержащими соединениями по биоортогональной реакции азид-алкинового циклоприсоединения (метод "клик"-химии) или с использованием метода NHS-эфиров, для введения молекул, активированных по карбоксильной группе.

Так, аминоксодержащий олигонуклеотид (7) модифицировали введением остатка биотина с получением конъюгата (8) (табл. 2.5.1, рис. 2.5.4).



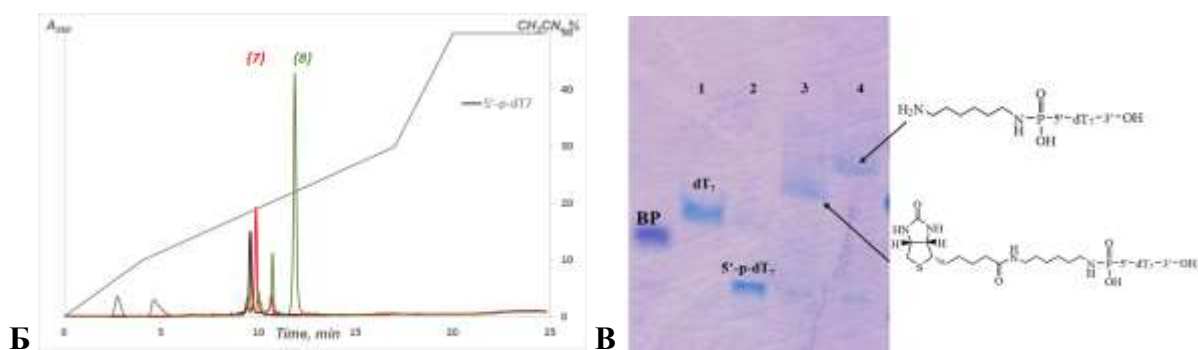
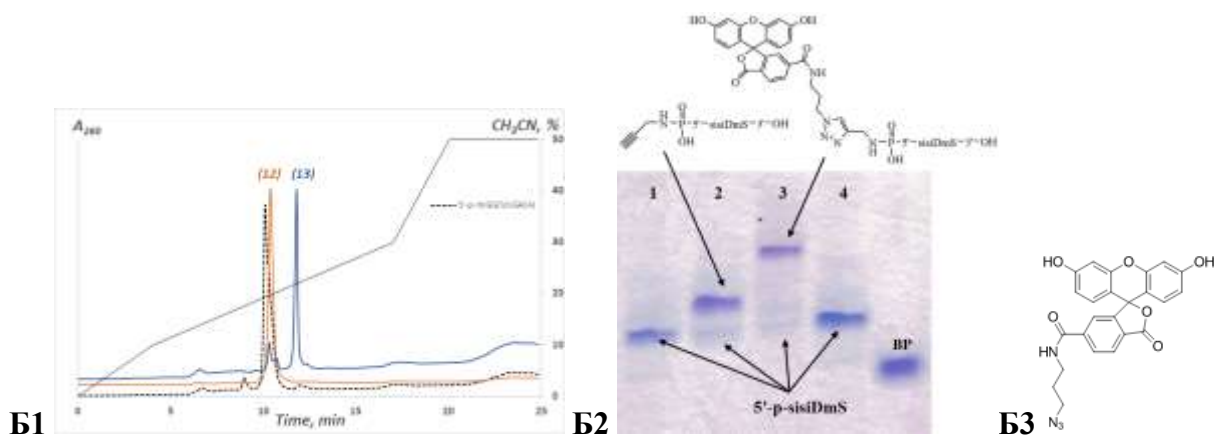
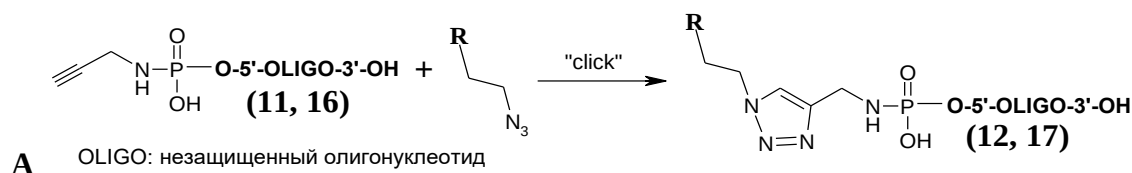


**Рисунок 2.5.4.** Функционализация 5'-амино-модифицированного олигонуклеотида (7) *N*-гидроксисукцинимидным эфиром биотина. **(А)** Схема синтеза биотинового производного 5'-p-dT<sub>7</sub> (8). **(Б)** ОФ ВЭЖХ-анализ реакционных смесей исходного олигонуклеотида 5'-p-dT<sub>7</sub> и конъюгатов (7) и (8). Степень превращения (7) в (8) составила 82 %. Условия аналитической ОФ-ВЭЖХ см. экспериментальную часть. **(В)** Анализ реакционных смесей 5'-p-dT<sub>7</sub> и конъюгатов (7) и (8): дорожка 1 - деблокированные реакционные смеси олигонуклеотида dT<sub>7</sub>; дорожка 2 - деблокированные реакционные смеси 5'-p-dT<sub>7</sub> олигонуклеотида; дорожка 3 - реакционная смесь после биотина-NHS присоединение к производному (7) в растворе для получения конъюгата (8); дорожка 4 – деблокированная реакционная смесь после твердофазного присоединения 1,6-диаминогексана к активированному 5'-p-dT<sub>7</sub> для получения производного (7). 5'-p-dT<sub>7</sub> = 5'-p-d(TTTT<sub>7</sub>); -p-, -P(O)(OH)-; d(N), дезоксирибонуклеотиды (табл. 2.5.1). Денатурирующий 15 %-ый ПААГ, окрашивание "Stains-all", BP – бромфеноловый синий.

Пропаргиламин-содержащие олигонуклеотиды (11, 16) эффективно реагировали с азидом флуоресцентной метки или остатка *N*-ацетилгалактозамина – транспортного лиганда, который уже используют при создании терапевтических препаратов, с получением конъюгатов (12) и (17) (табл. 2.5.1, рис. 2.5.5).



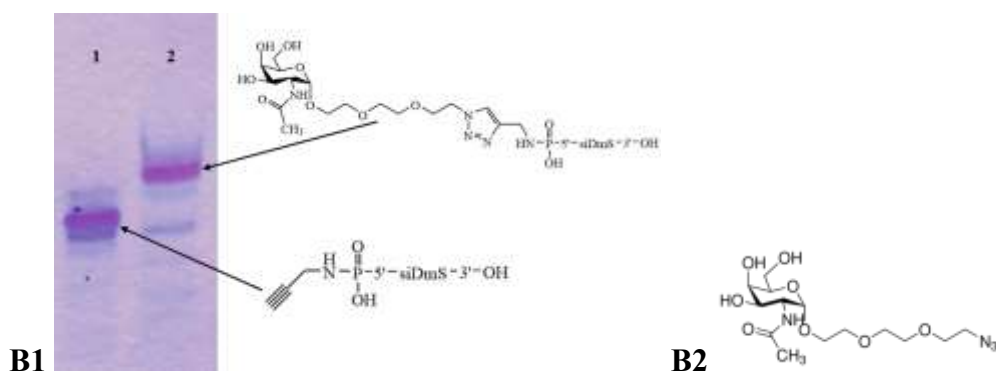
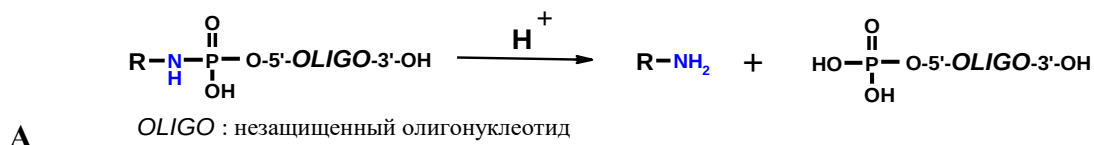


**Рисунок 2.5.5.** Присоединение азидов FAM или α-GalNAc к 5'-алкин-модифицированному олигонуклеотиду (11) или (16) с использованием реакции CuAAC. (А) Схема синтеза конъюгатов (12) и (16) с использованием "клик"-реакции с 5'-пропаргиламин-модифицированными олигонуклеотидами (11) и (16), соответственно. (Б1) ОФ ВЭЖХ-анализ реакционных смесей исходного олигонуклеотида 5'-p-siDmS и конъюгатов (12) и (16). Степень превращения (11) в (12) составила 87 %. Условия аналитической ОФ-ВЭЖХ см. экспериментальную часть, пунктиром обозначен исходный олигонуклеотид 5'-p-siDmS. (Б2) Анализ реакционных смесей при синтезе 5'-p-siDmS и конъюгатов (11) и (12): дорожки 1 и 4 - деблокированная реакционная смесь олигонуклеотида 5'-p-siDmS; дорожка 2 - деблокированная реакционная смесь после твердофазного присоединения пропаргиламина к активированному 5'-p-siDmS с получением производного (11); дорожка 3 - реакционная смесь после присоединения FAM-азиды к производному (11) с использованием "клик"-реакции в растворе для получения конъюгата (12). (Б3) Структура FAM-азиды. (В1) Анализ реакционных смесей конъюгатов (16) и (17): дорожка 1 - деблокированная реакционная смесь после твердофазного присоединения пропаргиламина к активированному 5'-p-siDmS с получением производного (16); дорожка 2 – реакционная смесь после присоединения α-GalNAc-PEG3-азиды к производному (16) с использованием "клик"-реакции в растворе для получения конъюгата (17). (В2) Структура α-GalNAc-PEG3-азиды. 5'-p-siDmS = 5'-p-G<sup>m</sup>G<sup>m</sup>C<sup>m</sup>U<sup>m</sup>U<sup>m</sup>G<sup>m</sup>A<sup>m</sup>C<sup>m</sup>A<sup>m</sup>; 5'-p-siDmS = 5'-p-GGCUGACAAGUUGUAUAUGG<sup>m</sup>; -p-, -P(O)(OH)-; N<sup>m</sup>, 2'-О-метилрибонуклеотиды; N, рибонуклеотиды (табл. 2.5.1). Денатурирующий 15 %-ный ПААГ, окрашивание "Stains-all", BP – бромфеноловый синий.

В ряде работ (например, в статье [265]) было показано, что фосфамидная связь между олигонуклеотидом и полиэтиленгликолем полностью расщеплялась при 37°C в течение 5 ч при pH 4.7. Была исследована стабильность фосфамидной связи в составе синтезированных конъюгатов при различных pH. Схема гидролиза приведена на рисунке 2.5.6.А. Ранее полученные 5'-конъюгаты siPHK с N-(6-аминогексил)-4-метоксибензамидом, олеиламином, холестерил-6-аминогексилкарбаматом и GalNAc (13-15, 17, табл. 2.5.1) выдерживали в ацетатном буфере с pH 6.0, 5.2 и 4.5 при 37°C в течение 1, 2, 4, 6 и 24 ч.



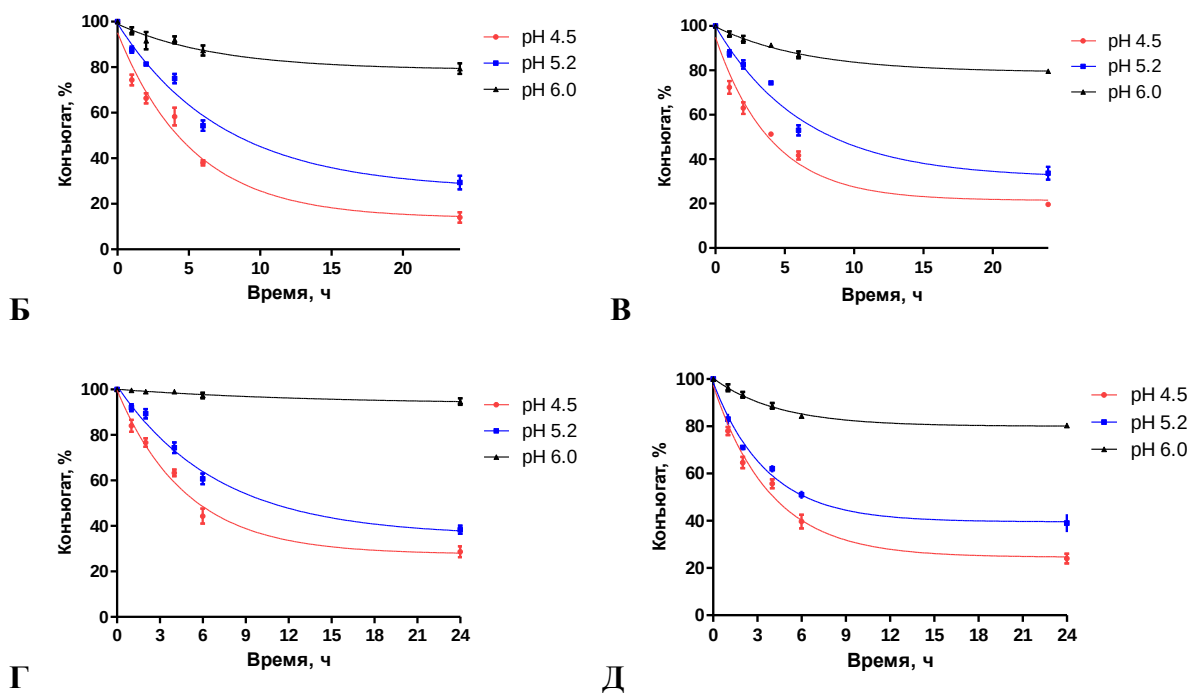


**Рисунок 2.5.6.** Схема гидролиза (А) и кинетические кривые расщепления Р-N-связи в конъюгатах (13-15, 17, табл. 2.4.1) с *p*-анисовой кислотой (Б), холестерином (В), олеилом (Г) и GalNAc (Д) при различных значениях pH. Количественное определение полноразмерного конъюгата (% , ось Y) в зависимости от pH и времени инкубации. Результаты представляют собой среднее значение ( $\pm$ SD) по результатам трех независимых экспериментов.

На представленных графиках (рис. 2.5.6) видно, что за 24 ч при pH 6.0 деструкция Р-N-связи не превышает 20 %, а при  $\text{pH} \leq 5.2$  более 50 % олигонуклеотидного материала находится в исходной 5'-фосфорилированной форме. Наибольшая степень деструкции Р-N-связи при pH 4.5 наблюдалась для конъюгата siРНК с *N*-(6-аминогексил)-4-метоксибензамидом (около 85 % за 24 ч, рис. 2.5.6.Б).

\*\*\*

Обобщая данные, полученные в п.п. 2.3 и 2.4, можно заключить, что использование функциональных молекул, содержащих алифатическую аминогруппу, в рамках двух предложенных подходов открывает путь к созданию широкого спектра 5'-конъюгатов олигонуклеотидов в которых оба компонента сочетаются через линкеры, равные по длине, но принципиально различающиеся по стабильности.

Эффективность конъюгирования для всех подходов, описанных в п.п. 2.2-2.5, близка к количественной. Показано, что после препаративного выделения выходы целевых 5'-

конъюгатов олигонуклеотидов и нативных олигомеров аналогичной длины сопоставимы между собой, что подтверждает эффективность предложенных методов. Их гомогенность после препаративного выделения подтверждали методом аналитического гелевого электрофореза в денатурирующих условиях с последующим подтверждением структуры с помощью LC-ESI- и MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

## 2.6. Использование НК и/или их производных и конъюгатов, полученных по разработанным протоколам и подходам, в целях фундаментальной науки другими научными группами

Конъюгаты олигонуклеотидов с различными функциональными молекулами являются универсальной платформой для решения широкого круга задач в молекулярной биологии, биомедицине и нанотехнологии. Их применение позволяет не только тонко регулировать свойства самих нуклеиновых кислот, но и исследовать фундаментальные процессы, связанные со структурой и функцией клеточных мишеней. Полученные в лаборатории по разработанным протоколам и методам, предложенным в вышеизложенной работе, олигорибонуклеотиды, их аналоги, производные и конъюгаты были использованы для изучения структуры и функции рибосом, регуляции экспрессии генов, поиска терапевтических мишеней, носителей, создания диагностических платформ и систем геномного редактирования.

Так, в работах Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН фокус исследований был сосредоточен на нативных и модифицированных по углеводо-фосфатному остову антисенс олигонуклеотидах, малых интерферирующих и иммуностимулирующих РНК (siРНК, исРНК), а также их производных и конъюгатах. В частности, при использовании конструкций, несущих модификации остова в сочетании с единичными функциональными молекулами (или их комбинацией) на основе красителей и липофильных или пептидных фрагментов, введенных через линкеры различной структуры и стабильности были получены следующие результаты (*{3,10,12,13,17,19-21,24-27}\**, [513–526]): (i) разработан алгоритм адресной химической модификации siРНК, позволяющий конструировать siРНК, обладающие повышенной нуклеазоустойчивостью. Было показано, что эффективность siРНК можно заметно повысить, используя подход, основанный на картировании чувствительных сайтов в сыворотке и точечном введении 2'-O-метильных замен. Такая стратегия резко увеличивала нуклеазоустойчивость siРНК, почти не снижая их сайленсинг-активность. Особенно важно, что полная защита всех нуклеазочувствительных участков давала более длительный эффект, чем частичная или случайная модификация. Дополнительно было установлено, что не только модификации, но и структура дуплекса влияет на результат — введение несовпадений на 3'-конце смысловой цепи усиливало термодинамическую асимметрию и помогало повысить активность siРНК.

---

\*здесь и далее в фигурных скобках курсивом указаны ссылки на работы, в которых изложены основные результаты данной диссертации, приведенные в заключительном разделе.

В случае anti-MDR1 fork-siRNA сочетание структурных изменений и 2'-O-метильной защиты обеспечивало высокую стабильность и длительное подавление экспрессии гена - до 12–15 дней после однократной трансфекции;

(ii) изучена иммуностимулирующая активность нуклеиновых кислот и возможность их применения в рамках противоопухолевой и противовирусной терапии. Показано, что короткие двуцепочечные иммуностимулирующие РНК (исРНК) определенной последовательности и длиной 19 нуклеотидов с трехнуклеотидными выступами на 3'-конце вызывают значительное повышение уровня интерферонов I типа в сыворотке крови мышей C57BL, что подтверждает иммуностимулирующие и антипролиферативные свойства исРНК и делает их перспективными для терапии онкологических и вирусных заболеваний. Ключевым аспектом исследования было изучение влияния химических модификаций и трансфекционных агентов на свойства исРНК. Эффект химических модификаций исРНК (включая 2'-фтор, 2'-O-метил, фосфоротиоат, холестерин и концевой амин) на интерферон-индуцирующую и антипролиферативную активность варьируется и определяется тремя ключевыми факторами: типом введенной модификации и ее позицией в нуклеотидной последовательности, что позволяет получить исРНК с усиленной интерферон-индуцирующей или противоопухолевой функцией, что было продемонстрировано по ингибированию роста меланомы B16 у мышей линии C57BL/6;

(iii) проведен большой цикл работ, посвященный исследованию влияния структуры функционализированных (транспортные молекулы/пептиды/красители) нативных и модифицированных по углеводо-фосфатному остову siРНК, их димерных и тримерных форм на их доставку, механизм действия и биологическую активность, в т.ч. при воспалении и опухолевой прогрессии. Присоединение остатка холестерина улучшало клеточное проникновение, накопление в тканях и биораспределение *in vivo*, включая печень, опухоли и клетки крови. При этом эффективность сильно зависела от длины линкера, соединяющего холестерин с siРНК и типа клеток. Поскольку накопление не всегда обеспечивало биологическую активность и часть конъюгатов задерживалась вне цитоплазмы, были предложены более сложные конструкции: супрамолекулярные тримерные формы, направленные на один или несколько генов, а также холестерин-содержащие антисмысловые конкатемерные комплексы. Такие комплексы лучше накапливались в опухолях или печени и могли одновременно подавлять несколько генов-мишеней, включая MDR1. Отдельная серия исследований была направлена на детальное изучение селективного ингибитора экспрессии Р-гликопротеина - белка, играющего

ключевую роль в лекарственной устойчивости опухолевых клеток и определяющего фармакокинетику многих препаратов.

В работах Лаборатории структуры и функции рибосом ИХБФМ СО РАН с помощью малых интерферирующих РНК (siРНК) и аналогов мРНК, содержащих спиновые метки (в сотрудничестве с Институтом органической химии СО РАН и МТЦ СО РАН) или апурин/апириимидиновые (AP) сайты, были получены данные, важные для понимания механизмов различных стадий трансляции и архитектуры комплексов рибосом человека и неканонических функций рибосомных белков ({7,15,18,22}, [397, 527–530]):

(i) методами DEER/PELDOR спектроскопии со спиновыми метками, введенными в различные места мРНК-аналогов, проведен анализ пространственной организации мРНК в рибосомных комплексах. Измеренные расстояния между метками хорошо согласуются со структурными моделями рибосомных комплексов и показывают их динамику, демонстрируя, что мРНК сохраняет заметную конформационную гибкость как в канале рибосомы, так и за его пределами. При этом подход с использованием спиновых меток, введенных по основаниям РНК, оказался более информативным, чем подход с использованием меток на углеводо-фосфатном остове, однако оба подхода в совокупности дают более полное представление о строении исследуемого комплекса;

(ii) проведен скрининг белкового окружения мРНК с 3'-стороны от кодона в Р-сайте рибосомы - с помощью набора различных реакционноспособных РНК-производных было выявлено участие рибосомных белков uS3 и uS19 в организации этой области и впервые установлено вовлечение эукариот-специфичного хвоста белка uS19 в декодировании кодонов мРНК у эукариот;

(iii) с использованием синтетических мРНК-аналогов, содержащих AP-сайты, изучены особенности взаимодействия мРНК, имеющих повреждения, с рибосомами человека, при расположении в районе участка входа в мРНК-связывающий канал рибосомы. Показано, что участок рибосомного белка uS3, включающий аминокислотные остатки 55–64, способен связываться с мРНК, содержащими AP-сайты, что указывает на его возможную роль не только в распознавании мРНК, но и в контроле ее качества при трансляции;

(iv) с использованием специфических siРНК было показано, что нарушение баланса рибосомных белков eL38 и eL29 у млекопитающих приводит к значительной перестройке транскриптома и изменению экспрессии большого числа генов.

В работах лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН (в сотрудничестве с лабораториями ИХБФМ СО РАН (Новосибирск), НИИФКИ (Новосибирск), ИЦиГ СО РАН (Новосибирск), Институтом биофизики СО РАН (Красноярск), Институтом Молекулярной

Генетики, Микробиологии и Геномики (г.Страсбург, Франция)) были проведены исследования:

- (i) по разработке направляющих РНК, модифицированных фоторасщепляемыми линкерами (циклические crRNA, sgRNA) и позволяющих переключать нуклеазу Cas9 при УФ-облучении, обеспечивая тем самым временной контроль редактирования в модельных системах ({11}, [439–443]);
- (ii) по фотоактивируемому ингибированию экспрессии гена EGFP в клетках HEK293FT с использованием siРНК, содержащих объёмные лиганды, такие как холестерин и трилейцин введенные через фоторасщепляемый линкер по 5'-концу смысловой цепи [444, 445];
- (iii) по использованию модифицированных по углеводо-фосфатному остову siРНК в составе нанокомпозитов для ингибирования высокопатогенного вируса гриппа A/H5N1 {2};
- (iv) по исследованию влияния анти-EGFR siРНК, анти-EGFR моноклонального антитела цетуксимаба и ингибитора тирозинкиназы AG1478 на диссоциированные и сфероидные клетки MCF7-EGFR {4};
- (v) по доставке олигонуклеотидов поликатионными дендримерами, формирующими низкоцитотоксичные комплексы с нативными/2'-модифицированными и FAM-меченными miРНК/siРНК, эффективно проникающими в иммунокомпетентные клетки и клетки глиобластомы и влияющие на жизнеспособность, а также на экспрессию маркеров PD-L1, TIM-3 и CD47 ({5}, [531–533]);
- (vi) по изучению радиозащитного эффекта двухцепочечной РНК, связанного с ее попаданием в гемопоэтические стволовые клетки {14};
- (vii) по адресной доставке кластеров бора 2'-F-РНК/ДНК-аптамерами для бор-нейтрон-захватной терапии [450–454];
- (viii) по изучению модифицированных аптамеров к белкам TNF- $\alpha$  и DKK-1 продемонстрировавшим диагностический и терапевтический потенциал [534–536];
- (ix) по разработке и изучению варианта  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемого фотобелка обелина в качестве мишени для отбора РНК-аптамеров *in vitro* [537];
- (x) по доставке, импорту, а также влиянию модификаций в антирепликативных РНК митохондрий клеток человека на изменение экспрессии мтДНК, несущих патогенные мутации - химерные РНК-ДНК и их 2'-О-метилованные аналоги могут избирательно связываться с мутантной мтДНК и импортироваться в митохондрии, но устойчивого снижения гетероплазмы добиться не удалось. Позднее более перспективными оказались РНК, конъюгированные с холестерином через кислоталабильную гидразоновую связь: они

эффективно проникали в клетки и проявляли свои антирепликативные свойства ({9,23}, [364, 538, 539]).

\*\*\*

Таким образом, в рамках представленного исследования был разработан ряд подходов к твердофазному синтезу конъюгатов олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов с различными биологически активными соединениями, а также создана база протоколов синтеза, деблокирования и выделения олигонуклеотидов средней длины и протяженных РНК. Разработанные для 5'-функционализации РНК и ее структурных аналогов подходы позволяют вводить биомолекулы в функциональные НК посредством химических связей, которые могут быть стабильны или стимулчувствительны. Полученные с применением вышеописанных разработок олигорибонуклеотиды и их аналоги, а также моно- и мультифункциональные НК-конструкции с сочетанием заданных характеристик были использованы в работах ИХБФМ и других институтов для выявления закономерностей при изучении НК-НК, НК-белковых взаимодействий и анализа их биологической активности. Проведенные исследования были включены в материалы одной докторской и десяти кандидатских диссертаций, защищенных в период с 2011 по 2026 года.

### Глава 3. Материалы и методы исследований (Экспериментальная часть)

#### 3.1. Исходные материалы

В работе были использованы 5',*N*-защищенные 2'-*O*-трет-бутилдиметилсилилрибо- (A, C, G, U), 2'-*O*-метилрибо- (A, C, G, U), 2'-F-рибо (A, C, G, U), LNA (A, C, G, U) и дезоксирибо (A, C, G, T) -*N,N*-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида, а также носители CPG (размер 500 Å и 1000 Å) с соответствующим присоединенным первым нуклеозидным звеном, 2-[2-(4,4'-диметокситритилокси)этилсульфонил]этил-*N,N*-диизопропил-(2-цианэтил)-фосфитамида (CPR, фосфорилирующий реагент), 2-[4-(5,5-диэтил-1,3-диоксо-2-ил)фенокси]этан-1-ил-[(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)]-фосфитамида (5'-альдегидный C2-модификатор), 0.05 М раствор карбоната калия в метаноле (Glen Research, США), имидазол, треххлористый фосфор, пивалоилхлорид, 3-аминопропан-1-ол, 8-аминооктан-1-ол, 10-аминодекан-1-ол, 12-аминододекан-1-ол, персульфат аммония, краситель "Stains-all", бромистый этидий, холестерилхлорформиат, дихлоруксусная кислота (DCA), 1-гидроксibenзотриазол (HOBt) (Fluka, Швейцария), перхлорат натрия, перхлорат лития (Sigma, США), акриламид, *N,N'*-метиленбисакриламид (AppliChem, Германия), трис(оксиметил)аминометан, литохлеовая кислота, триэтиламин тригидрофторид, *N*-метил-2-пирролидинон (MNP), α-токоферол, этилендиамин, глицирретиновая кислота (Aldrich, США), борная кислота (Реахим, Россия), ксиленицианол FF, бромфеноловый синий (Serva, Германия), мочеви́на, пентафторфенол, *N,N'*-диизопропилэтиламин (DIPEA), *N,O*-бис-(триметилсилил) ацетамид (BSA), диазобициклоундец-7-ен (DBU), пиридин (Py), трифенилфосфин (Ph<sub>3</sub>P), 4-диметиламинопиридин (DMAP), 2,2'-дипиридилдисульфид ((PyS)<sub>2</sub>), мочеви́на (Merck, Германия), трифторуксусная кислота, муравьиная кислота, триэтиламин (ТЭА), 40 %-ный водный раствор метиламина, триметилхлорсилан (TMSCl), триметилсилил трифторметансульфонат (TMSOTf), 4-метоксибензойная кислота, 1,3-дициклогексилкарбодиимид (DCC), моно-*N*-Вос-1,6-диаминогексан гидрохлорид, 1,6-диаминогексан, 6-аминогексан-1-ол, α-GalNAc-PEG3-азид, пиперазин (Sigma-Aldrich, США), хлорангидрид уксусной кислоты, олеиловый спирт, *N,N'*-дисукцинимидилкарбонат (DSC), олеиламин, фолиевая кислота, *N*-метилимидазол (*N*-MeIm), тетраметилендиамин (TEMED) (Acros, Бельгия), этокситриметилсилан (TCI, Япония), додецилсульфат натрия (Life Technologies, США), FAM-сукцинимидный эфир, сукцинимидный эфир биотина, FAM-азид, Cu<sub>3</sub>-азид, 10 mM Cu(II)-TBTA водный раствор в 55% диметилсульфоксиде, аскорбиновая кислота (Люмипроб, Россия), реактивы и растворители квалификации х.ч. и ос.ч. отечественного и импортного производства. Безводные растворители готовили с использованием стандартных методов. 5'-*O*-Диметокситритил-2'-*O*-трет-

бутилдиметилсилил-уридин синтезирован Ярковой Л.А. (ИХБФМ СО РАН). Эстронил-6-аминогескилкарбамат и аминотетраметиленоксониевое производное клозо-додекабората любезно предоставлены Новопашиной Д.С. и Сильниковым В.Н. (ИХБФМ СО РАН), гидрохлорид пиперазинового производного тритильной (трис(8-карбокси-2,2,6,6-тетраметилбензо[1,2-*d*;4,5-*d'*]бис[1,3]дитиол-4-ил)метил, Finland trityl) спиновой метки любезно предоставлен Тормышевым В.М. (НИОХ СО РАН).

### 3.2. Основные методы работы

Концентрирование и упаривание растворов органических соединений осуществляли на вакуумном ротационном испарителе Rotavapor RE (Büchi, Швейцария) при температуре до 50°C и давлении 10-15 мм.рт.ст.

Спектры  $^{13}\text{C}$ -,  $^{31}\text{P}$ - и  $^1\text{H}$ -ЯМР были зарегистрированы на спектрометре AV-300, AV-400, AV-500 (Bruker, Германия) в ЦКП НИОХ СО РАН (Новосибирск, Россия). Химические сдвиги в  $^{31}\text{P}$ -ЯМР-спектрах приведены в миллионных долях относительно сигнала 85 %-ной ортофосфорной кислоты (внешний стандарт). В качестве внутреннего стандарта в  $^{13}\text{C}$ - и  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектрах использовали  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  7.24 м.д.).

Для идентификации структуры органических соединений, олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов был использован метод масс-спектрометрии. Спектры были зарегистрированы на Agilent G6410A LC-MS/MS (Agilent Technologies, США) или MALDI-TOF Autoflex Speed (Bruker Corporation, США) масс-спектрометрах в ЦКП ИХБФМ СО РАН.

Синтез олигонуклеотидов, их аналогов и производных проводили на отечественных автоматических восьмиканальных (восьмиколоночных) синтезаторах ASM-800 и ASM-800E<sup>#</sup> (Биоссет, Россия).

Для приготовления растворов олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов использовали деионизованную воду с удельным сопротивлением 18.2 МОм/см, полученную с помощью прибора Millipore Simplicity (Millipore, США).

Растворы олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов центрифугировали на центрифуге Eppendorf MiniSpin Plus (Eppendorf, Германия) или на центрифуге с охлаждением Eppendorf 5424R (Eppendorf, Германия).

Перемешивание растворов олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов при заданной температуре проводили с помощью термомиксера Eppendorf Termomixer Comfort (Eppendorf, Германия).

---

<sup>#</sup> модель ASM-800E дополнительно оснащена модулем для качественной фиксации окраски диметокситритил-катиона на стадии детритилирования с целью мониторинга относительной эффективности каждого синтетического цикла

Измерение оптической плотности растворов олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов проводили с использованием прибора NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific, США).

Для определения коэффициентов молярного поглощения олигонуклеотида при 260 нм либо использовали программу OligoAnalyzer™ Tool [540], либо рассчитывали по соответствующей формуле, учитывающей гипохромный эффект, с использованием [541] :  $\epsilon = 2 * (\epsilon_{12} + \epsilon_{23} + \dots + \epsilon_{n-1,n}) - \epsilon_2 - \epsilon_3 - \dots - \epsilon_{n-1}$ , где  $\epsilon_i$  – коэффициент молярного поглощения нуклеотида,  $\epsilon_{i-1,i}$  – коэффициент молярного поглощения для пары нуклеотидов. Значения молярных коэффициентов поглощения для олигонуклеотида принимали равными соответствующим молярным коэффициентам поглощения для дезокси- и рибонуклеотидов. Молярные коэффициенты поглощения вводимых ФМ считали равным нулю.

Концентрирование и упаривание растворов, защищенных и незащищенных олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов проводили на вакуумном испарителе Speedvac Concentrator Plus (Eppendorf, США).

### **3.2.1. Тонкослойная и адсорбционная хроматография**

Для ТСХ использовали пластинки DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Германия) и системы растворителей: этилацетат-гексан, 1:1 (А), этанол-дихлорметан, 0.5:9.5 (Б), этанол-дихлорметан, 1:9 (В), этанол-дихлорметан, 4:6 (Г), этанол-дихлорметан, 1.5:8.5 (Д), этанол-дихлорметан, 2:8 (Е), диоксан-аммиак-вода, 7:2:1 (Ж). Результаты хроматографии визуализировали в УФ-свете прибора "Хроматоскоп М" ("ФИМЕТ", Россия) и проявляли реактивом Дини (0.5 %-ный раствор солянокислого цистеина в 3 н H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) при нагревании до 150°C. Результаты хроматографии коммерческих препаратов фосфитаминов дополнительно проявляли 0.1%-ным раствором нингидрина в этаноле при нагревании до 150°C.

Колоночную адсорбционную хроматографию проводили на силикагеле Silica gel (230-400 меш, 60 Å) (Sigma, США) с высотой и диаметром колонки 5 см и 2.5 см, соответственно.

### **3.2.2. Частичное или полное деблокирование олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов**

#### **3.2.2.1. Удаление щелочелabile защитных групп и отделение олигонуклеотидов от носителя**

а) Носитель (1-20 мг), с присоединенным защищенным олигонуклеотидом, его производным или конъюгатом, обрабатывали 400 мкл смеси АМА (40 %-ный водный раствор метиламина/30 %-ный водный раствор аммиака, 1/1, v/v) при встряхивании в течение 15 мин при 65°C, выдерживали 15 мин при -20°C, центрифугировали, супернатант

собирали, носитель промывали смесью ацетонитрил/вода/этанол (1/1/1, v/v/v) (3×100 мкл), супернатанты объединяли и упаривали досуха.

б) Носитель (1-20 мг), с присоединенным защищенным олигонуклеотидом, его производным или конъюгатом, обрабатывали 400 мкл смеси АМА (40 %-ный водный раствор метиламина/30 %-ный водный раствор аммиака, 1/1, v/v) при встряхивании в течение 2 ч при комнатной температуре, выдерживали 15 мин при -20°C, центрифугировали, супернатант собирали, носитель промывали смесью ацетонитрил/вода/этанол (1/1/1, v/v/v) (3×100 мкл), супернатанты объединяли и упаривали досуха.

в) Носитель (1-20 мг), с присоединенным защищенным олигонуклеотидом, его производным или конъюгатом, обрабатывали 500 мкл смеси этанол/30 %-ный водный раствор аммиака (1/9, v/v) при встряхивании в течение 2 сут при комнатной температуре, выдерживали 15 мин при -20°C, центрифугировали, супернатант собирали, носитель промывали смесью ацетонитрил/вода/этанол (1/1/1, v/v/v) (3×100 мкл), супернатанты объединяли и упаривали досуха.

г) Носитель (1-20 мг), с присоединенным защищенным олигонуклеотидом, его производным или конъюгатом, обрабатывали 400 мкл 0.05 М раствора  $K_2CO_3$  в абс. метаноле в течение 16 ч при комнатной температуре и встряхивании. После центрифугирования супернатант собирали, носитель промывали смесью ацетонитрил/этанол/вода (1/1/1, v/v/v) (2×150 мкл). Супернатанты объединяли, объединенный раствор нейтрализовали добавлением 2 мкл ледяной уксусной кислоты до pH 7.0. Раствор, содержащий осадок, упаривали до 100 мкл. Олигонуклеотидный материал высаживали из раствора десятикратным объемом 2 %-ного раствора  $NaClO_4$  в ацетоне, выдерживали 30 мин при -20°C, центрифугировали, супернатант удаляли, осадок промывали ацетоном, сушили на воздухе в течение 15 мин.

д) К носителю (1-20 мг), с присоединенным олигонуклеотидом, содержащим флуоресцеиновый краситель FAM, добавляли 20 мкл этанола и 200 мкл 30 %-ного водного раствора аммиака, выдерживали при встряхивании в течение 30 мин при комнатной температуре, выдерживали 10 мин при -20°C, добавляли к раствору 200 мкл 40 %-ный водный раствор метиламина и продолжали встряхивать при комнатной температуре. Через 2 ч раствор охлаждали 15 мин при -20°C, центрифугировали, супернатант собирали, носитель промывали смесью ацетонитрил/вода/этанол (1/1/1, v/v/v) (3×100 мкл), супернатанты объединяли и упаривали досуха.

е) К носитель-связанному защищенному гекса- или гептадезокситимидилату, содержащему остаток холестерил-6-аминогексилкарбамата или пиренметиламина на 5'-конце (1-10 мг, п.п.3.3.3.1, 3.3.5.1.а, п.3.3.5.2.2.1, 3.3.6.1,) добавляли 40 мкл этанола и 400 мкл 30 %-ного водного раствора аммиака, выдерживали при встряхивании в течение 1 ч при комнатной температуре, раствор охлаждали 15 мин при -20°C, центрифугировали, супернатант собирали, носитель промывали смесью ацетонитрил/вода/этанол (1/1/1, v/v/v) (3×100 мкл), супернатанты объединяли и упаривали досуха.

### **3.2.2.2. Удаление 2'-*O*-трет-бутилдиметилсилильных защитных групп**

а) К сухому остатку, полученному выше (п.3.2.2.1), добавляли 200 мкл раствора для удаления 2'-*O*-трет-бутилдиметилсилильных защитных групп (*N*-метил-2-пирролидинон/(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N/(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N·3HF, 1.5/0.7/1.0, v/v/v), выдерживали 1.5 ч при 65°C и встряхивании. К полученному раствору добавляли 300 мкл этокситриметилсилана, выдерживали 10 мин при перемешивании, добавляли 1 мл серного эфира, перемешивали, центрифугировали, супернатант удаляли, осадок промывали серным эфиром (1 мл) и сушили на воздухе в течение 15 мин. В случае олигорибонуклеотидов длиной более 80 звеньев использовали 400 мкл раствора для удаления 2'-*O*-трет-бутилдиметилсилильных защитных групп, выдерживали 2 ч при 65°C и встряхивании и далее добавляли 600 мкл этокситриметилсилана.

б) (для раздела 2.5) К сухому остатку, полученному выше (п.3.2.2.1), добавляли 200 мкл 1 М раствора тетрабутиламмоний фторида в тетрагидрофуране и выдерживали в течение 16 ч при комнатной температуре и встряхивании. К раствору добавляли 600 мкл 1 М раствора триэтиламмоний ацетата (pH 7.0) и удаляли тетрагидрофуран упариванием на вакуумном испарителе Speedvac. Олигонуклеотидный материал обессоливали на картридже TetPac C18 (Waters, США) или на Amicon Ultra 3K (Millipore, США), добавляли десятикратный объем 2 %-ного NaClO<sub>4</sub> в ацетоне, выдерживали 30 мин при -20°C, центрифугировали, супернатант удаляли, осадок промывали ацетоном, сушили на воздухе в течение 15 мин.

### **3.2.2.3. Удаление 5'-концевой ацетальной защитной группы с полностью деблокированного олигонуклеотида**

(для раздела 2.3)

5'-Ацетальдегидсодержащий полностью деблокированный и удаленный с носителя олигонуклеотид обрабатывали 150 мкл 80 %-ной уксусной кислоты при комнатной температуре и перемешивании в течение 1 ч. Осаждали десятикратным объемом 2 %-ного

$\text{NaClO}_4$  в ацетоне, выдерживали 30 мин при  $-20^\circ\text{C}$ , центрифугировали, супернатант удаляли, осадок промывали ацетоном и оставляли сушиться на воздухе в течение 15 мин.

#### **3.2.2.4. Удаление 5'-концевой ацетальной защитной группы с полностью защищенного носитель-связанного олигонуклеотида**

(для раздела 2.3)

Носитель (1-20 мг) с присоединенным 5'-ацетальдегидсодержащим защищенным олигонуклеотидом обрабатывали 400 мкл 80 %-ной уксусной кислоты при комнатной температуре и перемешивании в течение 1 ч. Супернатант удаляли, носитель промывали водой ( $3 \times 600$  мкл), ацетоном ( $3 \times 600$  мкл) и сушили на воздухе в течение 15 мин.

#### **3.2.2.5. Удаление защитных групп с межнуклеозидных и 5'-концевого фосфатов с полностью защищенного носитель-связанного олигонуклеотида**

(для раздела 2.5)

Удаление защитных групп с межнуклеозидных и 5'-концевого фосфатов проводили как описано в [264]. Защищенный носитель-связанный олигонуклеотид обрабатывали 400 мкл смеси тетрагидрофуран/*N,O*-бис-(триметилсилил)ацетамид (1/1, v/v) 30 мин при встряхивании при комнатной температуре, с последующим добавлением 21 мкл диазобициклоундец-7-ена и встряхиванием 30 мин при комнатной температуре. После обработки носитель последовательно промывали тетрагидрофураном ( $3 \times 200$  мкл), ацетонитрилом ( $3 \times 200$  мкл), дихлорметаном ( $3 \times 200$  мкл) и сушили на воздухе в течение 15 мин.

#### **3.2.3. Получение олигонуклеотидов в форме цетилтриметиламмониевой соли**

(для раздела 2.5)

2-5  $\text{OE}_{260}$  5'-фосфатсодержащего гептатимидилата, растворенного в воде (примерно 1  $\text{OE}_{260}/10$  мкл), добавляли 8 %-ный раствор бромида цетилтриметиламмония по 2 мкл до прекращения выпадения осадка. Супернатант после центрифугирования удаляли, осадок сушили в течение 1 ч над  $\text{P}_2\text{O}_5$  при 2-4 мм.рт.ст.

#### **3.2.4. Аналитическая ВЭЖХ**

Для анализа полученных реакционных смесей олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов использовали метод аналитической обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе "Альфахром А-02" (Эконова, Россия) с использованием колонки ProntoSil (75 мм  $\times$  2 мм) в градиенте концентрации 0 – 50 % (24 мин) ацетонитрила в буфере, содержащем 0.02 М раствор триэтиламмоний ацетата (pH 7.0), скорость потока 100 мкл/мин. Измерения проводили на длинах волн 260, 270, 280 и 300 нм спектрофотометрического детектора

хроматографа "Альфахром А-02". Полученные данные обрабатывали в программе "Мультихром" (Эконова, Россия).

### **3.2.5. Аналитический гель-электрофорез олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов в ПААГ в денатурирующих условиях**

Электрофоретическое разделение олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов проводили в 12 %-ном, 15 %-ном или 20 %-ном ПААГ (толщина геля 0.4 мм) в денатурирующих условиях (акриламид:*N,N'*-метиленбисакриламид (30:1), 7 М мочевины, 89 мМ Трис- $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2 мМ  $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ , pH 8.3) при напряжении 50 В/см. Для нанесения олигонуклеотидных образцов на гель использовали денатурирующий буфер (0.05 %-ный бромфеноловый синий или 0.05 %-ный ксиленцианол FF, 7 М мочевины). Пробы готовили следующим образом: 0.05-0.1 о.е. олигонуклеотида, его производного или конъюгата растворяли в 5 мкл денатурирующего буфера для нанесения. Результаты электрофоретического разделения в ПААГ визуализировали:

а) прокрашиванием геля раствором, приготовленным из 50 мг красителя "Stains-all" и 100 мл смеси вода/формамид (1/1, v/v), с последующим обесцвечиванием под лампой накаливания. Гели сканировали или сушили в течение 1 ч на Gel Dryer FB GD 45 (Fisher BioSciences, США);

б) прокрашиванием геля водным раствором бромистого этидия (0.5 мкг/мл) в течение 30 мин с последующей визуализацией под ультрафиолетовым светом трансиллюминатора TI3 (Vilber Lourmat, Франция) и регистрацией с помощью видеосистемы "DNA Analyzer" (ДНК технология, Россия);

в) ультрафиолетовым светом трансиллюминатора TI3 (Vilber Lourmat, Франция) с последующей регистрацией с помощью видеосистемы "DNA Analyzer" (ДНК технология, Россия).

### **3.2.6. Выделение препаративным гель-электрофорезом олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов в ПААГ в денатурирующих условиях**

Электрофоретическое разделение олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов проводили в 12 %-ном или 15 %-ном ПААГ (толщина геля 0.8 мм, ширина кармана 4 - 5 см) в денатурирующих условиях (акриламид:*N,N'*-метиленбисакриламид (30:0.5), 7 М мочевины, 89 мМ Трис- $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2 мМ  $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ , pH 8.3) при напряжении 50 В/см. Для нанесения олигонуклеотидных образцов на гель использовали денатурирующий буфер (см. выше). Результаты электрофоретического разделения визуализировали в УФ-свете прибора "Хроматоскоп М" ("ФИМЕТ", Россия). Полоски геля, содержащие продукт, вырезали и проводили элюцию нуклеотидного материала из ПААГ, добавляя 1 мл деионизованной

воды и выдерживая в течение 16 ч при 25°C и встряхивании. Отделяли раствор от геля и обессоливали:

а) К раствору добавляли 10 % (v/v) 3 М NaClO<sub>4</sub> и пропускали через картридж TetRac C18 (Waters, США). Олигонуклеотидный материал осаждали десятикратным объемом 2 %-ного NaClO<sub>4</sub> в ацетоне, выдерживали 30 мин при -20°C, центрифугировали, супернатант удаляли, осадок промывали ацетоном, сушили на воздухе в течение 30 мин.

б) Раствор пропускали через Amicon Ultra 3K или 10K (Millipore, США). Олигонуклеотидный материал осаждали десятикратным объемом 2 %-ного NaClO<sub>4</sub> в ацетоне, выдерживали 30 мин при -20°C, центрифугировали, супернатант удаляли, осадок промывали ацетоном, сушили на воздухе в течение 30 мин.

в) К раствору добавляли 10 % (v/v) 3М натрий ацетатный буфер (pH 5.2 или 7.0) и четырехкратный объем этанола. Выдерживали 2 ч при -20°C, центрифугировали, супернатант удаляли, осадок промывали 80 %-ным водным этанолом, сушили при пониженном давлении на вакуумном испарителе Speedvac в течение 15 мин.

### **3.2.7. Выделение липофильных конъюгатов олигонуклеотидов ОФ ВЭЖХ**

(для раздела 2.2)

Препаративную ОФ ВЭЖХ деблокированных липофильных конъюгатов олигонуклеотидов проводили на хроматографе Waters (США), используя колонку XBridge C18 2.5 µm (4.6 x 50 мм) (Waters, США) и градиент концентрации ацетонитрила (0-90 %) в 0.05 М LiClO<sub>4</sub>, 2 мМ ЭДТА, 20 мМ Трис-НСl (pH 7.0) при 50°C, скорость элюции 1 мл/мин (условия ОФ ВЭЖХ оптимизированы Сериковым Р.Н., ИХБФМ СО РАН). Концентрирование растворов олигонуклеотидов после хроматографического выделения осуществляли на вакуумном испарителе Speedvac. Выделение олигонуклеотидов в виде натриевых солей осуществляли путем осаждения их из водного раствора десятикратным объемом 2 %-ного раствора NaClO<sub>4</sub> в ацетоне. Супернатант после центрифугирования удаляли, осадок промывали ацетоном и сушили на воздухе в течение 15 мин.

### **3.2.8. Аналитический гель-электрофорез олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов в ПААГ в нативных условиях**

(для раздела 2.2)

Гель-электрофорез дуплексов siРНК (рис. 2.2.5) проводили в 15 %-ном ПААГ (толщина геля 0.4 мм) в нативных условиях (акриламид:*N,N'*-метиленбисакриламид (30:1), 89 мМ Трис-Н<sub>3</sub>ВО<sub>3</sub>, 2 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, pH 8.3) при напряжении 10 В/см. Для нанесения олигонуклеотидных образцов на гель использовали нативный буфер (50 %-ный глицерин, 0.05 %-ный ксиленцианол FF и 0.05 %-ный бромфеноловый синий). Результаты анализа

визуализировали с помощью бромистого этидия или прокрашиванием геля раствором красителя "Stains-all".

### 3.2.9. Расчет выхода на шаг синтетического цикла

Выход на шаг синтетического цикла рассчитывали по формуле  $\omega_{\text{шаг}} = \sqrt[n]{\omega} \cdot 100\%$ ,  $(\omega = \frac{X \cdot Z}{m \cdot y \cdot \epsilon \cdot 10^{-4}})$ , где  $X$  – количество оптических единиц реакционной смеси, полученное после деблокирования олигонуклеотида,  $Z$  – числовое значение (%) интенсивности полосы, соответствующей целевой последовательности, отнесенное к интенсивности всей дорожки (в данном исследовании составило от 75% до 92%; расчеты проводили для флуорофор-содержащих олигонуклеотидов или после прокрашивания геля водным раствором бромистого этидия),  $m$  – масса твердого носителя, связанного с олигонуклеотидом (мг),  $y$  – емкость носителя (мкмоль/г),  $\epsilon$  – коэффициент экстинкции олигонуклеотида (л/(моль·см)),  $n$  – количество стадий (конденсаций) в автоматическом синтезе олигонуклеотидов и их производных.

### 3.2.10. Определение общего выхода олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов в расчете на первое нуклеозидное звено

Выход олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов рассчитывали по формуле  $\omega_{\text{общ}} = \frac{X}{m \cdot y \cdot \epsilon \cdot 10^{-6}} \cdot 100\%$ , где  $X$  – количество оптических единиц, полученное после электрофоретического выделения олигонуклеотида (производного, конъюгата),  $m$  – масса твердого носителя, связанного с олигонуклеотидом (мг),  $y$  – емкость носителя (мкмоль/г),  $\epsilon$  – коэффициент экстинкции олигонуклеотида (л/(моль·см)).

### 3.2.11. Расчет выхода на стадию

Выход на стадию рассчитывали по формуле  $\omega_{\text{ст}} = \sqrt[n-1]{\frac{\omega_{\text{общ}}}{100}} \cdot 100\%$ , где  $\omega_{\text{общ}}$  – выход в расчете на первое нуклеозидное звено,  $n$  – количество стадий (конденсаций) при синтезе олигонуклеотидов, их производных и конъюгатов.

### 3.2.12. Расчет содержания целевого олигонуклеотида в полученных реакционных смесях

Полуколичественную оценку содержания целевого олигонуклеотида в полученных реакционных смесях проводили по анализу сигналов флуоресценции на электрофореграммах флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов или электрофореграммах, визуализированных окрашиванием бромистым этидием; содержание целевого олигонуклеотида определяли, как отношение интенсивности флуоресценции полосы, соответствующей целевой последовательности, к интенсивности всей дорожки.

### 3.3. Методики эксперимента

#### 3.3.1. Синтез органических соединений

Все реакции вели в атмосфере аргона. Реагенты сушили над  $P_2O_5$  при 2-4 мм рт. ст. в течении 1 ч, если не оговорено иное.

##### 3.3.1.1. Синтез Н-фосфонатов липофильных соединений

(для раздела 2.2)

##### 3.3.1.1.1. Производные холестерина, содержащие остатки аминокспиртов

Производные холестерина, содержащие остатки 3-аминопропан-1-ола и 6-аминогексан-1-ола, 8-аминооктан-1-ола, 10-аминодекан-1-ола, 12-аминододекан-1-ола получали по аналогии с [90]. Хлорформиат холестерина (0.5 г, 1.1 ммоль) растворяли в 4 мл абс. дихлорметана. К раствору добавляли аминокспирт (1.1 ммоль) и абс. триэтиламин (0.15 мл, 1.1 ммоль). Реакцию вели 1.5 ч при комнатной температуре и перемешивании (ТСХ, система А) (рис. 2.2.1.А, стадия i). После окончания реакции добавляли дихлорметан (20 мл) и экстрагировали насыщенным водным раствором  $NaHCO_3$  (2×20 мл) и водой (20 мл). Органический слой сушили над  $Na_2SO_4$  (б/в) и упаривали до маслообразного остатка. Продукт реакции выделяли хроматографией на силикагеле, используя для элюции градиент концентрации этилацетата (0-50 %) в гексане.

**3-(Холестерилоксикарбонил)-аминопропан-1-ол.** Выход 84 %.  $R_f$  0.14 (ТСХ, система А).  $^1H$ -ЯМР (300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.69 (с, 3H,  $-CH_3$ , холестерин); 0.87 (д, 3H,  $-CH_3$ , холестерин); 0.89 (д, 3H,  $-CH_3$ , холестерин); 0.93 (д, 3H,  $-CH_3$ , холестерин); 1.025 (с, 3H,  $-CH_3$ , холестерин); 3.35 (квартет, 2H,  $-CH_2-$ , линкер); 3.68 (т, 2H,  $-CH_2-$ , линкер); 4.51 (м, 1H, 3-H, холестерин); 5.4 (д, 1H,  $-CH=C-$ , холестерин).

**6-(Холестерилоксикарбонил)-аминогексан-1-ол.** Выход 92 %.  $R_f$  0.2 (ТСХ, система А).  $^1H$ -ЯМР (300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.69 (с, 3H,  $-CH_3$ , холестерин); 0.87 (д, 3H,  $-CH_3$ , холестерин); 0.89 (д, 3H,  $-CH_3$ , холестерин); 0.93 (д, 3H,  $-CH_3$ , холестерин); 1.025 (с, 3H,  $-CH_3$ , холестерин); 3.19 (квартет,  $-CH_2-$ , линкер); 3.67 (т, 2H,  $-CH_2-$ , линкер); 4.52 (м, 1H, 3-H, холестерин); 5.4 (д, 1H,  $-CH=C-$ , холестерин).

**8-(Холестерилоксикарбонил)-аминооктан-1-ол.** Выход 71 %.  $R_f$  0.43 (ТСХ, система А).  $^1H$ -ЯМР (300 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.65 (с, 3H, 18'/19'- $CH_3$ , холестерин); 0.83 (д, 3H, 26'/27'- $CH_3$ , холестерин); 0.86 (д, 3H, 26'/27'- $CH_3$ , холестерин); 0.89 (д, 3H, 21'- $CH_3$ , холестерин); 0.98 (с, 3H, 18'/19'- $CH_3$ , холестерин); 3.10 (квартет, 2H, 1-H, линкер); 3.61 (т, 2H, 8-H, линкер); 4.46 (м, 1H, 3'-H, холестерин); 4.55 (т, 1H,  $-NH-$ , линкер); 5.34 (д, 1H, 6'-H, холестерин). Найдено, %: C 77.00; H 11.34; N 2.62.  $C_{36}H_{63}NO_3$ . Вычислено, %: C 77.48; H 11.66; N 2.51.

**10-(Холестерилоксикарбонил)-аминодекан-1-ол.** Выход 67 %.  $R_f$  0.46 (ТСХ, система А).  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.65 (с, 3H, 18'/19'- $\text{CH}_3$ , холестерин); 0.83 (д, 3H, 26'/27'- $\text{CH}_3$ , холестерин); 0.85 (д, 3H, 26'/27'- $\text{CH}_3$ , холестерин); 0.89 (д, 3H, 21'- $\text{CH}_3$ , холестерин); 0.98 (с, 3H, 18'/19'- $\text{CH}_3$ , холестерин); 3.10 (квартет, 2H, 1-H, линкер); 3.62 (т, 2H, 8-H, линкер); 4.46 (м, 1H, 3'-H, холестерин); 4.55 (т, 1H, -NH-, линкер); 5.35 (д, 1H, 6'-H, холестерин). Найдено, %: C 77.59; H 11.48; N 2.53.  $\text{C}_{38}\text{H}_{67}\text{NO}_3$ . Вычислено, %: C 77.88; H 11.44; N 2.39.

**12-(Холестерилоксикарбонил)-аминододеканол-1-ол.** Выход 75 %.  $R_f$  0.53 (ТСХ, система А).  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.65 (с, 3H, 18'/19'- $\text{CH}_3$ , холестерин); 0.83 (д, 3H, 26'/27'- $\text{CH}_3$ , холестерин); 0.84 (д, 3H, 26'/27'- $\text{CH}_3$ , холестерин); 0.89 (д, 3H, 21'- $\text{CH}_3$ , холестерин); 0.98 (с, 3H, 18'/19'- $\text{CH}_3$ , холестерин); 3.07 (квартет, 2H, 1-H, линкер); 3.61 (т, 2H, 8-H, линкер); 4.46 (м, 1H, 3'-H, холестерин); 4.55 (т, 1H, -NH-, линкер); 5.35 (д, 1H, 6'-H, холестерин). Найдено, %: C 78.18; H 11.60; N 2.28.  $\text{C}_{40}\text{H}_{71}\text{NO}_3$ . Вычислено, %: C 78.24; H 11.57; N 2.28.

### 3.3.1.1.2. Производные литохоловой кислоты (3 $\alpha$ -гидрокси-5 $\beta$ -холан-24-овой кислоты), содержащие остатки аминоспиртов

**3 $\alpha$ -Ацетокси-5 $\beta$ -холан-24-овую кислоту** получали по аналогии с [542]. Литохоловую кислоту (0.5 г, 1.3 ммоль) растворяли в 10 мл абс. пиридина, охлаждали до 0°C и при охлаждении и перемешивании добавляли 4-диметиламинопиридин (0.02 г, 0.13 ммоль) и хлорангидрид уксусной кислоты (1.2 г, 1.1 мл, 16 ммоль). Реакцию вели 1 ч при комнатной температуре (ТСХ, система Б) (рис. 2.2.1.Б, стадия ii). После окончания реакции добавляли 3 мл воды, раствор упаривали досуха, остаток растворяли в 15 мл дихлорметана и экстрагировали насыщенным водным раствором NaCl (20 мл) и водой (15 мл). Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (б/в) и упаривали до маслообразного остатка. Для удаления следов пиридина остаток последовательно упаривали с толуолом (2 $\times$ 10 мл), этанолом (2 $\times$ 10 мл), ацетонитрилом (2 $\times$ 10 мл) и дихлорметаном (2 $\times$ 10 мл). Продукт реакции выделяли хроматографией на силикагеле, используя для элюции градиент концентрации этанола (0-5 %) в дихлорметане. Выход целевого соединения составил 0.5 г (84 %).  $R_f$  0.4 (ТСХ, система Б).  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 0.67 (с, 3H, - $\text{CH}_3$ , холан); 0.94 (м, 6H, 2(- $\text{CH}_3$ ), холан); 2.05 (с, 3H, -C(O) $\text{CH}_3$ ); 4.75 (м, 1H, 3-H, холан).

**Пентафторфениловый эфир 3 $\alpha$ -ацетокси-5 $\beta$ -холан-24-овой кислоты** получали по аналогии с [543]. 3 $\alpha$ -Ацетокси-5 $\beta$ -холан-24-овую кислоту (0.4 г, 1.0 ммоль) растворяли в 13 мл абс. дихлорметана. Раствор охлаждали до 0°C и добавляли раствор пентафторфенола (0.2 г, 1.1 ммоль) в 1 мл абс. дихлорметана и  $N,N'$ -дициклогексилкарбодиимид (0.25 г, 1.2

ммоль). Реакцию вели 30 мин при 0°C, затем 20 ч при комнатной температуре (ТСХ, система Б) (рис. 2.2.1.Б, стадия *iii*). Реакционную смесь упаривали досуха, остаток растворяли в 15 мл дихлорметана и экстрагировали насыщенным водным раствором NaCl (15 мл) и водой (20 мл). Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (б/в) и упаривали досуха. Полученный остаток целевого соединения (0.55 г; R<sub>f</sub> 0.8, система Б) использовали далее в синтезе без дополнительной очистки.

**Производные 3α-ацетокси-5β-холан-24-овой кислоты, содержащие остатки 3-аминопропан-1-ола и 6-аминогексан-1-ола**, получали по аналогии с [495]. Пентафторфениловый эфир 3α-ацетокси-5β-холановой кислоты (0.5 г, 0.9 ммоль) растворяли в 20 мл абс. дихлорметана. Раствор охлаждали до 0°C, добавляли охлажденную до 0°C смесь аминокспирта (1.3 ммоль) и абс. триэтиламина (3 экв.) в 1 мл абс. дихлорметана. Реакцию вели 40 мин при комнатной температуре (ТСХ, система Б) (рис. 2.2.1.Б, стадия *i*). Реакционную смесь экстрагировали насыщенным водным раствором NaCl (2×50 мл) и водой (50 мл). Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (б/в) и упаривали досуха. Продукт реакции выделяли хроматографией на силикагеле, используя для элюции градиент концентрации этанола (0-7 %) в дихлорметане.

***N*-(3-Гидроксипропил)-3α-ацетокси-5β-холан-24-амид**. Выход 58 %. R<sub>f</sub> 0.3 (система Б). <sup>1</sup>H-ЯМР (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 0.67 (с, 3H, -CH<sub>3</sub>, холан); 0.95 (м, 6H, 2 (-CH<sub>3</sub>), холан); 2.05 (с, 3H, -C(O)CH<sub>3</sub>); 3.44 (квартет, 2H, -CH<sub>2</sub>-, линкер); 3.65 (т, 2H, -CH<sub>2</sub>-, линкер); 4.74 (м, 1H, 3-H, холан).

***N*-(6-Гидроксигексил)-3α-ацетокси-5β-холан-24-амид**. Выход 40 %. R<sub>f</sub> 0.4 (система Б). <sup>1</sup>H-ЯМР (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 0.62 (с, 3H, -CH<sub>3</sub>, холан); 0.92 (м, 6H, 2 (-CH<sub>3</sub>), холан); 2.02 (с, 3H, -C(O)CH<sub>3</sub>); 3.2 (квартет, 2H, -CH<sub>2</sub>-, линкер); 3.6 (т, 2H, -CH<sub>2</sub>-, линкер); 4.69 (м, 1H, 3-H, холан).

### 3.3.1.1.3. Олеиламид литохолевой кислоты (цис-*N*-(октадец-9-енил)-3α-гидрокси-5β-холан-24-амида) и его производные, содержащие остатки аминокспиртов

***цис-N*-(Октадец-9-енил)-3α-гидрокси-5β-холан-24-амид** получали по аналогии с [495]. Пентафторфениловый эфир 3α-гидрокси-5β-холан-24-овой кислоты (0.72 г, 1.33 ммоль), полученный по аналогии с пентафторфениловый эфир 3α-ацетокси-5β-холан-24-овой кислоты (рис. 2.2.1.В, стадия *iii*), растворяли в 30 мл абс. дихлорметана. Раствор охлаждали до 0°C, добавляли охлажденную до 0°C смесь олеиламина (0.54 г, 0.67 мл, 2.0 ммоль) и абс. триэтиламина (0.4 г, 0.56 мл, 4.0 ммоль) в 2 мл абс. дихлорметана. Реакцию вели 1 ч при комнатной температуре (ТСХ, система Б) (рис. 2.2.1.В, стадия *iv*). Реакционную смесь экстрагировали насыщенным водным раствором NaCl (2×50 мл) и водой (50 мл).

Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (б/в) и упаривали досуха. Продукт реакции выделяли хроматографией на силикагеле, используя для элюции градиент концентрации этанола (0-5 %) в смеси гексан:дихлорметан (1:1). Выход 87 %.  $R_f$  0.2 (система Б).  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.61 (с, 3H,  $-\text{CH}_3$ , холан); 3.2 (квартет, 2H,  $-\text{CH}_2-$ , остаток олеиламина); 3.6 (м, 1H, 3-H, холан); 5.35 (м, 2H,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ , остаток олеиламина).

***цис-N-(Октадец-9-енил)-3 $\alpha$ -O-(сукцинимидилоксикарбонил)-5 $\beta$ -холан-24-амид*** получали по аналогии с [495]. *цис-N-(Октадец-9-енил)-3 $\alpha$ -гидрокси-5 $\beta$ -холан-24-амид* растворяли в 6 мл абс. дихлорметана. При перемешивании к полученному раствору последовательно добавляли *N,N'*-дисукцинимидилкарбонат (0.28 г, 1.08 ммоль), 0.6 мл абс. триэтиламина и 3 мл абс. ацетонитрила. Реакционную смесь оставляли при комнатной температуре в течение 16 ч, далее с интервалом в 4 ч к реакционной смеси добавляли еще две порции *N,N'*-дисукцинимидилкарбоната (по 1.08 ммоль) (ТСХ, система Б) (рис. 2.2.1.В, стадия v). Реакционную смесь упаривали досуха, растворяли в 20 мл дихлорметана, экстрагировали насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  ( $2 \times 20$  мл). Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (б/в) и упаривали досуха. Полученный остаток целевого соединения (0.55 г;  $R_f$  0.7, система Б) использовали далее в синтезе без дополнительной очистки.

**Производные *цис-N-(октадец-9-енил)-3 $\alpha$ -гидрокси-5 $\beta$ -холан-24-амида*, содержащие остатки 3-аминопропан-1-ола и 6-аминогексан-1-ола**, получали по аналогии с [495]. *цис-N-(Октадец-9-енил)-3 $\alpha$ -O-(сукцинимидилоксикарбонил)-5 $\beta$ -холан-24-амид* (0.5 г, 0.7 ммоль) растворяли в 4 мл абс. дихлорметана. Раствор охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  и добавляли при перемешивании аминоспирт (0.7 ммоль) и 0.8 мл абс. пиридина. Реакционную смесь оставляли при комнатной температуре в течение 16 ч, затем добавляли еще одну порцию аминоспирта (0.7 ммоль) и оставляли на 4 ч при комнатной температуре и перемешивании (ТСХ, система Б) (рис. 2.2.1.В, стадия i). Реакционную смесь упаривали досуха, растворяли в 20 мл дихлорметана, экстрагировали насыщенным водным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (20 мл) и водой (20 мл). Органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (б/в) и упаривали досуха. Продукт реакции выделяли хроматографией на силикагеле, используя для элюции градиент концентрации этанола (0-4 %) в дихлорметане.

***цис-N-(Октадец-9-енил)-3 $\alpha$ -O-(3-гидроксипропиламинокарбонил)-5 $\beta$ -холан-24-амид (99)***. Выход 80 %.  $R_f$  0.7 (система Б).  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.61 (с, 3H,  $-\text{CH}_3$ , холан); 2.9-3.1 (м, 4H, 2 ( $-\text{CH}_2-$ ), линкер/остаток олеиламина); 3.58 (т, 2H,  $-\text{CH}_2-$ , линкер); 5.32 (м, 2H,  $-\text{CH}=\text{CH}-$ , остаток олеиламина).

***цис-N-(Октадец-9-енил)-3 $\alpha$ -O-(6-гидроксигексиламинокарбонил)-5 $\beta$ -холан-24-амид (100)***. Выход 75.8 %.  $R_f$  0.3 (система Б).  $^1\text{H}$ -ЯМР (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.61 (с, 3H,

-CH<sub>3</sub>, холан); 3.1-3.3 (м, 4Н, 2 (-CH<sub>2</sub>-), линкер/остаток олеиламина); 3.62 (т, 2Н, -CH<sub>2</sub>-, линкер); 5.35 (м, 2Н, -CH=CH-, остаток олеиламина).

#### **3.3.1.1.4. Производные α-токоферола (5,7,8-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-ола), содержащие остатки аминокспиртов**

**2,5,7,8-Тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-ил-сукцинимидил-карбонат** получали по аналогии с [495]. 2,5,7,8-Тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-ол (1 г, 2.3 ммоль) растворяли в 10 мл абс. дихлорметана. При перемешивании к полученному раствору последовательно добавляли *N,N'*-дисукцинимидилкарбонат (0.9 г, 3.5 ммоль), 2.1 мл абс. триэтиламина и 5.2 мл абс. ацетонитрила. Реакционную смесь оставляли при комнатной температуре в течение 16 ч, затем добавляли еще одну порцию *N,N'*-дисукцинимидилкарбоната (3.5 ммоль) и оставляли на 4 ч при комнатной температуре и перемешивании (ТСХ, система Б) (рис. 2.2.1.Г, стадия v). Реакционную смесь упаривали досуха, растворяли в 40 мл дихлорметана, экстрагировали насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (2×40 мл). Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (б/в) и упаривали досуха. Полученный остаток соединения (2 г; R<sub>f</sub> 0.4, система Б) использовали далее в синтезе без дополнительной очистки.

**Производные 2,5,7,8-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-ола, содержащие остатки 3-аминопропан-1-ола и 6-аминогексан-1-ола**, получали по аналогии с [495]. 2,5,7,8-Тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-ил-сукцинимидилкарбонат (1 г, 1.7 ммоль) растворяли в 10 мл абс. дихлорметана. Раствор охлаждали до 0°C и добавляли при перемешивании аминокспирт (1.7 ммоль) и 2 мл абс. пиридина. Реакционную смесь оставляли при комнатной температуре в течение 16 ч, затем добавляли еще одну порцию аминокспирта (1.7 ммоль) и оставляли на 4 ч при комнатной температуре и перемешивании (ТСХ, система Б) (рис. 2.2.1.Г, стадия i). Реакционную смесь упаривали досуха, растворяли в 50 мл дихлорметана, экстрагировали насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (50 мл) и водой (50 мл). Органический слой сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (б/в) и упаривали досуха. Продукт реакции выделяли хроматографией на силикагеле, используя для элюции градиент концентрации этанола (0-7 %) в дихлорметане.

**3-[2,5,7,8-Тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-оксикарбонил]-аминопропан-1-ол.** Выход 82 %. R<sub>f</sub> 0.2 (система Б). <sup>1</sup>H-ЯМР (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 2.01 (с, 3Н, -CH<sub>3</sub>, токоферол), 2.07 (д, 6Н, 2 (-CH<sub>3</sub>), токоферол), 2.55 (т, 2Н, 4,4-Н, токоферол), 3.44 (квартет, 2Н, -CH<sub>2</sub>-, линкер), 3.7 (т, 2Н, -CH<sub>2</sub>-, линкер).

**6-[2,5,7,8-Тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-оксикарбонил]-аминогексан-1-ол.** Выход 76 %. R<sub>f</sub> 0.38 (система Б). <sup>1</sup>H-ЯМР (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 2.0

(с, 3Н, -CH<sub>3</sub>, токоферол), 2.06 (д, 6Н, 2 (-CH<sub>3</sub>), токоферол), 2.56 (т, 2Н, 4,4-Н, токоферол), 3.25 (квартет, 2Н, -CH<sub>2</sub>-, линкер), 3.61 (т, 2Н, -CH<sub>2</sub>-, линкер).

### 3.3.1.1.5. Синтез Н-фосфонатов липофильных соединений (2.2.2.I-2.2.2.XV)

Н-Фосфонаты липофильных соединений синтезировали по аналогии с [544]. Имидазол (1 г, 14.7 ммоль) растворяли в 20 мл абс. ацетонитрила, охлаждали до 0°C и при охлаждении и перемешивании добавляли треххлористый фосфор (0.4 мл, 4.6 ммоль) и абс. триэтиламин (2 мл, 14.2 ммоль), продолжая перемешивание в течение 30 мин. К полученной суспензии триимидазолида фосфора в ацетонитриле при охлаждении добавляли по каплям раствор липофильного соединения (1 ммоль) в 10 мл абс. дихлорметана и продолжали перемешивание при комнатной температуре в течение 1 ч (ТСХ, система В) (рис. 2.2.2). После окончания реакции реакционную смесь разлагали водой (3 мл) и упаривали до маслообразного остатка. Остаток растворяли в дихлорметане (30 мл) и экстрагировали водой (2×20 мл). Органическую фазу после отделения сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (б/в) и упаривали досуха. Продукт реакции выделяли хроматографией на силикагеле с использованием градиента концентрации этанола (10-70 %) в дихлорметане, содержащем 0.1 % триэтиламина.

**Н-Фосфонат холестерина (2.2.2.I)** (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 94 %. R<sub>f</sub> 0.1 (система Г). <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>), d, м. д: 2.2 (J<sub>P-H</sub> 621.5 Гц). ESI-MS: *m/z* 552.0 [M+H]<sup>+</sup> (вычислено 552.3, C<sub>33</sub>H<sub>63</sub>PO<sub>3</sub>N).

**Н-Фосфонат 3-(холестерилоксикарбонил)-аминопропан-1-ола (2.2.2.II)** (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 41.0 %. R<sub>f</sub> 0.1 (система Г). <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>), d, м. д: 3.2 (J<sub>P-H</sub> 616.0 Гц). ESI-MS: *m/z* 653.3 [M+H]<sup>+</sup> (вычислено 653.9, C<sub>37</sub>H<sub>70</sub>PO<sub>5</sub>N).

**Н-Фосфонат 6-(холестерилоксикарбонил)-аминогексан-1-ола (2.2.2.III)** (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 83.4 %. R<sub>f</sub> 0.1 (система Г). <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>), d, м. д: 5.0 (J<sub>P-H</sub> 628.5 Гц). ESI-MS: *m/z* 695.0 [M+H]<sup>+</sup> (вычислено 695.5, C<sub>40</sub>H<sub>76</sub>PO<sub>5</sub>N).

**Н-Фосфонат 8-(холестерилоксикарбонил)-аминооктан-1-ола (2.2.2.IV)** (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 71 %. R<sub>f</sub> 0.12 (система Г). <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>), d, м. д: 4.5 (J<sub>P-H</sub> 617.9 Гц). MALDI-TOF-MS: *m/z* 723.55 [M+H]<sup>+</sup> (вычислено 723.5, C<sub>42</sub>H<sub>80</sub>PO<sub>5</sub>N).

**Н-Фосфонат 10-(холестерилоксикарбонил)-аминодекан-1-ола (2.2.2.V)** (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 68 %. R<sub>f</sub> 0.15 (система Г). <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>), d, м. д: 4.6 (J<sub>P-H</sub> 617.3 Гц). MALDI-TOF-MS: *m/z* 751.56 [M+H]<sup>+</sup> (вычислено 751.5, C<sub>44</sub>H<sub>84</sub>PO<sub>5</sub>N).

**Н-Фосфонат 12-(холестерилоксикарбонил)-аминододекан-1-ола (2.2.2.VI)** (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 75 %. R<sub>f</sub> 0.17 (система Г). <sup>31</sup>P-ЯМР (CDCl<sub>3</sub>), d, м. д: 4.6 (J<sub>P-H</sub> 625.6 Гц). MALDI-TOF-MS: *m/z* 779.61 [M+H]<sup>+</sup> (вычислено 779.5, C<sub>46</sub>H<sub>88</sub>PO<sub>5</sub>N).

***H-Фосфонат N-(3-гидроксипропил)-3 $\alpha$ -ацетокси-5 $\beta$ -холан-24-амида (2.2.2.VII)*** (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 56.0 %.  $R_f$  0.1 (система Г).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ), d, м. д: 4.4 ( $J_{\text{P-H}}$  620.0 Гц). ESI-MS:  $m/z$  641.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (вычислено 641.9,  $\text{C}_{35}\text{H}_{66}\text{PO}_6\text{N}_2$ ).

***H-Фосфонат N-(6-гидроксигексил)-3 $\alpha$ -ацетокси-5 $\beta$ -холан-24-амида (2.2.2.VIII)*** (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 85.3 %.  $R_f$  0.1 (система Г).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ), d, м. д: 4.8 ( $J_{\text{P-H}}$  619.0 Гц). ESI-MS:  $m/z$  683.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (вычислено 683.5,  $\text{C}_{38}\text{H}_{72}\text{PO}_6\text{N}_2$ ).

***H-Фосфонат цис-N-(октадец-9-енил)-3 $\alpha$ -гидрокси-5 $\beta$ -холан-24-амида (2.2.2.IX)*** (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 79.0 %.  $R_f$  0.1 (система Г).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ), d, м. д: 0.75 ( $J_{\text{P-H}}$  627.0 Гц). ESI-MS:  $m/z$  790.9  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (вычислено 791.2,  $\text{C}_{48}\text{H}_{91}\text{PO}_4\text{N}_2$ ).

***H-Фосфонат цис-N-(октадец-9-енил)-3 $\alpha$ -O-(3-гидроксипропиламинокарбонил)-5 $\beta$ -холан-24-амида (2.2.2.X)*** (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 66.5 %.  $R_f$  0.1 (система Г).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ), d, м. д: 4.8 ( $J_{\text{P-H}}$  628.5 Гц). ESI-MS:  $m/z$  892.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (вычислено 892.3,  $\text{C}_{52}\text{H}_{98}\text{PO}_6\text{N}_3$ ).

***H-Фосфонат цис-N-(октадец-9-енил)-3 $\alpha$ -O-(6-гидроксигексиламинокарбонил)-5 $\beta$ -холан-24-амида (2.2.2.XI)*** (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 83.0 %.  $R_f$  0.1 (система Г).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ), d, м. д: 5.0 ( $J_{\text{P-H}}$  623.0 Гц). ESI-MS:  $m/z$  935.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (вычислено 934.4,  $\text{C}_{55}\text{H}_{104}\text{PO}_6\text{N}_3$ ).

***H-Фосфонат 2,5,7,8-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-ола (2.2.2.XII)*** (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 83.3 %.  $R_f$  0.1 (система Г).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ), d, м. д: 1.2 ( $J_{\text{P-H}}$  636.0 Гц). ESI-MS:  $m/z$  596.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (вычислено 596.9,  $\text{C}_{35}\text{H}_{67}\text{PO}_4\text{N}$ ).

***H-Фосфонат 3-[2,5,7,8-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-оксикарбонил]-аминопропан-1-ола (2.2.2.XIII)*** (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 81.8 %.  $R_f$  0.1 (система Г).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ), d, м. д: 5.1 ( $J_{\text{P-H}}$  615.7 Гц). ESI-MS:  $m/z$  697.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (вычислено 697.5,  $\text{C}_{39}\text{H}_{74}\text{PO}_6\text{N}_2$ ).

***H-Фосфонат 6-[2,5,7,8-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-оксикарбонил]-аминогексан-1-ола (2.2.2.XIV)*** (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 75.8 %.  $R_f$  0.1 (система Г).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ), d, м. д: 4.9 ( $J_{\text{P-H}}$  610.8 Гц). ESI-MS:  $m/z$  739.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (вычислено 739.6,  $\text{C}_{42}\text{H}_{80}\text{PO}_6\text{N}_2$ ).

***H-Фосфонат цис-октадец-9-ен-1-ола (2.2.2.XV)*** (в виде триэтиламмониевой соли). Выход 54.0 %.  $R_f$  0.1 (система Г).  $^{31}\text{P}$ -ЯМР ( $\text{CDCl}_3$ ), d, м. д: 3.1 ( $J_{\text{P-H}}$  630.0 Гц). ESI-MS:  $m/z$  434.0  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (вычислено 434.6,  $\text{C}_{24}\text{H}_{53}\text{PO}_3\text{N}$ ).

### 3.3.1.1.6. Проверка реакционной способности Н-фосфонатов липофильных соединений (2.2.2.I-2.2.2.XV)

Полученные Н-фосфонаты (2.2.2.I-2.2.2.XV) (1.5 мкмоль) растворяли в 100 мкл абс. дихлорметана и добавляли к раствору 5'-*O*-диметокситритил-2'-*O*-трет-бутилдиметилсилил-уридина (1 мг, 1.5 мкмоль) в 200 мкл смеси абс. ацетонитрил:пиридин (1:1), затем добавляли пивалоилхлорид (3.8 мкл, 31 мкмоль) и выдерживали 10 мин при комнатной температуре. Отбирали 20 мкл реакционной смеси, добавляли к ней 50 мкл 0.1 М раствора I<sub>2</sub> в смеси пиридин:вода (98:2) и выдерживали 10 мин (ТСХ, система В).

### 3.3.1.2. Синтез гидразидов *N*-(холестерилоксикарбонил)-6-аминогексановой кислоты (2.3.VII) и 6-[2,5,7,6-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-илокси-карбонил]-аминогексановой кислоты (2.3.VIII)

(для раздела 2.3)

Синтез гидразида *N*-(холестерилоксикарбонил)-6-аминогексановой кислоты был разработан Довыденко И.С. (ЛХРНК ИХБФМ СО РАН) и описан в [364]. Синтез гидразида 6-[2,5,7,6-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-илоксикарбонил]-аминогексановой кислоты вели по аналогии с [364] с некоторыми модификациями (рис. 2.2.3).

### Синтез 2,5,7,8-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-ил-сукцинимидилкарбоната (2.3.I)

Синтез вели по аналогии с [495]. 2,5,7,8-Тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-ол (1.1 г, 2.6 ммоль) растворяли в 10 мл абс. дихлорметана, к полученному раствору добавляли 2.1 мл абс. триэтиламина, 5.2 мл абс. ацетонитрила, *N,N*-дисукцинимидилкарбонат (0.7 г, 2.7 ммоль) и оставляли при перемешивании на 24 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь промывали насыщенным раствором NaHCO<sub>3</sub> (2×20 мл) и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (б/в). Полученное соединение (2.3.I) (1.3 г; R<sub>f</sub> 0.43, система Б) использовали далее в синтезе без дополнительной очистки.

### Синтез (*N*-холестерилоксикарбонил)-6-аминогексановой кислоты (2.3.III) и 6-[2,5,7,6-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-илоксикарбонил]-аминогексановой кислоты (2.3.IV)

6-Аминогексановую кислоту (2.3.II) (0.42 г, 3.2 ммоль) суспендировали в 10 мл абс. пиридина. К полученной суспензии добавляли по каплям триметилхлорсилан (1.6 мл, 12.6 ммоль) при 0°C и перемешивании, после чего смесь выдерживали в тех же условиях до растворения взвеси 6-аминогексановой кислоты. Затем к реакционной смеси добавляли холестерилхлорформиат (0.7 г, 1.6 ммоль) или полученный ранее 2,5,7,8-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-ил-сукцинимидилкарбонат (2.3.I) (0.45 г, 0.8 ммоль)

и перемешивали еще 3 ч при комнатной температуре (ТСХ, система Б). После удаления пиридина при пониженном давлении, остаток растворяли в дихлорметане (100 мл), промывали последовательно соляной кислотой (0.7 М, 50 мл), водой (50 мл) и насыщенным раствором NaCl (50 мл). Полученную органическую фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (б/в) и упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле, используя для элюции градиент концентрации этанола (0-30 % для производного холестерина и 0-10 % для производного токоферола).

***N*-(холестерилоксикарбонил)-6-аминогексановая кислота (2.3.III).** Выход 82 %. R<sub>f</sub> 0.49 (система Б). <sup>1</sup>H-ЯМР (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 0.69 (с, 3H, H-18/19, холестерин); 0.87 (д, 3H, H-26/27, холестерин); 0.89 (д, 3H, H-26/27, холестерин); 0.93 (д, 3H, H-21, холестерин); 1.025 (с, 3H, H-18/19, холестерин); 2.33 (т, 2H, -CH<sub>2</sub>-COOH); 3.35 (дд, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH-); 4.51 (м, 1H, H-3, холестерин); 4.88 (т, 1H, -NH-); 5.4 (д, 1H, H-6, холестерин).

***6*-[2,5,7,6-тетрамethyl-2-(4',8',12'-тримethylтридецил)-хроман-6-илокси-карбонил]-аминогексановая кислота (2.3.IV).** Выход 80 %. R<sub>f</sub> 0.31 (система Б). <sup>1</sup>H-ЯМР (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 2.02 (с, 3H, -CH<sub>3</sub>, α-токоферол); 2.06 (с, 3H, -CH<sub>3</sub>, α-токоферол); 2.08 (с, 3H, -CH<sub>3</sub>, α-токоферол); 2.37 (т, 2H, -CH<sub>2</sub>-COOH); 2.58 (т, 2H, 4,4-H, α-токоферол); 3.27 (дд, 2H, -CH<sub>2</sub>-NH-); 5.09 (т, 1H, -NH-). <sup>13</sup>C-ЯМР (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm): 179.0, 155.0, 149.0, 140.1, 127.5, 125.7, 122.7, 117.1, 74.9, 40.8, 39.9, 39.3, 37.3, 33.7, 32.6, 31.0, 29.6, 27.8, 26.0, 24.7, 24.3, 24.1, 23.8, 22.6, 20.9, 20.4, 19.5, 12.7, 11.8, 11.7. ESI-MS (*m/z*, C<sub>36</sub>H<sub>61</sub>NO<sub>5</sub>): [M-H]<sup>-</sup> рассчитано: 586.89, получено: 586.50.

**Синтез метиловых эфиров *N*-(холестерилоксикарбонил)-6-аминогексановой кислоты (2.3.V) и 6-[2,5,7,6-тетрамethyl-2-(4',8',12'-тримethylтридецил)-хроман-6-илоксикарбонил]-аминогексановой кислоты (2.3.VI)**

*N*-(Холестерилоксикарбонил)-6-аминогексановую кислоту (0.35 г, 0.65 ммоль) или 6-[2,5,7,6-тетрамethyl-2-(4',8',12'-тримethylтридецил)-хроман-6-илоксикарбонил]-аминогексановую кислоту (0.36 г, 0.65 ммоль) растворяли в 8 мл абс. дихлорметана, к полученному раствору добавляли трихлорид фосфора (60 мкл, 0.69 ммоль) и оставляли на 16 ч при перемешивании при комнатной температуре. К реакционной смеси добавляли 1 мл абс. метанол, промывали водой (2×50 мл), насыщенным водным раствором NaHCO<sub>3</sub> (2×50 мл) и водой (3×100 мл). Органическую фазу сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (б/в) и упаривали до маслообразного остатка. Продукты очищали методом колоночной хроматографии на силикагеле в градиенте концентрации этанола (0-2.5 % для производного холестерина и 0-1 % для производного токоферола) в дихлорметане.

**Метиловый эфир *N*-(холестерилоксикарбонил)-6-аминогексановой кислоты (2.3.V).** Выход 80 %.  $R_f$  0.63 (система Б);  $^1\text{H}$ -ЯМР (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.69 (с, 3H, H-18/19, холестерин); 0.87 (д, 3H, H-26/27, холестерин); 0.89 (д, 3H, H-26/27, холестерин); 0.93 (д, 3H, H-21, холестерин); 1.02 (с, 3H, H-18/19, холестерин); 2.29 (т, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$ ); 3.35 (дд, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ); 3.65 (с, 3H,  $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$ ); 4.51 (м, 1H, H-3, холестерин); 4.88 (т, 1H,  $-\text{NH}-$ ); 5.4 (д, 1H, H-6, холестерин).

**Метиловый эфир 6-[2,5,7,6-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-илоксикарбонил]-аминогексановой кислоты (2.3.VI).** Выход 90 %.  $R_f$  0.67 (система Б);  $^1\text{H}$ -ЯМР (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 2.01 (с, 3H,  $-\text{CH}_3$ ,  $\alpha$ -токоферол); 2.05 (с, 3H,  $-\text{CH}_3$ ,  $\alpha$ -токоферол); 2.08 (с, 3H,  $-\text{CH}_3$ ,  $\alpha$ -токоферол); 2.33 (т, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$ ); 2.58 (т, 2H, 4,4-H, $\alpha$ -токоферол); 3.27 (дд, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ); 3.67 (с, 3H,  $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$ ); 5.06 (т, 1H,  $-\text{NH}-$ ).  $^{13}\text{C}$ -ЯМР (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 173.9, 154.8, 149.1, 140.2, 127.5, 125.7, 122.7, 117.1, 74.9, 51.4, 40.8, 39.9, 39.2, 37.3, 33.8, 32.6, 31.0, 29.5, 27.9, 26.0, 24.7, 24.4, 23.8, 22.6, 20.9, 20.4, 19.6, 12.7, 11.7, 11.6. ESI-MS ( $m/z$ ,  $\text{C}_{37}\text{H}_{63}\text{NO}_5$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  рассчитано: 602.92, получено: 601.10;  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  рассчитано: 624.92, получено: 624.20;  $[\text{M}+2\text{Na}]^{+2}$  рассчитано: 647.92, получено: 647.40.

**Синтез гидразидов *N*-(холестерилоксикарбонил)-6-аминогексановой кислоты (2.3.VII) и 6-[2,5,7,6-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-илоксикарбонил]-аминогексановой кислоты (2.3.VIII)**

Метиловый эфир ((2.3.V) или (2.3.VI)) (0.90 ммоль) растворяли в 5 мл абс. метанола, к полученному раствору добавляли по каплям моногидрат гидразина (17 мл, 0.35 моль), полученную реакционную смесь оставляли на 8 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь выливали в холодную воду (100 мл), выпавший осадок фильтровали и сушили на воздухе.

**Гидразид *N*-(холестерилоксикарбонил)-6-аминогексановой кислоты (2.3.VII).** Выход 89 %.  $R_f$  0.77 (система Д);  $^1\text{H}$ -ЯМР (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.69 (с, 3H, H-18/19, холестерин); 0.87 (д, 3H, H-26/27, холестерин); 0.89 (д, 3H, H-26/27, холестерин); 0.93 (д, 3H, H-21, холестерин); 1.025 (с, 3H, H-18/19, холестерин); 2.13 (т, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{NH}_2$ ); 3.35 (дд, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ ); 4.51 (м, 1H, H-3, холестерин); 4.88 (т, 1H,  $-\text{NH}-$ ); 5.4 (д, 1H, H-6, холестерин); 6.75 (с, H,  $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{NH}-\text{NH}_2$ ).

**Гидразид 6-[2,5,7,6-тетраметил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)-хроман-6-илоксикарбонил]-аминогексановой кислоты (2.3.VIII).** Выход 62 %.  $R_f$  0.56 (система Д);  $^1\text{H}$ -ЯМР (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 2.01 (с, 3H,  $-\text{CH}_3$ ,  $\alpha$ -токоферол); 2.05 (с, 3H,  $-\text{CH}_3$ ,  $\alpha$ -токоферол); 2.07 (с, 3H,  $-\text{CH}_3$ ,  $\alpha$ -токоферол); 2.58 (т, 2H, 4,4-H, $\alpha$ -токоферол); 2.66 (т, 2H, -

$\text{CH}_2\text{-C(O)NH-NH}_2$ ); 3.28 (дд, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-NH-}$ ); 5.08 (т, 1H,  $-\text{NH-}$ ); 6.82 (с, H,  $-\text{CH}_2\text{-C(O)NH-NH}_2$ ).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 173.4, 154.9, 149.0, 140.1, 127.4, 125.6, 122.7, 117.1, 74.8, 40.7, 39.9, 39.2, 37.3, 34.0, 32.6, 30.9, 29.5, 27.8, 26.0, 24.7, 24.5, 23.7, 22.5, 20.8, 20.4, 19.5, 12.7, 11.8, 11.6. ESI-MS ( $m/z$ ,  $\text{C}_{36}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_4$ ):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  рассчитано: 602.92, получено: 602.10;  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  рассчитано: 624.92, получено: 624.20.

### 3.3.1.3. Синтез транспортных лигандов, содержащих первичную аминогруппу

(для разделов 2.4, 2.5)

#### $\alpha$ -Токоферил-6-аминогексилкарбамат (рис. 2.4.2.A)

Синтез *N*-гидроксисукцинимидного эфира  $\alpha$ -токоферола вели по аналогии с [495].  $\alpha$ -Токоферол (0.28 г, 0.65 ммоль) растворяли в 10 мл абс. дихлорметана, к полученному раствору добавляли 2 мл абс. триэтиламин, 5 мл абс. ацетонитрил и *N,N'*-дисукцинимидилкарбонат (0.2 г, 0.72 ммоль) и оставляли на 24 ч при перемешивании при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали до сухого остатка. Остаток растворяли в 40 мл дихлорметана и экстрагировали насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  ( $5 \times 20$  мл) и сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (б/в). Полученное соединение (0.3 г;  $R_f$  0.33, система E) использовали далее в синтезе без дополнительной очистки.

Раствор *N*-гидроксисукцинимидного эфира  $\alpha$ -токоферола добавляли к раствору моно-*N-трет*-бутилоксикарбонил-защищенного 1,6-диаминогексана (0.16 г, 0.64 ммоль) и 0.5 мл абс. триэтиламина в 5 мл абс. ацетонитрила. Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре и перемешивании в течении 16 ч. После окончания реакции реакционную смесь упаривали до сухого остатка. Остаток растворяли в 30 мл дихлорметана и экстрагировали водой ( $2 \times 20$  мл). Органическую фазу сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (б/в) и упаривали досуха. Продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, используя для элюции градиент концентрации этилового спирта (0-50 %) в дихлорметане. Выход 86 %,  $R_f$  0.23 (система E).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 2.24 (м, 9H,  $-\text{CH}_3$ ,  $\alpha$ -токоферол, бензольное кольцо), 2.56-2.86 (м, 2H, 4,4-Н- $\alpha$ -токоферол), 3.32 (м, 4H,  $-\text{CH}_2\text{-NH-}$ , линкер).

Для удаления *трет*-бутилоксикарбонильной группы моно-*N-трет*-бутилоксикарбонил-защищенный токоферил-6-аминогексилкарбамат растворяли в 10 мл дихлорметана и к раствору добавляли 0.6 мл трифторуксусной кислоты. Реакцию вели при перемешивании и комнатной температуре 16 ч. После окончания реакции реакционную смесь упаривали до сухого остатка. Остаток растворяли в 30 мл дихлорметана и экстрагировали насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  ( $4 \times 20$  мл). Органическую фазу после отделения сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (б/в) и упаривали досуха. Выход 38 %,  $R_f$  0.05 (система Д).

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 2.24 (м, 9H,  $-\text{CH}_3$ ,  $\alpha$ -токоферол, бензольное кольцо), 2.69 (м, 1H, 4,4-H-  $\alpha$ -токоферол), 2.58 (м, 3H, 4,4-H-токоферол,  $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ , линкер), 3.27 (м, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ , линкер).

#### **Фолат-6-аминогексилкарбамат** (рис. 2.4.2.Б)

Синтез вели по аналогии с [496]. Фолиевую кислоту (0.32 г, 0.72 ммоль) растворяли в 10 мл абс. диметилсульфоксида при 50°C и перемешивании в течение 30 мин. К полученному раствору добавляли *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (0.3 г, 1.44 ммоль) и *N*-гидроксисукцинимид (0.165 г, 1.44 ммоль) и оставляли на 16 ч при перемешивании при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали. Раствор прикапывали к раствору 1,6-диаминогексана (0.25 г, 2.2 ммоль) и абс. триэтиламина (0.31 мл, 0.22 г, 2.2 ммоль) в 5 мл диметилсульфоксида. Через 18 ч к раствору добавляли 30 мл смеси ацетон/диэтиловый эфир (2/8, v/v). Осадок центрифугировали, промывали ацетоном (4×20 мл), диэтиловым эфиром (4×20 мл) и сушили при 2-4 мм рт. ст. Выход 58 %.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $d\text{-DMSO}$ ,  $\delta$ , ppm) 8.63 (с, 1H, птериновый фрагмент), 7.98 м, 1H), 7.56–7.67 (м, 2H, ароматика), 6.93 (м, 3H), 6.57–6.63 (м, 2H, ароматика), 4.20–4.30 (м, 1H), 2.97–3.01 (м, 6H,  $-\text{CH}_2-$ ), 2.72–2.76 (м, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ), 2.33 (м, 4H, глутаминовый фрагмент).

#### **Холестерил-6-аминогексилкарбамат и холестерил-12-аминододеканилкарбамат** (рис. 2.4.2.В)

Синтез проводили по аналогии с [497]. Раствор, содержащий 8 мл абс. дихлорметана и 0.8 мл диизопропилэтиламина, добавляли при перемешивании к 1,6-диаминогексану (0.49 г, 4.25 ммоль) или 1,12-диаминододекану (0.85 г, 4.25 ммоль). Охлаждали во льду до 0°C и по каплям добавляли раствор хлорформиата холестерина (0.38 г, 0.85 ммоль) в 2 мл абс. дихлорметана в течение ~20 мин (ТСХ, система В). Через 16 ч реакционную смесь упаривали до сухого остатка. Остаток растворяли в 40 мл дихлорметана и экстрагировали водой (5×20 мл). Органическую фазу после отделения сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (б/в) и упаривали досуха. Продукт выделяли колоночной хроматографией на силикагеле, используя для элюции градиент концентрации этилового спирта (0-50 %) в дихлорметане.

***Холестерил-6-аминогексилкарбамат.*** Выход 74 %,  $R_f$  0.05 (система E).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.64–1.63 (м, 45H, холестерин), 3.19 (квартет, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ , линкер); 5.4 (д, 1H,  $-\text{CH}=\text{C}-$ , холестерин).

***Холестерил-12-аминододеканилкарбамат.*** Выход 45%,  $R_f$  0.05 (система E).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 0.69–1.43 (м, 45H, холестерин), 3.35 (квартет, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ , линкер), 5.4 (д, 1H,  $-\text{CH}=\text{C}-$ , холестерин).

#### ***N*-(6-Аминогексил)-4-метоксибензамид** (рис. 2.5.1)

4-Метоксибензойную кислоту (0.30 г, 2.0 ммоль) растворяли в 12 мл дихлорметана и одновременно добавляли *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (0.83 г, 4.0 ммоль), предварительно растворенный в 10 мл дихлорметана, и 1-гидроксибензотриазол (НОВт, 0.55 г, 4.0 ммоль). Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре и встряхивании в течении 16 ч, центрифугировали и отделяли от осадка. Полученное производное в растворе ( $R_f$  0.6, система А) использовали далее в синтезе без дополнительной очистки.

Раствор НОВт-активированного производного 4-метоксибензойной кислоты добавляли к раствору *N-трет*-бутилоксикарбонил-защищенного 1,6-диаминогексана (0.5 г, 2.0 ммоль) и 1 мл абс. триэтиламина в 5 мл дихлорметана. Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре и встряхивании в течении 16 ч и упаривали. Остаток растворяли в 10 мл дихлорметана и экстрагировали водой (4×20 мл), органический слой сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (б/в) и упаривали до сухого остатка. Продукты реакции выделяли хроматографией на силикагеле, используя для элюции градиент концентрации этилового спирта (0-20 %) в дихлорметане. Выход 42 %,  $R_f$  0.20 (система А).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 1.27-1.48 (м, 15H,  $-\text{CH}_2-$ , линкер,  $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ , Вос-защита), 1.56 (м, 2H,  $-\text{CH}_2-$ , линкер), 3.08 (дд, 2H,  $-\text{CH}_2-$ , линкер), 3.18 (дд, 2H,  $-\text{CH}_2-$ , линкер), 3.85 (с, 3H,  $-\text{O}-\text{CH}_3$ ), 6.8 (дд, 2H,  $-\text{CH}$ ,  $-\text{O}-\text{C}(\text{R})-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$ , бензол), 7.7 (дд, 2H,  $-\text{CH}$ ,  $-\text{O}-\text{C}(\text{R})-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$ , бензол).

Для удаления *трет*-бутилоксикарбонильной группы *N-трет*-бутилоксикарбонил-защищенный *N*-(6-аминогексил)-4-метоксибензамид растворяли в 10 мл дихлорметана и к раствору добавляли 1 мл муравьиной кислоты. Реакцию вели при перемешивании и комнатной температуре 16 ч и упаривали. Остаток растворяли в дихлорметане (30 мл) и экстрагировали насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (4×20 мл). Органическую фазу после отделения сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (б/в) и упаривали досуха. Выход 83 %,  $R_f$  0.05 (система Б).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm): 1.21-1.62 (м, 8H,  $-\text{CH}_2-$ , линкер), 2.73 (дд, 2H,  $-\text{CH}_2-$ , линкер), 3.41 (дд, 2H,  $-\text{CH}_2-$ , линкер), 3.83 (с, 3H,  $-\text{O}-\text{CH}_3$ ), 6.9 (дд, 2H,  $-\text{CH}$ ,  $-\text{O}-\text{C}(\text{R})-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$ , бензол), 7.7 (дд, 2H,  $-\text{CH}$ ,  $-\text{O}-\text{C}(\text{R})-\text{CH}=\text{CH}-\text{C}(\text{R})-\text{C}(\text{O})-$ , бензол).

#### 3.3.1.4. Синтез активированных бензотриазольных производных 4-метоксибензойной, фолиевой и глицирретиновой кислот

(для раздела 2.4)

Синтез проводили по аналогии с [507]. Контроль за ходом реакции вели методом ТСХ.

а) Кислоту (0.01 ммоль; 4-метоксибензойная кислота 1.5 мг; фолиевая кислота 4.4 мг; глицирретиновая кислота 4.7 мг) растворяли в 0.5 мл абс. диметилсульфоксида и

одновременно добавляли 1-гидроксибензотриазол (2.7 мг, 0.02 ммоль) и *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (4.1 мг, 0.02 ммоль), предварительно растворенный в 0.1 мл абс. диметилсульфоксида. В случае фолиевой кислоты для ее растворения в диметилсульфоксиде требовалось нагревание до 40°C при встряхивании в течение 30 мин. Реакционную смесь выдерживали при комнатной температуре и встряхивании (1200 об/мин) в течение 3 ч, центрифугировали и раствор отделяли от осадка.

б) Кислоту (0.01 ммоль; 4-метоксибензойная кислота 1.5 мг; фолиевая кислота 4.4 мг; глицирретиновая кислота 4.7 мг) растворяли в 0.5 мл абс. диметилсульфоксида и одновременно добавляли 1-гидроксибензотриазол (0.01 ммоль, 1.3 мг) и *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (0.01 ммоль, 2.0 мг), предварительно растворенный в 0.1 мл абс. диметилсульфоксида. Далее синтез вели как описано выше в п.3.3.1.4.а).

в) Кислоту (0.01 ммоль; 4-метоксибензойная кислота 1.5 мг; фолиевая кислота 4.4 мг; глицирретиновая кислота 4.7 мг) растворяли в 0.5 мл абс. диметилсульфоксида и одновременно добавляли 1-гидроксибензотриазол (0.7 мг, 0.005 ммоль) и *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (1.0 мг, 0.005 ммоль), предварительно растворенный в 0.1 мл абс. диметилсульфоксида. Далее синтез вели как описано выше в п.3.3.1.4.а).

Полученные бензотриазольные производные кислот в растворе без дополнительной очистки были использованы для обработки 5'-аминосодержащих защищенных носитель-связанных олигонуклеотидов (п.3.3.5.2.2.3, п.3.3.4.2.2.4).

*Бензотриазольное производное 4-метоксибензойной кислоты.*  $R_f$  0.6 (ТСХ, система Б).

*Бензотриазольное производное фолиевой кислоты.*  $R_f$  0.6 (ТСХ, система Ж).

*Бензотриазольное производное глицирретиновой кислоты.*  $R_f$  0.4 (ТСХ, система Б).

### **3.3.2. Твердофазный фосфитамидный синтез олигонуклеотидов различных типов и их производных длиной до 100 и более звеньев**

Качество коммерческих препаратов 5',*N*-защищенных фосфитамидов, используемых в работе, проверяли методом ТСХ (система В) с последующим окрашиванием растворами Дише или нингидрина. Защищенные фосфитамиды и активатор 5-этилтио-1*H*-тетразол перед работой сушили в течении 2 ч над  $P_2O_5$  при 1-2 мм рт. ст. Ацетонитрил, используемый для растворения фосфитамидов и активатора, был перегнан над  $P_2O_5$  и выдержан над гидридом кальция сутки. Толуол, используемый для растворения LNA-фосфитамидов, был перегнан над  $P_2O_5$  и выдержан сутки над молекулярными ситами (3Å). Для приготовления остальных растворов были использованы: ацетонитрил для жидкостной хроматографии ( $\geq 99.8\%$ ) с содержанием воды 0.002-0.03%; тетрагидрофуран (99.7%) с содержанием воды 0.0075-0.03%, стабилизированный бутилгидрокситолуолом (~ 300 ppm); дихлорметан для

жидкостной хроматографии ( $\geq 99.9\%$ ) с содержанием воды менее  $0.01\%$ , стабилизированный 2-метилбут-2-еном ( $\sim 20-50$  ppm) или этанолом ( $<0.3\%$ ); пиридин ( $99.5\%$ ) с содержанием воды менее  $0.01\%$ . Ацетонитрил (независимо от исходных характеристик) для промывочных растворов W1 и W2 выдерживали над ситами не менее двух суток и добавляли сита в соответствующие емкости.

Оптимизацию условий автоматического фосфитамидного синтеза олигорибонуклеотидов длиной до 100 и более звеньев проводили в масштабе  $0.4$  мкмоль для отечественного восьмиколоночного синтезатора ASM-800/800E (Биоссет, Россия):

- *носители* - использовали CPG с порами размером  $500 \text{ \AA}$  и  $1000 \text{ \AA}$  и емкостью по первому присоединенному нуклеозидному звену  $25-45$  и  $12-30$  мкмоль/г, соответственно. Помещали в колонку носитель примерно на  $\frac{3}{4}$ ,  $\frac{2}{3}$  или  $\frac{1}{2}$  ее объема (в зависимости от производителя используемого носителя его масса составляет: для  $\frac{3}{4}$  - около  $15-20$  мг; для  $\frac{2}{3}$  - около  $10-14$  мг; для  $\frac{1}{2}$  - около  $7-10$  мг).

- *стадия детритилирования* - использовали раствор  $3\%$ -ной дихлоруксусной кислоты в дихлорметане (v/v) с общим объемом в диапазоне  $400-800$  мкл и общим временем деблокирования от  $40$  до  $300$  сек. Использование дихлорметана, стабилизированного этанолом, показано только на стадиях промывки (п/п №2, табл. 3.3.2.1 и 3.3.2.2)

- *стадия конденсации* - в качестве активирующих реагентов использовали 5-этилтио-1*H*-тетразол с концентрацией в диапазоне  $0.25-0.4$  М в ацетонитриле или 5-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1*H*-тетразол (Activator 42™) с концентрацией  $0.25$  М в ацетонитриле. Концентрация для дезокси- и 2'-*O*-метилрибонуклеозидфосфитамидов составляла  $0.05$  М в ацетонитриле, для 2'-*O*-TBDMS-, 2'-F- и LNA рибонуклеозидфосфитамидов  $0.05 - 0.1$  М в ацетонитриле; общий объем фосфитамида/активатора варьировали в диапазоне  $50-120$  мкл; общее время конденсации  $120-900$  сек. Растворы фосфитамида и активирующего агента прокачивали порциями со скоростями  $25$  мкл/сек и  $50$  мкл/сек, соответственно, для обеспечения более эффективного перемешивания носителя в колонке (реакторе). Для протоколов, использующих 5-этилтио-1*H*-тетразол (Activator 42™), после  $40$  и  $60$  ( $40$ ,  $60$  и  $80$ ) циклов необходимо увеличивать общий объем фосфитамида на  $15\%$ .

- *стадия кэпирования* - использовали 2 кэпирующих раствора -  $16\%$ -ный раствор *N*-метилимидазола в тетрагидрофуране (CrB) и смесь пропионовый ангидрид/2,6-лутидин/тетрагидрофуран ( $10/10/80$ , v/v/v) (CrA); тетрагидрофуран (независимо от исходных характеристик) перед использованием должен быть выдержан над ситами не менее трех суток; общий объем кэпирующих реагентов варьировали в диапазоне  $50-200$

мкл; общее время кэпирования - 40-170 сек. Растворы СрА и СрВ прокачивали порциями со скоростями 25 мкл/сек и 50 мкл/сек, соответственно, для обеспечения более эффективного перемешивания носителя в колонке (реакторе).

- *стадия окисления* – для окисления фосфиттриэфира в фосфаттриэфир использовали 0.016-0.025 М раствор  $I_2$  в смеси тетрагидрофуран/пиридин/вода (90/1/9, v/v/v); общий объем окисляющего реагента варьировали в диапазоне 60-150 мкл; общее время окисления - 20-120 сек.

В таблице 3.3.2.1 (3.3.2.2) представлен базовый протокол операций автоматического фосфитамидного синтеза олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов длиной до 40 (100) звеньев в масштабе 0.4 мкмоль с использованием 5-этилтио-1*H*-тетразола (Activator 42™) в качестве активирующего реагента. В результате операций 1-12 получали носитель-связанные защищенные олигонуклеотиды, не содержащие 5'-*O*-диметокситритильной защитной группы.

**Таблица 3.3.2.1.** Базовый протокол операций автоматического фосфитамидного синтеза олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов длиной до 40 звеньев с использованием 5-этилтио-1*H*-тетразола в качестве активирующего реагента.

| п/п | Операция                          | Реагент                                                                                                                                             | Кол-во, мкл | Время, сек              |
|-----|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------------------|
| 1.  | Промывка                          | $CH_3CN^{\#}$ (емкость W2)                                                                                                                          |             |                         |
| 2.  | Промывка                          | $CH_2Cl_2$                                                                                                                                          |             |                         |
| 3.  | Детритилирование                  | 3% дихлоруксусная кислота в $CH_2Cl_2$                                                                                                              | 420         | 100                     |
| 4.  | Промывка                          | $CH_3CN^{\#}$ (емкость W2)                                                                                                                          |             |                         |
| 5.  | Промывка                          | $CH_3CN^{\#}$ (емкость W1)                                                                                                                          |             |                         |
| 6.  | Конденсация                       | 0.1 М (0.05 М)* раствор фосфитамида в $CH_3CN^{\#}$ ,<br>0.25 М раствор 5-этилтио-1 <i>H</i> -тетразола в $CH_3CN^{\#}$                             | 60<br>110   | 600<br>(300)<br>(660)** |
| 7.  | Промывка                          | $CH_3CN^{\#}$ (емкость W2)                                                                                                                          |             |                         |
| 8.  | Кэпирование                       | СрВ ( <i>N</i> -метилимидазол/ тетрагидрофуран, 16/84, v/v) <sup>#</sup><br>СрА ( $(CH_3CH_2CO)_2O$ /2,6-лутидин/ тетрагидрофуран, 10/10/80, v/v/v) | 125<br>115  | 110                     |
| 9.  | Промывка                          | $CH_3CN^{\#}$ (емкость W2)                                                                                                                          |             |                         |
| 10. | Окисление                         | 0.02 М $I_2$ в тетрагидрофуран/пиридин/вода (90/1/9, v/v/v)                                                                                         | 110         | 70<br>(240***)          |
| 11. | Повторить п. 1-10                 |                                                                                                                                                     |             |                         |
| 12. | Конец синтеза<br>Повторить п. 1-4 |                                                                                                                                                     |             |                         |

\* для 2'-OTBDMS, 2'-F и LNA рибонуклеозидфосфитаминов использовали 0.1М растворы, для 2'-ОМе-рибонуклеозидфосфитаминов – 0.05М растворы,  
 \*\* время конденсации для 2'-OTBDMS, 2'-F рибонуклеозидфосфитаминов – 600 сек, для 2'-ОМе-рибонуклеозидфосфитаминов – 300 сек, для LNA рибонуклеозидфосфитаминов – 660 сек;  
 \*\*\* время окисления для LNA рибонуклеозидфосфитаминов;  
 # для дополнительного осушения растворов в соответствующие емкости добавляли молекулярные сита (Molecular Serve, 3Å).

**Таблица 3.3.2.2.** Базовый протокол операций автоматического фосфитамидного синтеза олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов длиной до 100 звеньев с использованием Activator 42™ в качестве активирующего реагента.

| п/п | Операция                          | Реагент                                                                                                                                                                      | Кол-во, мкл | Время, сек |
|-----|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|------------|
| 1.  | Промывка                          | CH <sub>3</sub> CN <sup>#</sup> (емкость W2)                                                                                                                                 |             |            |
| 2.  | Промывка                          | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>                                                                                                                                              |             |            |
| 3.  | Детритилирование                  | 3% дихлоруксусная кислота в CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>                                                                                                                  | 480         | 110        |
| 4.  | Промывка                          | CH <sub>3</sub> CN <sup>#</sup> (емкость W2)                                                                                                                                 |             |            |
| 5.  | Промывка                          | CH <sub>3</sub> CN <sup>#</sup> (емкость W1)                                                                                                                                 |             |            |
| 6.  | Конденсация                       | 0.1 М (0.05 М)* раствор фосфитамида в CH <sub>3</sub> CN <sup>#</sup> ,<br>0.25 М раствор Activator 42™                                                                      | 90<br>140   | 360        |
| 7.  | Промывка                          | CH <sub>3</sub> CN <sup>#</sup> (емкость W2)                                                                                                                                 |             |            |
| 8.  | Кэпирование                       | CrB (N-метилимидазол/ тетрагидрофуран, 16/84, v/v) <sup>#</sup><br>CrA (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CO) <sub>2</sub> O/2,6-лутидин/ тетрагидрофуран,<br>10/10/80, v/v/v) | 155<br>135  | 110        |
| 9.  | Промывка                          | CH <sub>3</sub> CN <sup>#</sup> (емкость W2)                                                                                                                                 |             |            |
| 10. | Окисление                         | 0.02 М I <sub>2</sub> в тетрагидрофуран/пиридин/вода (90/1/9,<br>v/v/v)                                                                                                      | 130         | 100        |
| 11. | Повторить п. 1-10                 |                                                                                                                                                                              |             |            |
| 12. | Конец синтеза<br>Повторить п. 1-4 |                                                                                                                                                                              |             |            |

\* для 2'-OTBDMS- и 2'-F-рибонуклеозидфосфитамидов использовали 0.1М растворы, для 2'-OMe-рибонуклеозидфосфитамидов – 0.05М растворы;  
<sup>#</sup> для дополнительного осушения растворов в соответствующие емкости добавляли молекулярные сита (Molecular Serve, 3Å).

Полученные автоматическим фосфитамидным методом защищенные носитель-связанные олигонуклеотиды сушили для удаления следов ацетонитрила в течение 2 мин с помощью мембранного насоса (DOA V130 BN, Waters, США). Часть носитель-связанных олигонуклеотидов использовали для разработки твердофазных подходов к синтезу 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с низкомолекулярными ФМ (п.п.3.3.3-3.3.6), часть полностью деблокировали (п.3.2.2.2.а-д, 3.2.2.3.а) и выделяли препаративным гелем-электрофорезом (п.3.2.6).

### 3.3.3. Синтез и исследование свойств 5'-липофильных конъюгатов олигонуклеотидов, полученных исходя из носитель-связанных олигонуклеотидов и Н-фосфонатов липофильных соединений

Н-Фосфонаты липофильных соединений (2.2.2.I-2.2.2.XV, рис.2.2.2) и носитель-связанные защищенные олигонуклеотиды (гептадезоксинуклеотид dT<sub>7</sub>, 21-звенная сенсорная цепь siРНК), полученные согласно п.3.3.2, сушили над Р<sub>2</sub>О<sub>5</sub> при 2-4 мм рт. ст. В работе были использованы: ацетонитрил и пиридин, выдержанные сутки над гидридом кальция; дихлорметан, стабилизированный 2-метилбут-2-еном (~ 20 ppm).

### 3.3.3.1. Оптимизация условий твердофазного синтеза 5'-липофильных конъюгатов олигонуклеотидов

Н-Фосфонат холестерина (2.2.2.I) (7.5 мкмоль) растворяли в 150 мкл абс. дихлорметана. К высушенной навеске (5 мг, 0.16 мкмоль; 10 мг, 0.33 мкмоль или 20 мг, 0.66 мкмоль) носитель-связанного олигонуклеотида dT<sub>7</sub> добавляли 150 мкл смеси пиридин:ацетонитрил (2:1) или пиридин:дихлорметан (2:1), 50 мкл раствора Н-фосфоната (2.5 мкмоль) в дихлорметане и пивалоилхлорид (1.5 мкл, 12.5 мкмоль). Смесь выдерживали 15 мин в атмосфере аргона при комнатной температуре и встряхивании, супернатант отбирали, носитель промывали абс. ацетонитрилом (2×800 мкл), повторяли конденсацию еще один или два раза. Носитель промывали ацетоном (2×800 мкл) и сушили на воздухе в течение 15 мин. Добавляли 200 мкл 0.1 М раствора I<sub>2</sub> в смеси пиридин:вода (98:2), выдерживали 20 мин при комнатной температуре и встряхивании, промывали ацетоном (5×800 мкл) и сушили на воздухе. Далее проводили деблокирование (п.3.2.2.1.е) и анализ реакционных смесей в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5).

### 3.3.3.2. Твердофазный синтез 5'-липофильных конъюгатов олигонуклеотидов

Н-Фосфонат (2.2.2.I-2.2.2.XV) (7.5 мкмоль) растворяли в 150 мкл абс. дихлорметана. К высушенной навеске (20 мг, 0.5 мкмоль) носитель-связанного олигонуклеотида, представляющего собой сенс-цепь siРНК, добавляли 150 мкл смеси пиридин:ацетонитрил (2:1), 50 мкл раствора Н-фосфоната в дихлорметане и пивалоилхлорид (1.5 мкл, 12.5 мкмоль). Смесь выдерживали 15 мин в атмосфере аргона при комнатной температуре и встряхивании, супернатант отбирали, носитель промывали абс. ацетонитрилом (2×800 мкл), повторяли конденсацию еще два раза. Носитель промывали дихлорметаном (2×800 мкл), ацетоном (2×800 мкл) и сушили на воздухе в течение 15 мин. Добавляли 200 мкл 0.1 М раствора I<sub>2</sub> в смеси пиридин:вода (98:2), выдерживали 20 мин при комнатной температуре и встряхивании, промывали ацетоном (5×800 мкл) и сушили на воздухе. Проводили удаление защитных групп и отделение конъюгата олигонуклеотида от носителя (п.3.2.2.2.а-в, 3.2.2.3.а) с последующим анализом реакционных смесей в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5). Конъюгаты (1-5, 9-15, табл. 2.2.1) выделяли в 12 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.6), конъюгаты (6-8, табл. 2.2.1) выделяли препаративной ОФ ВЭЖХ (п.3.2.7).

### 3.3.3.3. Формирование дуплексов siРНК

(для раздела 2.2)

Смесь, содержащую антисмысловую (5'-AU<sup>m</sup>AU<sup>m</sup>AC<sup>m</sup>AACUU<sup>m</sup>GUC<sup>m</sup>AAGCC<sup>m</sup>AA-3') и смысловую (1-15, табл. 2.2.1) цепи siРНК (рис. 2.2.4) в равных концентрациях (50 мкМ) в буфере, содержащем 30 мМ HEPES-КОН (pH 7.4), 100 мМ ацетат калия и 2 мМ ацетат

магния, инкубировали при 95°C в течение 3 мин, после чего медленно охлаждали до комнатной температуры в течение 1 ч (рис. 2.2.5). Дуплексы хранили при -20°C.

#### **3.3.3.4. Определение температуры плавления siРНК**

(для раздела 2.2)

Исследование термической стабильности siРНК проводили в буфере, содержащем 30 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 100 mM ацетат калия и 2 mM ацетат магния при концентрации siРНК 2.5 мкМ. Кривые термической денатурации дуплексов были получены Ломзовым А. А. (ИХБФМ СО РАН) на установке UV BioMelt на базе спектрофотометра Cary 300 UV-Vis (Varian, Inc., США). Увеличение температуры производилось со скоростью 0.5°C/с, диапазон температур: 5 – 95°C. Измерение оптической плотности проводили на длинах волн 260 нм и 270 нм. Значения температур плавления siРНК соответствовали максимумам графиков первой производной интегральных кривых термической денатурации (табл. 2.2.1).

#### **3.3.4. Твердофазный синтез и исследование свойств 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с липофильными функциональными молекулами, введенными посредством кислотолабильной гидразоновой связи**

(для раздела 2.3)

Альдегидную группу на 5'-конец носитель-связанных защищенных олигонуклеотидов различных типов (гептадезоксинуклеотид dT<sub>7</sub>, 21-звенная сенс-цепь siРНК, антирепликативные РНК, гидовые РНК и sgРНК для системы CRISPR/Cas12a), полученных согласно п.3.3.2, вводили на синтезаторе ASM-800 ("Биоссет", Россия) твердофазным фосфитамидным методом, используя на последнем синтетическом цикле стандартный протокол (п.п.1-10, табл. 3.3.2.1, п.3.3.2) и 5'-альдегидный C2 фосфитамидный модификатор (0.1 М раствор в ацетонитриле, время конденсации 10 мин), исключая стадию финального детритилирования (п.12, табл. 3.3.2.1, п.3.3.2).

Полученные носитель-связанные 5'-ацетальдегидсодержащие олигонуклеотиды сушили для удаления следов ацетонитрила в течение 2 мин с помощью мембранного насоса (DOA V130 BN, Waters, США), затем либо удаляли с носителя с одновременным деблокированием экзоциклических аминогрупп и межнуклеозидных фосфатов (п.3.2.2.1.а-в), деблокированием 2'-гидроксильных групп (в случае необходимости, п.3.2.2.2.а), и последующим деблокированием альдегидной группы (п.3.2.2.3), либо деблокировали только 5'-альдегидную группу (п.3.2.2.4) и полученный защищенный носитель-связанный олигонуклеотид использовали для синтеза липофильных конъюгатов (п.3.3.4.1, п.3.3.4.2).

В работе был использован диоксан, перегнанный над гидридом кальция и выдержанный сутки над гидроксидом натрия.

#### **3.3.4.1. Оптимизация условий твердофазного синтеза олигонуклеотидных липофильных конъюгатов, содержащих -NH-N=CH- фрагмент**

а) Для изучения стабильности гидразоновой связи при различных условиях деблокирования мы использовали контрольный конъюгат 5'-Хол-dT<sub>7</sub>, полученный методом "в растворе", предложенным ранее в нашей лаборатории [364].

Сухие пробы (каждая по 0.01 мкмоль, осаждены 2 %-ным раствором NaClO<sub>4</sub> в ацетоне) незащищенного 5'-Хол-dT<sub>7</sub> обрабатывали в следующих условиях [438, 545]: (1) 400 мкл 30 %-ного водного раствора NH<sub>3</sub> при 55°C в течение 16 ч; (2) 400 мкл смеси АМА (40%-ный водный раствор метиламина/30%-ный водный раствор аммиака, 1/1, v/v) при 65°C в течение 15 мин; (3) 400 мкл смеси АМА при комнатной температуре в течение 16 ч; (4) 400 мкл 0.05 М K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в метаноле при комнатной температуре в течение 16 ч; (5) 200 мкл смеси N-метил-2-пирролидон/(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N/(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>N·3HF (150/75/100, v/v/v) при температуре 65°C в течение 1.5 ч. В конце реакции растворы (1)–(3) упаривали досуха; раствор (4) нейтрализовали уксусной кислотой, осаждали 2 %-ным раствором NaClO<sub>4</sub> в ацетоне и осадок промывали ацетоном; к раствору (5) добавляли этокситриметилсилан для остановки реакции, полученный осадок промывали ацетоном. Полученные сухие остатки растворяли в 0.1 М натрий ацетатном буфере (pH 7.0), анализировали в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5).

б) Модельный полностью защищенный 5'-ацетальдегидсодержащий носитель-связанный dT<sub>7</sub> (20 мг) инкубировали в 400 мкл 80 %-ной уксусной кислоты 1 ч при комнатной температуре для удаления ацетальной защитной группы, носитель промывали водой (3×200 мкл) и ацетоном (2×200 мкл) и высушивали. Для выбора оптимальных условий конъюгирования, полученный носитель-связанный 5'-альдегид-dT<sub>7</sub> разделяли на 9 порций (2 мг, около 0.06 мкмоль), добавляли гидразид холестерина (2.2.2.VII, рис. 2.2.2) (0.35 мг, 0.6 мкмоль) и перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре в условиях, варьирующих концентрацию натрий ацетатного буфера с pH 5.2 (0.1 М, 0.5 М и 1 М) и соотношение буфер:диоксан (1:1, 1:3, 1:9). Общий объем каждой порции составлял 0.1 мл. Носитель-связанный 5'-холестеринсодержащий конъюгат dT<sub>7</sub>, из каждой порции, промывали диоксаном (3×200 мкл), ацетонитрилом (2×200 мкл) и ацетоном (2×200 мкл), а затем высушивали при комнатной температуре. Конъюгат отщепляли от носителя 0.05 М K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в метаноле при комнатной температуре в течение 16 ч, нейтрализовали уксусной кислотой, осаждали 2 %-ным раствором NaClO<sub>4</sub> в ацетоне и промывали ацетоном.

Полученные сухие остатки растворяли в 0.1 М натрий ацетатном буфере (pH 7.0), анализировали в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5).

#### **3.3.4.2. Твердофазный синтез липофильных конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих кислотолabile -NH-N=CH- связь и ее восстановленный pH-независимый (-NH-NH-CH<sub>2</sub>-) аналог**

а) Носитель-связанный защищенный олигонуклеотид, несущий защищенную 5'-альдегидную группу (10 мг, 0.25-0.35 мкмоль), инкубировали в 400 мкл 80 %-ной уксусной кислоты в течение 1 ч при комнатной температуре для удаления ацетальной защитной группы. Носитель промывали водой (3×200 мкл), ацетоном (2×200 мкл) и высушивали при комнатной температуре. Для конъюгации 50 мкл раствора гидразида холестерина (2.2.2.VII, рис. 2.2.2) (1.9 мг, 3.5 мкмоль) или гидразида α-токоферола (2.2.2.VIII, рис. 2.2.2) (2.1 мг, 3.5 мкмоль) в диоксане смешивали с равным объемом 0.1 М натрий ацетатного буфера (pH 5.2) и добавляли к носитель-связанному 5'-альдегидсодержащему олигонуклеотиду, с последующим инкубированием в течение 12 ч при комнатной температуре и перемешивании. Полученные защищенные носитель-связанные конъюгаты (1-3, 5, 7-16, табл. 2.3.1) либо использовали для п.3.3.4.2.б, либо промывали диоксаном (3×200 мкл), ацетонитрилом (2×200 мкл), ацетоном (2×200 мкл) и высушивали на воздухе в течение 30 мин. Далее см. п.3.3.4.2.с.

б) Для восстановления гидразоновой связи к суспензии носитель-связанного холестеринсодержащего конъюгата в смеси диоксан:натрий ацетатный буфер добавляли 15 мкл 0.2 М NaBH<sub>4</sub> в ацетонитриле и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в соответствии с [546]. Полученные носитель-связанные конъюгаты (4, 6, табл. 2.2.1) промывали диоксаном (3×200 мкл), ацетонитрилом (2×200 мкл), ацетоном (2×200 мкл) и высушивали на воздухе в течение 30 мин. Далее см. п.3.3.4.2.с.

с) Для деблокирования конъюгатов использовали 0.05 М K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в метаноле (п.3.2.2.1.г) и раствор для удаления 2'-O-силильных групп (п.3.2.2.2.а). Реакционные смеси анализировали в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5). Липофильные конъюгаты (1-16, табл. 2.2.1) выделяли в 12 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.6).

#### **3.3.4.3. Исследование стабильности гидразонсодержащих 5'-липофильных конъюгатов анти-MDR1 siPHK**

Был приготовлен ряд фосфатных буферов с pH 4.8, 5.8, 6.8, 7.8 смешением 0.0667 М раствора Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (94.7 мг в 10 мл деионизованной воды) и 0.0667 М раствора KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (90.7 мг в 10 мл деионизованной воды) согласно таблице 3.3.4.3.1.

**Таблица 3.3.4.3.1.** Соотношения объемов растворов фосфатов для приготовления фосфатных буферов с различным значением pH.

| pH  | V(0.0667M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), мкл | V(0.0667M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), мкл |
|-----|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 4.8 | 3.5                                               | 996.5                                            |
| 5.8 | 79                                                | 921                                              |
| 6.8 | 492                                               | 508                                              |
| 7.8 | 936                                               | 64                                               |

Значения pH полученных буферов были подтверждены с помощью pH-метра и индикаторной бумаги pH-Stick 0-14 ISOLAB (Laborgeräte GmbH, Германия). Параллельно к четырем растворам, содержащим по 0.6 о.е. конъюгата (**1**, табл. 2.2.1) или (**2**, табл. 2.2.1) в 60 мкл воды, добавляли по 30 мкл соответствующего буфера и оставляли перемешиваться при 37°C (1300 об/мин). Через 1, 2, 3, 4, 5 и 24 ч после начала реакции были отобраны пробы (по 15 мкл) и осаждены 2 %-ным раствором NaClO<sub>4</sub> в ацетоне. После проведения аналитического гель-электрофореза пробы визуализировали прокрашиванием водным раствором бромистого этидия. Полученные электрофореграммы были оцифрованы и обработаны с помощью программы Quantity One (BioRad, США) (рис. 2.3.9). Статистический анализ проводился с использованием программы GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, США). Данные для кинетических кривых расщепления гидразоновых связей в конъюгатах (**1**, **2**, табл. 2.2.1) при различных pH рассчитывали как среднее значение ( $\pm$ SD) из трех независимых экспериментов.

### **3.3.5. Разработка твердофазного подхода к созданию 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с функциональными молекулами различной природы с использованием *N,N'*-дисукцинимидилкарбоната как активирующего агента (для раздела 2.4)**

Защищенные носитель-связанные олигонуклеотиды, *N,N'*-дисукцинимидилкарбонат (DSC), *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид, 1-гидроксibenзотриазол, *N*-гидроксисукцинимид, аминоксодержащие ФМ (12-аминододекан-1-ол, короткий пептид трилейцин, моно-*N-трет*-бутилоксикарбонил-1,6-диаминогексан, 1,6-диаминогексан, 1,12-диаминододекан, холестерил-6-аминогексилкарбамат, холестерил-12-аминододеканилкарбамат, токоферил-6-аминогексилкарбамат, фолат-6-аминогексилкарбамат, эстронил-6-аминогексилкарбамат, аминотетраметиленоксониевое производное клозо-додекабората), а также 4-метоксибензойную, фолиевую и глицеретиновую кислоты сушили в течение 1 ч над P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> при 1-2 мм рт. ст.; олеиламин и пропаргиламин использовали без дополнительных обработок. Ацетонитрил и пиридин

были выдержаны сутки над гидридом кальция. Тетрагидрофуран, диметилсульфоксид, диметилформамид, толуол, триэтиламин и *N,N*-диизопропилэтиламин были выдержаны сутки над молекулярными ситами (Molecular Serve, 3Å). Диоксан перегоняли над гидридом кальция и выдерживали сутки над гидроксидом натрия.

### **3.3.5.1. Оптимизация условий твердофазного синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с аминоксодержащими функциональными молекулами с использованием *N,N'*-дисулфинимидилкарбоната как активирующего агента**

а) К DSC (25, 50, 100 мкмоль) приливали 300 мл ацетонитрила с добавлением 20 % или 10 % (v/v) тритичного амина (пиридин, триэтиламин, *N,N*-диизопропилэтиламин) и полученную взвесь добавляли к носитель-связанному защищенному гептадезокситимидилату (dT<sub>7</sub>) с открытой 5'-гидроксильной группой (10 мг, 0.4 мкмоль, п.3.3.2). Суспензию перемешивали (1100 об/мин) в течение 30 мин при 25°C или 37°C. Затем раствор заменяли свежеприготовленным раствором DSC той же концентрации и перемешивали еще 30 мин при 25°C или 37°C. Стадию активации повторяли от 2 до 5 раз. После этого раствор, содержащий избыток DSC, удаляли, олигонуклеотид на носителе промывали ацетонитрилом (2×300 мкл) и добавляли свежеприготовленный раствор холестерил-6-аминогексилкарбамата (10, 20, 50 мкмоль) в 400 мкл смеси дихлорметана и тритичного амина (пиридин, триэтиламин, *N,N*-диизопропилэтиламин) (20 % или 10 %, v/v) и перемешивали 2, 6 или 16 ч при 25°C или 37°C (1100 об/мин). Растворы декантировали, носитель промывали дихлорметаном (2×300 мкл), ацетоном (2×300 мкл) и сушили на воздухе в течение 30 мин. Носитель-связанный 5'-холестеринсодержащий конъюгат dT<sub>7</sub> (1, табл.2.4.1) из каждой порции, деблокировали (п.3.2.2.1.е) и реакционные смеси анализировали ПААГ (п.3.2.5).

б) для каждой аминоксодержащей ФМ подбирали оптимальный растворитель (дихлорметан, тетрагидрофуран, ацетонитрил, диметилсульфоксид, диметилформамид, толуол, диоксан) и тестировали в условиях, оптимизированных выше (п.3.3.5.1.а).

### **3.3.5.2. Твердофазный синтез 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с функциональными молекулами различной природы**

Синтез проводили в двух вариантах: непосредственное введение аминоксодержащей ФМ на 5'-конец DSC-активированного носитель-связанного защищенного олигонуклеотида (п.3.3.5.2.1); последовательное введение остатка диамина и остатка активированной органической кислоты на 5'-конец носитель-связанного защищенного олигонуклеотида (п.3.3.5.2.2).

### 3.3.5.2.1. Твердофазный синтез 5'-конъюгатов олигонуклеотидов исходя из носитель-связанного защищенного олигонуклеотида и аминокислотсодержащих функциональных молекул различной природы

а) (Варианты А и Г, рис. 2.2.1): DSC (6.5 мг, 25 мкмоль) растворяли в 300 мкл смеси ацетонитрил/пиридин (9/1, v/v), добавляли к носитель-связанному защищенному олигонуклеотиду с открытой 5'-гидроксильной или 5'-тиол-модифицированной группой (10 мг, 0.25–0.5 мкмоль, п.3.3.2). Суспензию перемешивали (1100 об/мин) в течение 30 мин при 37°C. Затем раствор заменяли свежеприготовленным раствором DSC той же концентрации и перемешивали еще 30 мин при 37°C. После этого раствор удаляли, носитель промывали ацетонитрилом (2×300 мкл) и добавляли свежеприготовленный раствор аминокислотсодержащей ФМ (20 мкмоль) в 400 мкл смеси оптимального растворителя (дихлорметан, тетрагидрофуран, ацетонитрил, диметилсульфоксид) и пиридина (10 %, v/v) и перемешивали 16 ч при 37°C (1100 об/мин). Раствор декантировали, носитель промывали оптимальным растворителем (2×300 мкл), ацетоном (2×300 мкл) и сушили на воздухе в течение 30 мин. В случае этилендиамина (производное **19**, табл. 2.4.1) раствор декантировали, носитель промывали этанолом (1×100 мкл), к объединенному раствору добавляли 1 мл эфира, полученный осадок промывали эфиром сушили на воздухе. Производные и конъюгаты деблокировали (п.3.2.2.1.а-в, п.3.2.2.2.а), реакционные смеси анализировали ОФ ВЭЖХ (п.3.2.4) и/или в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5). Олигонуклеотидные производные и конъюгаты (**1-11**, **19-29**, табл. 2.4.1) выделяли в 12 %-ном (для **20-29**) или 15 %-ном (для **1-11**, **19**) денатурирующем ПААГ (п.3.2.6).

б) (Вариант В, рис. 2.2.1): DSC (6.5 мг, 25 мкмоль) растворяли в 300 мкл смеси ацетонитрил/пиридин (9/1, v/v), добавляли к носитель-связанному защищенному олигонуклеотиду с открытой 5'-гидроксильной группой (10 мг, 0.3 мкмоль, п.3.3.2). Смесь перемешивали (1100 об/мин) в течение 30 мин при 37°C. Затем раствор заменяли свежеприготовленным раствором DSC той же концентрации и перемешивали еще 30 мин при 37°C. После этого раствор удаляли, носитель промывали ацетонитрилом (2×300 мкл) и добавляли свежеприготовленный раствор аминокислоты (20 мкмоль) в 400 мкл смеси диметилсульфоксид/пиридин (9/1, v/v) и перемешивали 16 ч при 37°C (1100 об/мин). После этого раствор декантировали, носитель промывали диметилсульфоксидом (2×300 мкл), ацетоном (2×300 мкл) и сушили на воздухе в течение 30 мин. Последующее введение холестерил-6-аминогексилкарбамата осуществляли, как описано выше (п.3.3.5.2.а). Конъюгат (**30**, табл. 2.4.1) деблокировали (п.3.2.2.1.а-в, п.3.2.2.2.а), реакционную смесь

анализировали в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5), целевой продукт выделяли в 12 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.6).

в) (Вариант А', частный случай, рис. 2.2.1): DSC (6.5 мг, 25 ммоль) растворяли в 300 мкл смеси ацетонитрил/пиридин (9/1, v/v), добавляли к защищенному носитель-связанному олигонуклеотиду с открытой 5'-гидроксильной группой (10 мг, 0.4 мкмоль, п.3.3.2) и выдерживали при встряхивании в течение 30 мин при 37°C (1100 об/мин). Затем раствор декантировали и обработку с DSC повторяли. По окончании реакции раствор декантировали, носитель промывали ацетонитрилом (2×300 мкл). К DSC-активированному защищенному носитель-связанному олигонуклеотиду добавляли раствор пропаргиламина (20 мкмоль) в 400 мкл смеси тетрагидрофуран/пиридин (9/1, v/v) или 1,6-диаминогексана (20 мкмоль) в 400 мкл смеси дихлорметан/пиридин (9/1, v/v). Реакционную смесь выдерживали при встряхивании в течение 16 ч при 37°C (1100 об/мин). Раствор декантировали, носитель промывали дихлорметаном (5×500 мкл) и сушили на воздухе в течение 30 мин. Производные (**9-11**, табл. 2.4.1) деблокировали (п.3.2.2.1.а-в), реакционные смеси анализировали ОФ ВЭЖХ (п.3.2.4) и/или в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5). Олигонуклеотидные производные, содержащие amino- (**9-10**, табл. 2.4.1) или алкильную (**11**, табл. 2.4.1) группы, либо выделяли в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.6), либо использовали далее для введения остатка феназиния (п.3.3.7) или азида красителя  $\text{Cu}_3$  (п.3.3.9), соответственно.

#### **3.3.5.2.2. Твердофазный синтез 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, основанный на последовательном введении остатка диамина и активированной органической кислоты**

(Вариант Б, рис. 2.2.1): DSC (6.5 мг, 25 ммоль) растворяли в 300 мкл смеси ацетонитрил/пиридин (9/1, v/v), добавляли к защищенному носитель-связанному олигонуклеотиду с открытой 5'-гидроксильной группой (10 мг, 0.3 - 0.4 мкмоль, п.3.3.2) и выдерживали при встряхивании в течение 30 мин при 37°C (1100 об/мин). Затем раствор декантировали и обработку с DSC повторяли. По окончании реакции раствор декантировали, носитель промывали ацетонитрилом (2×300 мкл). К DSC-активированному защищенному носитель-связанному олигонуклеотиду добавляли раствор моно-*N*-трет-бутилоксикарбонил-1,6-диаминогексана (4.3 мг, 20 мкмоль) в 400 мкл смеси дихлорметан/пиридин (9/1, v/v). Реакционную смесь выдерживали при встряхивании в течение 16 ч при 37°C (1100 об/мин). Раствор декантировали, носитель промывали дихлорметаном (5×500 мкл) и сушили на воздухе в течение 30 мин. Часть защищенного 5'-аминомодифицированного олигонуклеотида на носителе деблокировали (п.3.2.2.1.а-в,

п.3.2.2.2.а) и использовали в качестве контрольных модифицированных олигонуклеотидов, содержащих на 5'-конце остатки моно-*N-трет*-бутилоксикарбонил-1,6-диаминогексана, при анализе реакционных смесей ОФ ВЭЖХ (п.3.2.4) и/или в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5); часть использовали далее для получения 5'-конъюгатов олигонуклеотидов (п.п.3.3.5.2.2.1-3.3.5.2.2.4).

#### **3.3.5.2.2.1. Подбор оптимальных условий удаления бутилоксикарбонильной защитной группы с остатка моно-*N-трет*-бутилоксикарбонил-1,6-диаминогексана, введенного на 5'-конец защищенного носитель-связанного олигонуклеотида dT<sub>6</sub>**

Защищенный носитель-связанный олигонуклеотид dT<sub>6</sub> (2 мг, 0.08 мкмоль), содержащий на 5'-конце остаток моно-*N-трет*-бутилоксикарбонил-1,6-диаминогексана, выдерживали при перемешивании (1000 об/мин) в различных условиях: а) 300 мкл муравьиной кислоты 2 ч при 25°C; б) 300 мкл смеси трифторуксусная кислота/дихлорметан (1/1, v/v), 10 мин при 25°C; в) 300 мкл смеси триметилхлорсилан (1 ммоль)/метанол (1 ммоль) в дихлорметане выдерживали 30 мин при 0°C, затем переносили к носитель-связанному олигонуклеотиду и выдерживали 24 ч при 25°C; г) 300 мкл смеси триметилсилилтрифторметансульфонат/2,6-лутидин/дихлорметан (5/10/285, v/v/v), 30 мин при 4°C; д) 300 мкл смеси триметилсилилтрифторметансульфонат/2,6-лутидин/дихлорметан (5/10/285, v/v/v), 30 мин при -20°C. По окончании реакции растворы декантировали, носитель промывали метанолом (3×500 мкл), дихлорметаном (500 мкл) и сушили на воздухе в течение 15 мин. Далее проводили деблокирование (п.3.2.2.1.е) и анализ реакционных смесей в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5).

#### **3.3.5.2.2.2. Удаление *трет*-бутилоксикарбонильной защитной группы с остатка моно-*N-трет*-бутилоксикарбонил-1,6-диаминогексана, введенного на 5'-конец защищенного носитель-связанного олигонуклеотида**

а) Защищенный носитель-связанный олигонуклеотид dT<sub>6</sub> или сенс-цепи siРНК (10 мг, 0.3 - 0.4 мкмоль), содержащий на 5'-конце остаток моно-*N-трет*-бутилоксикарбонил-1,6-диаминогексана, выдерживали при перемешивании (1000 об/мин) в 300 мкл муравьиной кислоты 2 ч при 25°C. По окончании раствор декантировали, носитель промывали метанолом (3×500 мкл), дихлорметаном (500 мкл) и сушили на воздухе в течение 15 мин. Часть защищенных 5'-аминомодифицированных олигонуклеотидов на носителе деблокировали (п.3.2.2.1.а-в, п.3.2.2.2.а) и использовали в качестве контрольных модифицированных олигонуклеотидов, содержащих на 5'-конце остаток 1,6-диаминогексана, при анализе реакционных смесей ОФ ВЭЖХ (п.3.2.4) и/или в 15 %-ном

денатурирующем ПААГ (п.3.2.5); часть использовали далее для получения 5'-конъюгатов олигонуклеотидов (п.3.3.5.2.2.2.б, п.п.3.3.5.2.2.3-3.3.5.2.2.4).

б) К полученному в п.3.3.5.2.2.2.а носитель-связанному олигонуклеотиду dT<sub>6</sub>, содержащему аминокгруппу на 5'-конце (2 мг, 0.08 мкмоль) добавляли хлорформат холестерина (2 мг, 4 мкмоль) в 300 мкл смеси дихлорметан:пиридин (9:1) и выдерживали 2 ч при комнатной температуре и перемешивании (1100 об/мин). Далее проводили деблокирование (п.3.2.2.1.е) и анализ реакционной смеси в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5) (рис. 2.4.5).

#### **3.3.5.2.2.3. Оптимизация условий твердофазного синтеза конъюгатов олигонуклеотидов на примере модельного 5'-аминомодифицированного носитель-связанного защищенного олигонуклеотида dT<sub>6</sub> с 4-метоксибензойной, фолиевой и глицирретиновой кислотами**

а) К 5'-аминомодифицированному носитель-связанному модельному олигонуклеотиду dT<sub>6</sub> (2 мг, 0.08 мкмоль) (п.3.3.5.2.2.2.а) добавляли 40 мкл пиридина и 360 мкл раствора активированного бензотриазольного производного 4-метоксибензойной, фолиевой или глицирретиновой кислоты из п.3.3.1.4.а, п.3.3.1.4.б или п.3.3.1.4.в. Реакционную смесь выдерживали при встряхивании в течение 16 ч при 25 °С (1100 об/мин). Раствор декантировали, носитель промывали диметилсульфоксидом (3×300 мкл), дихлорметаном (3×300 мкл), ацетоном (300 мкл) и сушили на воздухе в течение 15 мин. Далее проводили деблокирование (п.3.2.2.1.е) и анализировали реакционные смеси в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5) (рис. 2.4.6).

б) К 5'-аминомодифицированному носитель-связанному модельному олигонуклеотиду dT<sub>6</sub> (10 мг, 0.4 мкмоль) (п.3.3.5.2.2.2) добавляли 40 мкл пиридина и *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (0.6 мг, 3 мкмоль) в 360 мкл диметилсульфоксида. Реакционную смесь выдерживали при встряхивании в течение 2 ч при 25°С (1100 об/мин). Раствор декантировали, носитель промывали диметилсульфоксидом (3×300 мкл), дихлорметаном (3×300 мкл), ацетоном (300 мкл) и сушили на воздухе в течение 15 мин. Проводили деблокирование (п.3.2.2.1.е) и анализировали реакционную смесь в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5) (рис. 2.4.6).

#### **3.3.5.2.2.4. Твердофазный синтез 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с 4-метоксибензойной, фолиевой и глицирретиновой кислотами**

К 5'-аминомодифицированному защищенному носитель-связанному олигонуклеотиду dT<sub>6</sub> или сенс-цепи siРНК (10 мг, 0.3 - 0.4 мкмоль) (п.3.3.5.2.2.2.а) добавляли 40 мкл пиридина и 360 мкл раствора активированного бензотриазольного

производного 4-метоксибензойной, фолиевой или глицирретиновой кислоты (п.3.3.1.4.в). Реакционную смесь выдерживали при встряхивании в течение 16 ч при 25°C (1300 об/мин). Раствор декантировали, носитель промывали диметилсульфоксидом (3×300 мкл), дихлорметаном (3×300 мкл), ацетоном (300 мкл) и сушили на воздухе в течение 30 мин. Конъюгаты деблокировали (п.3.2.2.1.а-в, п.3.2.2.2.а), реакционные смеси анализировали ОФ ВЭЖХ (3.2.4) и/или в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5). Олигонуклеотидные конъюгаты (**13-15**, **31-33**, табл. 2.4.1) выделяли в 12 %-ном (для **31-33**, табл. 2.4.1) или 15 %-ном (для **13-15**, табл. 2.4.1) денатурирующем ПААГ (п.3.2.6).

### **3.3.6. Твердофазный синтез и исследование свойств 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с низкомолекулярными функциональными молекулами, введенными посредством кислотолабильной фосфамидной связи** (для раздела 2.5)

Фосфатную группу на 5'-конец носитель-связанных защищенных олигонуклеотидов (гептадезоксинуклеотид dT<sub>7</sub>, сенс-цепь siРНК), полученных согласно п.3.3.2, вводили на синтезаторе ASM-800/800E ("Биоссет", Россия) твердофазным фосфитамидным методом, используя на последнем синтетическом цикле стандартный протокол (п.п.1-12, табл. 3.3.2.1, п.3.3.2) и фосфорилирующий CPR фосфитамидный модификатор (0.1 М раствор в ацетонитриле, время конденсации 10 мин).

Полученные носитель-связанные 5'-сульфонилдиэтанолсодержащие олигонуклеотиды сушили для удаления следов ацетонитрила в течение 2 мин с помощью мембранного насоса (DOA V130 BN, Waters, США), затем либо удаляли с носителя с одновременным деблокированием экзоциклических аминогрупп, 5'-концевого и межнуклеозидных фосфатов (п.3.2.2.1.а-в), деблокированием 2'-гидроксильных групп (в случае необходимости, п.3.2.2.2.а), либо деблокировали только межнуклеозидные и 5'-концевой фосфаты (п.3.2.2.5) и полученный защищенный носитель-связанный олигонуклеотид использовали для синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов (п.3.3.6.1, п.3.3.6.2).

Защищенные носитель-связанные олигонуклеотиды, аминоксодержащие ФМ (1,6-диаминогексан, пиперазин, пиперазиновое производное тритильной спиновой метки, холестерил-6-аминогексилкарбамат, *N*-(6-аминогексил)-4-метоксибензамид) сушили в течение 2 ч над Р<sub>2</sub>О<sub>5</sub> при 1-2 мм рт. ст.; олеиламин, этилендиамин, пропаргиламин и 3-аминопропан-1-ол использовали без дополнительных обработок. Диметилсульфоксид и триэтиламин были выдержаны сутки над молекулярными ситами (Molecular Serve, 3Å).

### **3.3.6.1. Оптимизация условий твердофазного синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих кислотолабильную Р-Н-связь**

#### **а) Синтез контрольного 5'-пиренильного конъюгата олигонуклеотида dT<sub>7</sub> методом "в растворе"**

К 5'-фосфатсодержащему олигонуклеотиду dT<sub>7</sub> в виде цетилтриметиламмониевой соли (50.е., 0.085 мкмоль) (п.3.2.3) добавляли навески трифенилфосфина (7.9 мг, 30 мкмоль), дипиридилдисульфида (6.6 мг, 30 мкмоль), 4-диметиламинопиридина (5.8 мг, 50 мкмоль), 200 мкл абс. диметилсульфоксида и оставили встряхиваться 20 мин при 37°C (1100 об/мин). Олигонуклеотидный материал осаждали 2 %-ным раствором NaClO<sub>4</sub> в ацетоне. Осадок промывали ацетоном, сушили на воздухе. К осадку добавляли раствор 1-пиренметиламин гидрохлорида (1.5 мг, 6 мкмоль) в 250 мкл смеси диметилсульфоксид/триэтиламин (4/1, v/v) и оставляли при перемешивании 16 ч при 37°C (1100 об/мин). Олигонуклеотидный материал осаждали 2 %-ным раствором NaClO<sub>4</sub> в ацетоне. Осадок промывали ацетоном, сушили на воздухе и анализировали реакционную смесь ОФ ВЭЖХ (3.2.4) и/или в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5).

#### **б) Твердофазный синтез 5'-монопиренильных конъюгатов модельного олигонуклеотида dT<sub>7</sub>**

Проводили удаление защитных групп с межнуклеозидных и 5'-концевого фосфатов (п.3.2.2.5). Далее к носитель-связанному олигонуклеотиду (5 мг, 0.2 мкмоль) добавляли навески трифенилфосфина (7.9 мг, 30 мкмоль), дипиридилдисульфида (6.6 мг, 30 мкмоль), 4-диметиламинопиридина (5.8 мг, 50 мкмоль), 200 мкл абс. диметилсульфоксида и оставили встряхиваться 20 мин при 37°C (1100 об/мин). Раствор декантировали, носитель либо не промывали, либо промывали 150 мкл диметилсульфоксида от одного до четырех раз. Раствор 1-пиренметиламин гидрохлорида (1.5 мг, 6 мкмоль) в 250 мкл смеси диметилсульфоксид/триэтиламин (4/1, v/v) добавляли к активированному по 5'-фосфату олигонуклеотиду на носителе и оставляли при перемешивании 6 или 16 ч при 37°C (1100 об/мин). По окончании реакции раствор декантировали, носитель промывали диметилсульфоксидом (3×300 мкл), ацетоном (2×200 мкл) и сушили на воздухе. Далее проводили деблокирование (п.3.2.2.1.е) и анализ реакционной смеси ОФ ВЭЖХ (3.2.4) и/или в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5) (рис. 2.5.3.А) и выделение в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.6).

#### **в) Твердофазный синтез 5',5'-биспиренильного конъюгата модельного олигонуклеотида dT<sub>7</sub>**

Проводили удаление защитных групп с межнуклеозидных и 5'-концевого фосфатов (п.3.2.2.5). Далее к носитель-связанному олигонуклеотиду (5 мг, 0.2 мкмоль) добавляли навески трифенилфосфина (10.1 мг, 40 мкмоль), дипиридилдисульфида (8.3 мг, 40 мкмоль), 4-диметиламинопиридина (7.3 мг, 60 мкмоль), 200 мкл абс. диметилсульфоксида и встряхивали 20 мин при 37°C (1100 об/мин). К суспензии носителя в растворе добавляли 1-пиренметиламин гидрохлорид (1.5 мг, 6 мкмоль) в 50 мкл смеси диметилсульфоксид/триэтиламин (4/1, v/v) и оставляли встряхиваться еще 16 ч при 37°C (1100 об/мин). По окончании реакции раствор декантировали, носитель промывали диметилсульфоксидом (3×300 мкл), ацетоном (2×200 мкл) и сушили на воздухе. Далее проводили деблокирование (п.3.2.2.1.е) и анализ реакционной смеси ОФ ВЭЖХ (п.3.2.4) и/или в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5) (рис. 2.5.3.А) и выделение в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.6).

### **3.3.6.2. Твердофазный синтез 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих кислотолабильную Р-Н-связь**

Проводили удаление защитных групп с межнуклеозидных и 5'-концевого фосфатов (п.3.2.2.5). Далее к носитель-связанному олигонуклеотиду (10 мг, 0.3 мкмоль) добавляли навески трифенилфосфина (7.9 мг, 30 мкмоль), дипиридилдисульфида (6.5 мг, 30 мкмоль), 4-диметиламинопиридина (6.3 мг, 50 мкмоль), 200 мкл абс. диметилсульфоксида и оставили встряхиваться при 37°C в течение 20 мин (1100 об/мин). Раствор декантировали, носитель промывали диметилсульфоксидом (3×150 мкл). Раствор аминоксодержащей ФМ (N-(6-аминогексил)-4-метоксибензамид (5.4 мг, 20 мкмоль), холестерил-6-аминогексилкарбамат (4.3 мг, 8 мкмоль), пропаргиламин (2.5 мкл, 40 мкмоль), олеиламин (6.5 мкл, 20 мкмоль), 1,6-диаминогексан (5.0 мг, 40 мкмоль) или 3-аминопропан-1-ол (2.5 мкл, 35 мкмоль) в 400 мкл дихлорметана) добавляли к активированному по 5'-фосфату олигонуклеотиду на носителе и оставляли при перемешивании 16 ч при 37°C (1100 об/мин). По окончании реакции растворы декантировали, носитель промывали дихлорметаном (3×300 мкл), ацетоном (2×200 мкл) и сушили на воздухе. Производные и конъюгаты деблокировали согласно п.3.2.2.1.а-в, п.3.2.2.2.а. Полученные реакционные смеси анализировали ОФ ВЭЖХ (п.3.2.4) и/или в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5) (рис. 2.5.3). Олигонуклеотидные конъюгаты (**1-6, 9-10, 13-16**, табл. 2.5.1) выделяли в 12 %-ном (для **13-16**) или 15 %-ном (для **1-6, 9-10**) денатурирующем ПААГ (п.3.2.6). Олигонуклеотидные производные, содержащие амино- (**7**, табл. 2.5.1) или алкильную (**11, 16**, табл. 2.5.1) группы, либо выделяли в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.6) либо

использовали далее для взаимодействия с *N*-гидроксисукцинимидным эфиром биотина (п.3.3.8) или азидами флуоресцентной метки или остатка *N*-ацетилгалактозамина (п.3.3.9).

### **3.3.6.3. Исследование стабильности фосфамидой связи в составе конъюгатов при различных значениях pH**

Конъюгаты (**13–15**, **17**, табл. 2.5.1) с *N*-(6-аминогексил)-4-метоксибензамидом, холестерин-6-аминогексилкарбаматом, олеиламина и остатком *N*-ацетилгалактозамина (27 нмоль) выдерживали в натрий ацетатном буфере (0.05 М, 90 мкл) со значениями pH 6.0, 5.2 и 4.5 при 37°C. Через 1, 2, 4, 6 и 24 ч отбирали аликвоты по 15 мкл, олигонуклеотидный материал осаждали 2 %-ным раствором NaClO<sub>4</sub> в ацетоне. Осадок промывали ацетоном, сушили на воздухе и растворяли в воде. Пробы анализировали в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5) и визуализировали прокрашиванием водным раствором бромистого этидия. Полученные электрофореграммы были оцифрованы и обработаны с помощью программы Quantity One (BioRad, США) (рис. 2.5.6). Статистический анализ проводился с использованием программы GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, США). Данные для кинетических кривых расщепления фосфамидных связей в конъюгатах (**13–15**, **17**, табл. 2.5.1) при различных pH рассчитывали как среднее значение ( $\pm$ SD) из трех независимых экспериментов.

### **3.3.7. Синтез конъюгатов олигонуклеотидов с *N*-(2-гидроксиэтил)феназином**

Олигонуклеотидные производные *N*-(2-гидроксиэтил)феназиния (**16**, **17**, табл. 2.4.1)<sup>7</sup> были получены по аналогии с работой [547]. К 5'-аминомодифицированным олигонуклеотидам (**9**, **10**, табл. 2.4.1) (0.05 мкмоль) добавляли раствор *N*-(2-гидроксиэтил)феназиний хлорида (0.05 М, 80 мкл) в 0.1 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Смесь инкубировали 10 мин при перемешивании (1100 об/мин), осаждали 2 %-ным раствором NaClO<sub>4</sub> в ацетоне, промывали ацетоном и сушили на воздухе. Реакционные смеси растворяли, анализировали ОФ ВЭЖХ (3.2.4) и/или в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5) (рис. 2.4.7).

### **3.3.8. Синтез конъюгата олигонуклеотида с биотином с использованием метода активированных эфиров**

Раствор *N*-гидроксисукцинимидного эфира биотина (0.5 мг, 1.1 ммоль) в диметилсульфоксиде (80 мкл) добавляли к 5'-аминомодифицированному олигонуклеотиду (**7**, табл. 2.5.1) (10 о.е., 0.17 мкмоль) в 0.5 М Трис-HCl, pH 8.3 (20 мкл) согласно протоколу поставщика реагента ("Люмипроб", Россия). Реакционную смесь инкубировали 2 ч при комнатной температуре (1100 об/мин). Конъюгат олигонуклеотида (**8**, табл. 2.5.1) осаждали 2 %-ным раствором NaClO<sub>4</sub> в ацетоне, промывали ацетоном и сушили на воздухе в течение

<sup>7</sup> Эксперименты по получению конъюгатов 16-18 (табл. 2.4.1) проведены Новопашиной Д.С. (ЛХРНК ИХБФМ СО РАН)

30 мин. Реакционную смесь растворяли, анализировали ОФ ВЭЖХ (3.2.4) и/или в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5) (рис. 2.5.4) и выделяли в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.6).

### **3.3.9. Синтез конъюгатов олигонуклеотидов с *N*-ацетилгалактозамином и красителями FAM или Cy3 с использованием соответствующих азидов по реакции азид-алкинового циклоприсоединения**

К водному раствору 5'-алкин-модифицированного олигонуклеотида (**11**, табл. 2.4.1 или **11**, **16**, табл. 2.5.1) (0.05 мкмоль) добавляли триэтиламмоний ацетатный буфер (pH 7.0), 10 mM азид *N*-ацетилгалактозамина, флуоресцеина или красителя Cy3 в диметилсульфоксиде, 5 mM раствор аскорбиновой кислоты в воде и 10 mM раствор Cu(II)-ТБТА в 55 %-ном водном диметилсульфоксиде согласно протоколу поставщика реагентов ("Люмипроб", Россия). Реакционные смеси инкубировали 16 ч при комнатной температуре (1100 об/мин). Конъюгаты олигонуклеотидов (**18**<sup>7</sup>, табл. 2.4.1 или **12**, **17**, табл. 2.5.1) осаждали 2 %-ным раствором NaClO<sub>4</sub> в ацетоне, промывали ацетоном и сушили на воздухе в течение 30 мин. Реакционные смеси растворяли, анализировали ОФ ВЭЖХ (3.2.4) и/или в 15 %-ном денатурирующем ПААГ (п.3.2.5) (рис. 2.4.8, 2.5.5) и выделяли в 12 %-ном (для **17**, табл. 2.5.1) или 15 %-ном (для **18**, табл. 2.4.1 или **12**, табл. 2.5.1) денатурирующем ПААГ (п.3.2.6).

<sup>7</sup> Эксперименты по получению конъюгатов 16-18 (табл. 2.4.1) проведены Новопашиной Д.С. (ЛХРНК ИХБФМ СО РАН)

## ВЫВОДЫ

Данная работа представляет собой систематическое исследование, в ходе которого предложен ряд методов и подходов, позволяющих получать моно- и мультифункциональные НК-конструкции с сочетанием заданных характеристик на основе олигорибонуклеотидов, их структурных аналогов и конъюгатов с биологически значимыми молекулами.

1. Разработаны новые протоколы высокоэффективного автоматического синтеза фрагментов РНК (каталитические НК, аптамеры, малые интерферирующие РНК, микроРНК, гидовые РНК, антисмысловые олигонуклеотиды и др.) природного типа и их структурных аналогов, содержащих модификации углеводофосфатного остова (2'-дезоксидезокси/2'-F-/2'-OMe/LNA, фосфотиоаты), длиной до 100 и более звеньев для отечественного ДНК/РНК синтезатора ASM-800/800E ("Биоссет", Новосибирск, Россия), обеспечивающие получение целевых последовательностей как в аналитическом (до 0.05 микромоль), так и в семипрепаративном (до 0.5 микромоль) масштабе.

- Всесторонне изучены основополагающие аспекты (качество используемых реактивов, тип носителя и полнота заполнения им колонки/реактора, концентрации реагентов, типы защитных группировок, продолжительность каждой стадии цикла и др.), оказывающие существенное влияние на эффективность автоматического амидофосфитного синтеза.
- Сформирован комплект рекомендаций, включающий оптимальные условия и реагенты синтеза, адаптированные под тип, длину и функциональные особенности целевого олигонуклеотида, и обеспечивающий эффективность синтетического шага до 99%.

2. Разработан ряд новых подходов к твердофазному синтезу 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с биологически значимыми молекулами различной природы, введенными как через стабильные, так и через стимул-чувствительные связи, обеспечивающих высокоэффективную конъюгацию. Подходы адаптированы к введению широкого спектра соединений, включая липофильные молекулы, витамины, короткие пептиды, рецептор-специфические лиганды, гормоны, бор-содержащие кластеры и др. Предложенные подходы позволяют: из одного олигонуклеотида-предшественника (нативного или структурного аналога) синтезировать серию конъюгатов, отличающихся строением линкера и/или функциональной молекулой; варьировать расстояние между олигонуклеотидной компонентой и остатком вводимой биомолекулы, путем использования различных алифатических диаминов или аминспиртов в качестве

составных компонентов линкеров; получать конъюгаты олигонуклеотидов, содержащие схожие по структуре, но отличающиеся по стабильности линкерные фрагменты.

- Разработан протокол гибридного синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с транспортными молекулами, основанный на сочетании Н-фосфонатной и амидофосфитной химии. Низкомолекулярные соединения, содержащие в своей структуре гидроксильную группу, могут быть превращены в высокореакционноспособные Н-фосфонаты, стабильные при хранении, для взаимодействия с носитель-связанным олигонуклеотидом, полученным амидофосфитным методом.
- Реализован новый твердофазный вариант синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих кислотолабильную фосфамидную связь, основанный на активации 5'-концевого фосфата носитель-связанного олигонуклеотида окислительно-восстановительной парой трифенилфосфин/дипиридилдисульфид и его последующем взаимодействии с первичной алифатической аминогруппой в составе целевой функциональной молекулы.
- Разработан новый метод твердофазного синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих кислотолабильную гидразоновую связь, основанный на взаимодействии гидразид-модифицированных биомолекул с 5'-альдегидсодержащим носитель-связанным олигонуклеотидом. Предложенный метод позволяет получать стабильный аналог целевого 5'-конъюгата олигонуклеотида без изменения его первичной структуры.
- Впервые предложен подход к получению в твердофазном варианте 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, в которых функциональные молекулы введены посредством стабильной карбаматной связи, с использованием *N,N'*-дисукцинимидилкарбоната как активирующего агента.

### Список литературы

1. Egli, M., Manoharan, M. Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – Vol. 51. – N. 6. – P. 2529–2573.
2. de la Torre, B. G., Albericio, F. The Pharmaceutical Industry in 2021. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules // *Molecules.* – 2022. – Vol. 27. – N. 3. – P. 1075.
3. Cronin, J. M., Yu, A.-M. Small RNA or oligonucleotide drugs and challenges in evaluating drug-drug interactions // *Front. Pharmacol.* – 2025. – Vol. 16. – P. 1720361.
4. AlShaer, D., Al Musaimi, O., Albericio, F., de la Torre, B. G. 2025 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest // *Pharmaceuticals.* – 2026. – Vol. 19. – N. 2. – P. 244.
5. Bege, M., Borbás, A. The Medicinal Chemistry of Artificial Nucleic Acids and Therapeutic Oligonucleotides // *Pharmaceuticals.* – 2022. – Vol. 15. – N. 8. – P. 909.
6. Scharner, J., Aznarez, I. Clinical Applications of Single-Stranded Oligonucleotides: Current Landscape of Approved and In-Development Therapeutics // *Mol. Ther.* – 2021. – Vol. 29. – N. 2. – P. 540–554.
7. Smith, C. I. E., Zain, R. Therapeutic Oligonucleotides: State of the Art // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2019. – Vol. 59. – N. 1. – P. 605–630.
8. Shen, X., Corey, D. R. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – Vol. 46. – N. 4. – P. 1584–1600.
9. Sridharan, K., Gogtay, N. J. Therapeutic nucleic acids: current clinical status // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2016. – Vol. 82. – N. 3. – P. 659–672.
10. Nie, T. Eplontersen: First Approval // *Drugs.* – 2024. – Vol. 84. – P. 473–478.
11. Keam, S. J. Imetelstat: First Approval // *Drugs.* – 2024. – Vol. 84. – N. 9. – P. 1149–1155.
12. McDowall, S., Aung-Htut, M., Wilton, S., Li, D. Antisense oligonucleotides and their applications in rare neurological diseases // *Front. Neurosci.* – 2024. – Vol. 18. – P. 1414658.
13. Porfiryeva, N. N., Moustafine, R. I., Khutoryanskiy, V. V. PEGylated Systems in Pharmaceuticals // *Polym. Sci. Ser. C.* – 2020. – Vol. 62. – P. 62.
14. Singh, A., Irfan, H., Fatima, E., Nazir, Z., Verma, A., Akilimali, A. Revolutionary breakthrough: FDA approves CASGEVY, the first CRISPR/Cas9 gene therapy for sickle cell disease // *Ann. Med. Surg. (Lond).* – 2024. – Vol. 86. – N. 8. – P. 4555–4559.
15. Ballantyne, K. N., van Oorschot, R. A. H., Mitchell, R. J. Locked nucleic acids in PCR primers increase sensitivity and performance // *Genomics.* – 2008. – Vol. 91. – N. 3. – P. 301–305.
16. Shimizu, T., Fujita, T., Fujii, H. Oligoribonucleotide interference-PCR: principles and

- applications // *Biol. Methods Protoc.* – 2022. – Vol. 7. – N. 1.
17. Davydova, A., Vorobyeva, M. Aptamer-Based Biosensors for the Colorimetric Detection of Blood Biomarkers: Paving the Way to Clinical Laboratory Testing // *Biomedicines.* – 2022. – Vol. 10. – N. 7. – P. 1606.
18. Kaur, H., Bruno, J. G., Kumar, A., Sharma, T. K. Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines // *Theranostics.* – 2018. – Vol. 8. – N. 15. – P. 4016–4032.
19. Ahn, I., Kang, C. S., Han, J. Where should siRNAs go: applicable organs for siRNA drugs // *Exp. Mol. Med.* – 2023. – Vol. 55. – N. 7. – P. 1283–1292.
20. Sauvagère, S., Siatka, C. CRISPR-Cas: ‘The Multipurpose Molecular Tool’ for Gene Therapy and Diagnosis // *Genes (Basel).* – 2023. – Vol. 14. – N. 8. – P. 1542.
21. Bajan, S., Hutvagner, G. RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs // *Cells.* – 2020. – Vol. 9. – N. 1. – P. 137.
22. Panigaj, M., Johnson, M. B., Ke, W., McMillan, J., Goncharova, E. A., Chandler, M., Afonin, K. A. Aptamers as Modular Components of Therapeutic Nucleic Acid Nanotechnology // *ACS Nano.* – 2019. – Vol. 13. – N. 11. – P. 12301–12321.
23. Ali Zaidi, S. S., Fatima, F., Ali Zaidi, S. A., Zhou, D., Deng, W., Liu, S. Engineering siRNA therapeutics: challenges and strategies // *J. Nanobiotechnology.* – 2023. – Vol. 21. – N. 1. – P. 381.
24. Hall, J. Future directions for medicinal chemistry in the field of oligonucleotide therapeutics // *RNA.* – 2023. – Vol. 29. – N. 4. – P. 423–433.
25. Zhang, Y., Sun, C., Wang, C., Jankovic, K. E., Dong, Y. Lipids and Lipid Derivatives for RNA Delivery // *Chem. Rev.* – 2021. – Vol. 121. – N. 20. – P. 12181–12277.
26. Hawner, M., Ducho, C. Cellular Targeting of Oligonucleotides by Conjugation with Small Molecules // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25. – N. 24. – P. 5963.
27. 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.
28. Chernikov, I. V., Vlassov, V. V., Chernolovskaya, E. L. Current Development of siRNA Bioconjugates: From Research to the Clinic // *Front. Pharmacol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 444.
29. Belgrad, J., Fakih, H. H., Khvorova, A. Nucleic Acid Therapeutics: Successes, Milestones, and Upcoming Innovation // *Nucleic Acid Ther.* – 2024. – Vol. 34. – N. 2. – P. 52–72.
30. Anand, P., Zhang, Y., Patil, S., Kaur, K. Metabolic Stability and Targeted Delivery of Oligonucleotides: Advancing RNA Therapeutics Beyond The Liver // *J. Med. Chem.* – 2025. – Vol. 68. – N. 7. – P. 6870–6896.

31. Ito, Y., Hari, Y. Synthesis of Nucleobase-Modified Oligonucleotides by Post-Synthetic Modification in Solution // *Chem. Rec.* – 2022. – Vol. 22. – N. 5. – P. e202100325.
32. Bartosik, K., Debiec, K., Czarnecka, A., Sochacka, E., Leszczynska, G. Synthesis of Nucleobase-Modified RNA Oligonucleotides by Post-Synthetic Approach // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25. – N. 15. – P. 3344.
33. Singh, Y., Murat, P., Defrancq, E. Recent developments in oligonucleotide conjugation // *Chem. Soc. Rev.* – 2010. – Vol. 39. – N. 6. – P. 2054–70.
34. <https://ru.lumiprobe.com>.
35. <http://primetech.by>.
36. <https://www.glenresearch.com>.
37. <https://www.chemgenes.com>.
38. <https://www.hongene.com/en>.
39. <https://www.sigmaaldrich.com>.
40. Winkler, J. Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications // *Ther. Deliv.* – 2013. – Vol. 4. – N. 7. – P. 791–809.
41. Beaucage, S. L., Iyer, R. P. The Functionalization of Oligonucleotides Via Phosphoramidite Derivatives // *Tetrahedron.* – 1993. – Vol. 49. – N. 10. – P. 1925–1963.
42. Fàbrega, C., Aviñó, A., Navarro, N., Jorge, A. F., Grijalvo, S., Eritja, R. Lipid and Peptide-Oligonucleotide Conjugates for Therapeutic Purposes: From Simple Hybrids to Complex Multifunctional Assemblies // *Pharmaceutics.* – 2023. – Vol. 15. – N. 2. – P. 320.
43. Anwar, S., Mir, F., Yokota, T. Enhancing the Effectiveness of Oligonucleotide Therapeutics Using Cell-Penetrating Peptide Conjugation, Chemical Modification, and Carrier-Based Delivery Strategies // *Pharmaceutics.* – 2023. – Vol. 15. – N. 4. – P. 1130.
44. Tran, P., Weldemichael, T., Liu, Z., Li, H. Delivery of Oligonucleotides: Efficiency with Lipid Conjugation and Clinical Outcome // *Pharmaceutics.* – 2022. – Vol. 14. – N. 2. – P. 342.
45. Watson, E. E., Winssinger, N. Synthesis of Protein-Oligonucleotide Conjugates // *Biomolecules.* – 2022. – Vol. 12. – N. 10. – P. 1523.
46. Musaimi, O. A., AlShaer, D., de la Torre, B. G., Albericio, F. 2024 FDA TIDES (Peptides and Oligonucleotides) Harvest // *Pharmaceutics.* – 2025. – Vol. 18. – N. 3. – P. 291.
47. Gupta, S., Gupta, A., Mukherjee, M., Bose, S., Sinha, S. Chemical Insights into Oligonucleotide-Protein Binding for Therapeutic Applications // *J. Med. Chem.* – 2025. – Vol. 68. – N. 10. – P. 9848–9863.
48. Tufeu, M., Herkenne, C., Kalia, Y. N. Trends and Commonalities of Approved and Late Clinical-Phase RNA Therapeutics // *Pharmaceutics.* – 2025. – Vol. 17. – N. 7. – P. 903.

49. Keam, S. J. Imetelstat: First Approval // *Drugs*. – 2024. – Vol. 84. – N. 9. – P. 1149–1155.
50. Syed, Y. Y. Olezarsen: First Approval // *Drugs*. – 2025. – Vol. 85. – N. 4. – P. 571–576.
51. Reese, C. B. Oligo- and poly-nucleotides: 50 years of chemical synthesis // *Org. Biomol. Chem.* – 2005. – Vol. 3. – N. 21. – P. 3851–3868.
52. Michelson, A. M., Todd, A. R. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3': 5'-internucleotidic linkage // *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* – 1955. – N. 0. – P. 2632–2638.
53. Gilham, P. T., Khorana, H. G. Studies on Polynucleotides. I. A New and General Method for the Chemical Synthesis of the C5"-C3" Internucleotidic Linkage. Syntheses of Deoxyribodinucleotides // *J. Am. Chem. Soc.* – 1958. – Vol. 80. – N. 23. – P. 6212–6222.
54. Letsinger, R. L., Mahadevan, V. Stepwise Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides on an Insoluble Polymer Support // *J. Am. Chem. Soc.* – 1966. – Vol. 88. – N. 22. – P. 5319–5324.
55. Letsinger, R. L., Ogilvie, K. K. Nucleotide chemistry. XIII. Synthesis of oligothymidylates via phosphotriester intermediates // *J. Am. Chem. Soc.* – 1969. – Vol. 91. – N. 12. – P. 3350–3355.
56. Reese, C. B. The chemical synthesis of oligo- and poly-nucleotides by the phosphotriester approach // *Tetrahedron*. – 1978. – Vol. 34. – N. 21. – P. 3143–3179.
57. Letsinger, R. L., Finnan, J. L., Heavner, G. A., Lunsford, W. B. Nucleotide chemistry. XX. Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links // *J. Am. Chem. Soc.* – 1975. – Vol. 97. – N. 11. – P. 3278–3279.
58. Michelson, A. M. 183. Polynucleotides. Part IV. Synthesis of Oligonucleotide Analogues Substituted in the Sugar Portion // *J. Chem. Soc.* – 1962. – P. 979–982.
59. Ogilvie, K. K., Theriault, N., Sadana, K. L. Synthesis of oligoribonucleotides // *J. Am. Chem. Soc.* – 1977. – Vol. 99. – N. 23. – P. 7741–7743.
60. Берлин, Ю. А., Вульфсон, А. Н., Колосов, М. Н. Межнуклеотидные конденсации с избытком нуклеозидного компонента - путь синтеза олигонуклеотидов, обратный традиционному // *Биоорган. химия*. – 1975. – Vol. 1. – N. 6. – P. 851–852.
61. Берлин, Ю. А., Колосов, М. Н., Чахмахчева, О. Г. Синтез олиго- и полинуклеотидов. VIII. Синтез декадезоксирибонуклеотида с использованием п-броманилидной Р-защитной группы // *Биоорган. химия*. – 1975. – Vol. 1. – N. 12. – P. 1733–1737.
62. Shumyantzeva, V. V., Sokolova, N. I., Shabarova, Z. A. Modification of end phosphate groups in mono- and oligonucleotides // *Nucleic Acids Res.* – 1976. – Vol. 3. – N. 4. – P. 903–916.
63. Зарытова, В. Ф., Иванова, Е. М., Лебедев, А. В. Исследование механизма химического

- синтеза олигонуклеотидов. VIII. Промежуточные соединения при взаимодействии 3'-О-ацетилтимидин-5'-фосфата с дициклогексилкарбодиимидом // Биоорган. химия. – 1976. – Vol. 2. – N. 2. – P. 189–198.
64. Knorre, D. G., Zarytova, V. F. The mechanism of the chemical synthesis of oligonucleotides and its synthetic consequences. // Nucleic Acids Res. – 1976. – Vol. 3. – N. 10. – P. 2709–2729.
65. Drutsa, V. L., Zarytova, V. F., Knorre, D. G., Lebedev, A. V., Sokolova, N. I., Shabarova, Z. A. Investigation of activation of phosphate groups in mono- and oligonucleotides with mesitoyl chloride // Nucleic Acids Res. – 1978. – Vol. 5. – N. 1. – P. 185–193.
66. Ogilvie, K. K., Beaucage, S. L., Entwistle, D. W. A facile method for the removal of phosphate protecting groups in nucleotide synthesis // Tetr. Lett. – 1976. – Vol. 17. – N. 16. – P. 1255–1256.
67. Beaucage, S. L., Caruthers, M. H. Deoxynucleoside phosphoramidites—A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis // Tetr. Lett. – 1981. – Vol. 22. – N. 20. – P. 1859–1862.
68. Matteucci, M. D., Caruthers, M. H. Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support // J. Am. Chem. Soc. – 1981. – Vol. 103. – N. 11. – P. 3185–3191.
69. Sinha, N. D., Biernat, J., McManus, J., Köster, H. Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII.1.2): use of  $\beta$ -cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product // Nucl. Acids Res. – 1984. – Vol. 12. – N. 11. – P. 4539–4557.
70. Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties // Methods Mol. Biol. – 1993. – Vol. 20. – N. Springer. – P. Editor: S. Agrawal.
71. Wincott, F. E. Strategies for Oligoribonucleotide Synthesis According to the Phosphoramidite Method // Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem. – 2000. – P. 3.5.1–3.5.12.
72. Bellon, L. Oligoribonucleotides with 2'-O-(tert-butyldimethylsilyl) groups // Curr Protoc Nucleic Acid Chem. – 2001. – Chapter 3. – Unit 3.6. – P. 3.6.1-3.6.13.
73. Guzaev, A. P. Solid-phase supports for oligonucleotide synthesis // Curr. Protoc Nucleic Acid Chem. – 2013. – N. Chapter 3. – P. 3.1.1-3.1.60.
74. Belikova, A. M., Zarytova, V. F., Grineva, N. I. Synthesis of ribonucleosides and diribonucleoside phosphates containing 2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues // Tetrahedron Lett. – 1967. – Vol. 8. – N. 37. – P. 3557–3562.
75. Grineva, N. I., Karpova, G. G. Complementarily addressed modification of rRNA with p(chloroethylmethylamino)benzylidene hexanucleosides // FEBS Lett. – 1973. – Vol. 32. – N. 2. – P. 351–355.

76. Бенимецкая, Л. З., Карпова, Г. Г., Гринева, Н. И. Алкилированные основания, образующиеся при 5'-комплементарно адресованной модификации ДНК, и кинетика их элиминирования в условиях алкилирования // *Биоорган. химия.* – 1978. – Vol. 4. – N. 10. – P. 1372–1381.
77. Бенимецкая, Л. З., Герасимова, Л. М., Карпова, Г. Г., Крутилина, А. И., Ли, Л. И., Гринева, Н. И. Специфическая фрагментация ДНК фага  $\lambda$  вблизи 5'-концов олиготимидиловых последовательностей с помощью алкилирования в комплементарном комплексе // *Биохимия.* – 1979. – Vol. 44. – N. 5. – P. 803–810.
78. Knorre, D. G., Vlasov, V. V. Reactive Derivatives of Nucleic Acids and Their Components as Affinity Reagents // *Russ. Chem. Rev.* – 1985. – Vol. 54. – N. 9. – P. 836–851.
79. Fedorova, O. S., Knorre, D. G., Podust, L. M., Zarytova, V. F. Complementary addressed modification of double-stranded DNA within a ternary complex // *FEBS Lett.* – 1988. – Vol. 228. – N. 2. – P. 273–276.
80. Benimetskaya, L. Z., Bulychev, N. V., Kozionov, A. L., Koshkin, A. A., Lebedev, A. V., Novozhilov, S. Y., Stockman, M. I. Site-specific laser modification (cleavage) of oligodeoxynucleotides // *Biopolymers.* – 1989. – Vol. 28. – N. 6. – P. 1129–1147.
81. Frolova, E. I., Ivanova, E. M., Zarytova, V. F., Abramova, T. V., Vlassov, V. V. Porphyrin-linked oligonucleotides Synthesis and sequence-specific modification of ssDNA // *FEBS Lett.* – 1990. – Vol. 269. – N. 1. – P. 101–104.
82. Godovikova, T. S., Knorre, V. D., Maksakova, G. A., Sil'nikov, V. N. Synthesis of Azidoaniline Derivatives of Oligonucleotides and Investigation of Their Photochemical Behavior // *Bioconjug. Chem.* – 1996. – Vol. 7. – N. 3. – P. 343–348.
83. Zarytova, V., Ivanova, E., Venyaminova, A. Design of Functional Diversity in Oligonucleotides via Zwitter-Ionic Derivatives of Deprotected Oligonucleotides // *Nucleosides and Nucleotides.* – 1998. – Vol. 17. – N. 1–3. – P. 649–662.
84. Бащук, О. С., Зарытова, В. Ф., Левина, А. С. Синтез производных олигонуклеотидов, содержащих NH<sub>2</sub>- и SH-группы, на полимерном носителе. Введение спиновых, флуоресцентных и других меток // *Биоорган. химия.* – 1988. – Vol. 14. – N. 5. – P. 606–614.
85. Brumbaugh, J. A., Middendorft, L. R., Gronet, D. L., Ruth, J. L. Continuous , on-line DNA sequencing using oligodeoxynucleotide primers with multiple fluorophores // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1988. – Vol. 85. – N. 15. – P. 5610–5614.
86. Voss, H., Schwager, C., Wirkner, U., Sproat, B., Zimmermann, J., Rosenthal, A., Erfie, H., Stegemann, J., Ansorge, W. Direct genomic fluorescent on-line sequencing and analysis using in vitro amplification of DNA // *Nucleic Acids Res.* – 1989. – Vol. 17. – N. 7. – P. 2517–2527.

87. Murakami, A., Nakaura, M., Nakatsuji, Y., Nagahara, S., Tran-cong, Q., Makino, K. Fluorescent-labeled oligonucleotide // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – Vol. 19. – N. 15. – P. 4097–4102.
88. Nelson, P. S., Kent, M., Muthini, S. Oligonucleotide labeling methods 3. Direct labeling of oligonucleotides employing a novel, non-nucleosidic, 2-aminobutyl-1,3-propanediol backbone // *Nucleic Acids Res.* – 1992. – Vol. 20. – N. 23. – P. 6253–6259.
89. Reed, M. W., Adams, A. D., Nelson, J. S., Meyer, R. B. Acridine- and cholesterol-derivatized solid supports for improved synthesis of 3'-modified oligonucleotides. // *Bioconjug. Chem.* – 1991. – Vol. 2. – N. 4. – P. 217–225.
90. Mackellar, C., Graham, D., Will, D. W., Burgess, S., Brown, T. Synthesis and physical properties of anti-H IV antisense oligonucleotides bearing terminal lipophilic groups // *Nucleic Acids Res.* – 1992. – Vol. 20. – N. 13. – P. 3411–3417.
91. Zhang, G., Sun, D. K., Ikeuchi, T., Sarin, P. S. Cholesteryl-conjugated oligonucleotides : Synthesis , properties , and activity as inhibitors of replication of human immunodeficiency virus in cell culture // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 1989. – Vol. 86. – N. 17. – P. 6553–6556.
92. Bauer, I. A., Dmitrienko, E. V. Amphiphilic Oligonucleotide Derivatives—Promising Tools for Therapeutics // *Pharmaceutics.* – 2024. – Vol. 16. – N. 11. – P. 1447.
93. Татульченков, М. Ю., Прохоренко, И. А., Квач, М. В., Новаковский, М. Е., Степанова, И. А., Пильченко, Н. В., Гонтарев, С. В., Шарко, О. Л., Коршун, В. А., Шманай, В. В. Амидофосфитные реагенты и твердофазные носители на основе гидроксипропилола для синтеза модифицированных олигонуклеотидов // *Биоорган. химия.* – 2017. – Vol. 43. – N. 4. – P. 377–387.
94. Tanaka, Y., Tanioku, Y., Nakayama, T., Aso, K., Yamaguchi, T., Kamada, H., Obika, S. Synthesis of multivalent fatty acid-conjugated antisense oligonucleotides: Cell internalization, physical properties, and in vitro and in vivo activities // *Bioorg. Med. Chem.* – 2023. – Vol. 81. – P. 117192.
95. Manoharan, M. Modified iRNA agents // *US Pat.* – 2005. – P. 20050107325 A1 US.
96. Manoharan, M., Rajeev, K. G., Narayanannair, J. K., Maier, M. Carbohydrate conjugates as delivery agents for oligonucleotides // 2012. – P. patent US8106022B2.
97. Prakash, T. P., Graham, M. J., Yu, J., Carty, R., Low, A., Chappell, A., Schmidt, K., Zhao, C., Aghajan, M., Murray, H. F., Riney, S., Booten, S. L., Murray, S. F., Gaus, H., Crosby, J., Lima, W. F., Guo, S., Monia, B. P., Swayze, E. E., Seth, P. P. Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – Vol. 42. – N. 13. – P. 8796–8807.

98. Jahns, H., Degaonkar, R., Podbevsek, P., Gupta, S., Bisbe, A., Aluri, K., Szeto, J., Kumar, P., LeBlanc, S., Racie, T., Brown, C. R., Castoreno, A., Guenther, D. C., Jadhav, V., Maier, M. A., Plavec, J., Egli, M., Manoharan, M., Zlatev, I. Small circular interfering RNAs (sciRNAs) as a potent therapeutic platform for gene-silencing // *Nucleic Acids Res.* – 2021. – Vol. 49. – N. 18. – P. 10250–10264.
99. Nair, J. K., Willoughby, J. L. S., Chan, A., Charisse, K., Alam, M. R., Wang, Q., Hoekstra, M., Kandasamy, P., Kel'in, A. V., Milstein, S., Taneja, N., O'Shea, J., Shaikh, S., Zhang, L., van der Sluis, R. J., Jung, M. E., Akinc, A., Hutabarat, R., Kuchimanchi, S., Fitzgerald, K., Zimmermann, T., van Berkel, T. J. C., Maier, M. A., Rajeev, K. G., Manoharan, M. Multivalent N-Acetylgalactosamine-Conjugated siRNA Localizes in Hepatocytes and Elicits Robust RNAi-Mediated Gene Silencing // *J. Am. Chem. Soc.* – 2014. – Vol. 136. – N. 49. – P. 16958–16961.
100. Rajeev, K. G., Nair, J. K., Jayaraman, M., Charisse, K., Taneja, N., O'Shea, J., Willoughby, J. L. S., Yucius, K., Nguyen, T., Shulga-Morskaya, S., Milstein, S., Liebow, A., Querbes, W., Borodovsky, A., Fitzgerald, K., Maier, M. A., Manoharan, M. Hepatocyte-Specific Delivery of siRNAs Conjugated to Novel Non-nucleosidic Trivalent N-Acetylgalactosamine Elicits Robust Gene Silencing in Vivo Dr. Kallanthottathil G. Rajeev, Dr. Jayaprakash K. Nair, Dr. Muthusamy Jayaraman, Dr. Klaus Charisse, Nate Tan // *ChemBioChem.* – 2015. – Vol. 16. – N. 6. – P. 903–908.
101. Matsuda, S., Keiser, K., Nair, J. K., Charisse, K., Manoharan, R. M., Kretschmer, P., Peng, C. G., Kel'in, A. V., Kandasamy, P., Willoughby, J. L. S., Liebow, A., Querbes, W., Yucius, K., Nguyen, T., Milstein, S., Maier, M. A., Rajeev, K. G., Manoharan, M. siRNA Conjugates Carrying Sequentially Assembled Trivalent N-Acetylgalactosamine Linked Through Nucleosides Elicit Robust Gene Silencing In Vivo in Hepatocytes // *ACS Chem. Biol.* – 2015. – Vol. 10. – N. 5. – P. 1181–1187.
102. Prakash, T. P., Wan, W. B., Low, A., Yu, J., Chappell, A. E., Gaus, H., Kinberger, G. A., Østergaard, M. E., Migawa, M. T., Swayze, E. E., Seth, P. P. Solid-phase synthesis of 5'-triantennary N-acetylgalactosamine conjugated antisense oligonucleotides using phosphoramidite chemistry // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2015. – Vol. 25. – N. 19. – P. 4127–4130.
103. Nair, J. K., Attarwala, H., Sehgal, A., Wang, Q., Aluri, K., Zhang, X., Gao, M., Liu, J., Indrakanti, R., Schofield, S., Kretschmer, P., Brown, C. R., Gupta, S., Willoughby, J. L. S., Boshart, J. A., Jadhav, V., Charisse, K., Zimmermann, T., Fitzgerald, K., Manoharan, M., Rajeev, K. G., Akinc, A., Hutabarat, R., Maier, M. A. Impact of enhanced metabolic stability on pharmacokinetics and pharmacodynamics of GalNAc-siRNA conjugates // *Nucleic Acids Res.* –

2017. – Vol. 45. – N. 19. – P. 10969–10977.

104. Yamamoto, T., Sawamura, M., Wada, F., Harada-Shiba, M., Obika, S. Serial incorporation of a monovalent GalNAc phosphoramidite unit into hepatocyte-targeting antisense oligonucleotides // *Bioorg. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 24. – N. 1. – P. 26–32.

105. Yamamoto, T., Terada, C., Kashiwada, K., Yamayoshi, A., Harada-Shiba, M., Obika, S. Synthesis of Monovalent N-Acetylgalactosamine Phosphoramidite for Liver-Targeting Oligonucleotides // *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* – 2019. – Vol. 78. – N. 1. – P. e99.

106. Springer, A. D., Dowdy, S. F. GalNAc-siRNA Conjugates: Leading the Way for Delivery of RNAi Therapeutics // *Nucleic Acid Ther.* – 2018. – Vol. 28. – N. 3. – P. 109–118.

107. Biscansa, A., Colesa, A., Echeverria, D., Khvorova, A. The valency of fatty acid conjugates impacts siRNA pharmacokinetics, distribution, and efficacy in vivo // *J. Control. Release.* – 2019. – Vol. 302. – P. 116–125.

108. Nikan, M., Osborn, M. F., Coles, A. H., Biscans, A., Godinho, B. M. D. C., Haraszti, R. A., Sapp, E., Echeverria, D., DiFiglia, M., Aronin, N., Khvorova, A. Synthesis and Evaluation of Parenchymal Retention and Efficacy of a Metabolically Stable, O-phosphocholine-N-docosahexaenoyl-L-serine siRNA Conjugate in Mouse Brain // *Bioconjug. Chem.* – 2017. – Vol. 28. – N. 6. – P. 1758–1766.

109. Vu, H., Schmaltz Hill, T., Jayaraman, K. Synthesis and Properties of Cholesteryl-Modified Triple-Helix Forming Oligonucleotides Containing a Triglycyl Linker // *Bioconjug. Chem.* – 1994. – Vol. 5. – N. 6. – P. 666–668.

110. Ries, O., Löffler, P. M. G., Vogel, S. Convenient synthesis and application of versatile nucleic acid lipid membrane anchors in the assembly and fusion of liposomes // *Org. Biomol. Chem.* – 2015. – Vol. 13. – N. 37. – P. 9673–9680.

111. Sharma, V. K., Osborn, M. F., Hassler, M. R., Echeverria, D., Ly, S., Ulashchik, E. A., Martynenko-Makaev, Y. V., Shmanai, V. V., Zatsepin, T. S., Khvorova, A., Watts, J. K. Novel Cluster and Monomer-Based GalNAc Structures Induce Effective Uptake of siRNAs in Vitro and in Vivo // *Bioconjug. Chem.* – 2018. – Vol. 29. – N. 7. – P. 2478–2488.

112. Matulic-Adamic, J., Serebryany, V., Haeberli, P., Mokler, V. R., Beigelman, L. Synthesis of N-acetyl-D-galactosamine and folic acid conjugated ribozymes. // *Bioconjug. Chem.* – 2002. – Vol. 13. – N. 5. – P. 1071–1078.

113. Neuner, P. New non nucleosidic phosphoramidite reagent for solid phase synthesis of biotinylated oligonucleotides // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 1996. – Vol. 6. – N. 2. – P. 147–152.

114. Ugarte-Urbe, B., Grijalvo, S., Busto, J. V., Martín, C., Eritja, R., Goñi, F. M., Alkorta, I. Double-tailed lipid modification as a promising candidate for oligonucleotide delivery in

- mammalian cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – Vol. 1830. – N. 10. – P. 4872–4884.
115. Grijalvo, S., Ocampo, S. M., Perales, J. C., Eritja, R. Synthesis of Lipid\_Oligonucleotide Conjugates for RNA Interference Studies // *Chem. Biodivers.* – 2011. – Vol. 8. – N. 2. – P. 287–299.
116. Misiura, K., Durrant, I., Evans, M. R., Gait, M. J. Biotinyl and phosphotyrosinyl phosphoramidite derivatives useful in the incorporation of multiple reporter groups on synthetic oligonucleotides // *Nucleic Acids Res.* – 1990. – Vol. 18. – N. 15. – P. 4345–4354.
117. Vu, H., Singh, P., Lewis, L., Zendegui, J. G., Jayaraman, K. Synthesis of Cholesteryl Supports and Phosphoramidite for Automated DNA Synthesis of Triple-Helix Forming Oligonucleotides (Tfos) // *Nucleosides Nucleotides.* – 1993. – Vol. 12. – N. 8. – P. 853–864.
118. Kayushin, A., Demekhina, A., Korosteleva, M., Miroshnikov, A., Azhayev, A. Synthesis of Biotin-Containing Phosphoramidite Linker with Polyether Spacer Arm // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* – 2011. – Vol. 30. – N. 7–8. – P. 490–502.
119. Manoharan, M., Inamati, G., Tivel, K. L., Conklin, B., Ross, B. S., Cook, P. D. 2'- and 3'-Cholesterol-Conjugated Adenosine and Cytosine Nucleoside Building Blocks: Synthesis of Lipidic Nucleic Acids // *Nucleosides and Nucleotides.* – 1997. – Vol. 16. – N. 7–9. – P. 1141–1143.
120. Lorenz, C., Hadwiger, P., John, M., Vornlocher, H.-P., Unverzagt, C. Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2004. – Vol. 14. – N. 19. – P. 4975–7.
121. Kim, S. J., Bang, E. K., Kwon, H. J., Shim, J. S., Kim, B. H. Modified Oligonucleotides Containing Lithocholic Acid in Their Backbones: Their Enhanced Cellular Uptake and Their Mimicking of Hairpin Structures // *ChemBioChem.* – 2004. – Vol. 5. – N. 11. – P. 1517 – 1522.
122. Kupryushkin, M. S., Pyshnyi, D. V. A convenient method for the synthesis of phosphoramidite non-nucleotide inserts for preparation of functionalized oligonucleotides // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2012. – Vol. 38. – N. 6. – P. 662–666.
123. Kupryushkin, M. S., Konevets, D. A., Vasilyeva, S. V., Kuznetsova, A. S., Stetsenko, D. A., Pyshnyi, D. V. Oligonucleotide Functionalization by a Novel Alkyne-Modified Nonnucleosidic Reagent Obtained by Versatile Building Block Chemistry // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* – 2013. – Vol. 32. – N. 6. – P. 306–319.
124. Kupryushkin, M. S., Nekrasov, M. D., Stetsenko, D. A., Pyshnyi, D. V. Efficient Functionalization of Oligonucleotides by New Achiral Nonnucleosidic Monomers // *Org. Lett.* – 2014. – Vol. 16. – N. 11. – P. 2842–2845.
125. Maier, M. A., Yannopoulos, C. G., Mohamed, N., Roland, A., Fritz, H., Mohan, V., Just,

- G., Manoharan, M. Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting // *Bioconjug. Chem.* – 2003. – Vol. 14. – N. 1. – P. 18–29.
126. Seo, Y. J., Jeong, H. S., Bang, E.-K., Hwang, G. T., Jung, J. H., Jang, S. K., Kim, B. H. Cholesterol-linked fluorescent molecular beacons with enhanced cell permeability. // *Bioconjug. Chem.* – 2006. – Vol. 17. – N. 5. – P. 1151–5.
127. Yang, J., Chen, C., Tang, X. Cholesterol-Modified Caged siRNAs for Photoregulating Exogenous and Endogenous Gene Expression // *Bioconjug. Chem.* – 2018. – Vol. 29. – N. 4. – P. 1010–1015.
128. Chen, C., Jing, N., Wang, Z., Zhang, Y., Chen, W., Tang, X. Multimerized self-assembled caged two-in-one siRNA nanoparticles for photomodulation of RNAi-induced gene silencing // *Chem. Sci.* – 2020. – Vol. 11. – N. 45. – P. 12289.
129. Wang, Q., Fan, X., Jing, N., Zhao, H., Yu, L., Tang, X. Photoregulation of Gene Expression with Ligand-Modified Caged siRNAs through Host/Guest Interaction // *ChemBioChem.* – 2021. – Vol. 22. – N. 11. – P. 1901–1907.
130. Ji, Y., Yang, J., Wu, L., Yu, L., Tang, X. Photochemical Regulation of Gene Expression Using Caged siRNAs with Single Terminal VitaminE Modification // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2016. – Vol. 55. – N. 6. – P. 2152–2156.
131. Nishina, K., Unno, T., Uno, Y., Kubodera, T., Kanouchi, T., Mizusawa, H., Yokota, T. Efficient in vivo delivery of siRNA to the liver by conjugation of alpha-tocopherol // *Mol. Ther.* – 2008. – Vol. 16. – N. 4. – P. 734–40.
132. Vinogradov, S. V., Suzdaltseva, Y. G., Kabanov, A. V. Block Polycationic Oligonucleotide Derivative: Synthesis and Inhibition of Herpes Virus Reproduction // *Bioconjug. Chem.* – 1996. – Vol. 7. – N. 1. – P. 3–6.
133. Sproat, B. S., Rupp, T., Menhardt, N., Keane, D., Beijer, B., GmbH, I., Landstrasse, O., Rosdorf, D.-. Fast and simple purification of chemically modified hammerhead ribozymes using a lipophilic capture tag // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – Vol. 27. – N. 8. – P. 1950–1955.
134. Musumeci, D., Montesarchio, D. Synthesis of a Cholesteryl-HEG Phosphoramidite Derivative and Its Application to Lipid-conjugates of the Anti-HIV 5'TGGGAG3' Hotoda's Sequence // *Molecules.* – 2012. – Vol. 17. – N. 10. – P. 12378–12392.
135. Cedillo, I., Chreng, D., Engle, E., Chen, L., McPherson, A., Rodriguez, A. Synthesis of 5'-GalNAc-Conjugated Oligonucleotides: A Comparison of Solid and Solution-Phase Conjugation Strategies // *Molecules.* – 2017. – Vol. 22. – N. 8. – P. 1356.
136. Lo, H., Virta, P., Katajisto, J., Niittymä, T. Solid-supported synthesis of oligomeric

- bioconjugates // Tetrahedron. – 2003. – Vol. 59. – N. 642. – P. 5137–5174.
137. Lönnberg, H. Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotide Conjugates Useful for Delivery and Targeting of Potential Nucleic Acid Therapeutics // Bioconjug. Chem. – 2009. – Vol. 20. – N. 6. – P. 1065–1094.
138. Raouane, M., Desmaële, D., Urbinati, G., Massaad-Massade, L., Couvreur, P. Lipid Conjugated Oligonucleotides: A Useful Strategy for Delivery // Bioconjug. Chem. – 2012. – Vol. 23. – N. 6. – P. 1091–1104.
139. Müggenburg, F., Müller, S. Azide-Modified Nucleosides as Versatile Tools for Bioorthogonal Labeling and Functionalization // Chem. Rec. – 2022. – Vol. 22. – N. 5. – P. e202100322.
140. Nelson, P. S., Sherman-Gold, R., Leon, R. A new and versatile reagent for incorporating multiple primary aliphatic amines into synthetic oligonucleotides // Nucleic Acids Res. – 1989. – Vol. 17. – N. 1. – P. 7179–7186.
141. Nelson, P. S., Frye, R. A., Liu, E., Division, D. C., Laboratories, C., Alto, P., Hill, C. Bifunctional oligonucleotide probes synthesized using a novel CPG support are able to detect single base pair mutations // Nucleic Acids Res. – 1989. – Vol. 17. – N. 18. – P. 7187–7194.
142. Rydzik, A. M., Balk, R., Koegler, M., Steinle, T., Riether, D., Gottschling, D. Access to 1'-Amino Carbocyclic Phosphoramidite to Enable Postsynthetic Functionalization of Oligonucleotides // Org. Lett. – 2021. – Vol. 23. – N. 17. – P. 6735–6739.
143. Franzini, R. M., Kool, E. T. Two successive reactions on a DNA template: a strategy for improving background fluorescence and specificity in nucleic acid detection // Chemistry (Easton). – 2011. – Vol. 17. – N. 7. – P. 2168–2175.
144. Zatsepin, T. S., Romanova, E. A., Oretskaya, T. S. Nucleosides and oligonucleotides containing 2'-reactive groups: synthesis and applications // Russ. Chem. Rev. – 2004. – Vol. 73. – N. 7. – P. 701–733.
145. Danielsen, M. B., Wengel, J. Cationic oligonucleotide derivatives and conjugates: A favorable approach for enhanced DNA and RNA targeting oligonucleotides // Beilstein J. Org. Chem. – 2021. – Vol. 17. – P. 1828–1848.
146. <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/amine-reactive-crosslinker-chemistry.html> (дата обращения 20.08.2026).
147. Zapata, E., Bui, N. K. N., Selberg, S., Leito, I., Herodes, K. N-hydroxysuccinimidyl derivatization reagents, friends or foes? From synthesis to derivatization of amino compounds and their analysis using liquid chromatography tandem mass spectrometry // Discov. Appl. Sci. –

2025. – Vol. 7. – P. 135.

148. Montalbetti, C. A., Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling // *Tetrahedron*. – 2005. – Vol. 61. – N. 46. – P. 10827–10852.

149. Sheehan, J. C., Hess, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds // *J. Am. Chem. Soc.* – 1955. – Vol. 77. – N. 4. – P. 1067–1068.

150. Albert, J. S., Hamilton, A. D., Hart, A. C., Feng, X., Lin, L., Wang, Z. 1,3-Dicyclohexylcarbodiimide // *e-EROS Encycl. Reagents Org. Synth.* – 2017. – P. 1–9.

151. Nora, G. P., Schous, C., Troyer, S. M., Miller, M. 1,3-Diisopropylcarbodiimide. // *e-EROS Encycl. Reagents Org. Synth.* – 2003. – P. 1–5.

152. Sheehan, J. C., Cruickshank, P. A. 1-Ethyl-3-(3-Dimethylamino)propylcarbodiimide Hydrochloride and Methiodide // *Org. Synth.* – 1968. – Vol. 48. – P. 83.

153. Pottorf, R. S., Szeto, P. 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide Hydrochloride // *e-EROS Encycl. Reagents Org. Synth.* – 2001. – P. 1–3.

154. Shibnev, V. A., Chuvaeva, T. P., Martynova, G. A., Poroshin, K. T. N-hydroxysuccinimide esters in the synthesis of collagen-type structures // *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci.* – 1969. – Vol. 18. – N. 11. – P. 2367–2370.

155. Knight, D. W. N-Hydroxysuccinimide // *e-EROS Encycl. Reagents Org. Synth.* – 2001. – P. 1–2.

156. Jones, K., DeAmicis, C., Brown, L. J., Brown, R. C. D. Pentafluorophenol // *e-EROS Encycl. Reagents Org. Synth.* – 2019. – P. 1–14.

157. Lygo, B., Pelletier, G. 1-Hydroxybenzotriazole // *e-EROS Encycl. Reagents Org. Synth.* – 2013. – P. 1–10.

158. Carpino, L. A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive // *J. Am. Chem. Soc.* – 1993. – Vol. 115. – N. 10. – P. 4397–4398.

159. 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.

160. Knorr, R., Trzeciak, A., Bannwarth, W., Gillessen, D. New coupling reagents in peptide chemistry // *Tetrahedron Lett.* – 1989. – Vol. 30. – N. 15. – P. 1927–1930.

161. 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. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2002. – Vol. 41. – N. 3. – P. 441–445.

162. Albericio, F., Kates, S. A., Carpino, L. A. N-[(Dimethylamino)-1H-1,2,3-triazolo-[4,5-

- b]pyridin-1-ylmethylene]-N-methylmethanaminium Hexafluorophosphate N-Oxide // e-EROS Encycl. Reagents Org. Synth. – 2001. – P. 1–2.
163. Tollens, B. Ueber ammon-alkalische Silberlösung als Reagens auf Aldehyd [On an ammonical alkaline silver solution as a reagent for aldehydes] // Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft (in Ger. – 1882. – Vol. 15. – N. 2. – P. 1635–1639.
164. Staab, H. A. Reaktionsfähige heterocyclische diamide der kohlensäure // Justus. Liebigs Ann. Chem. – 1957. – Vol. 609. – N. 1. – P. 75–83.
165. Staab, H. A. Reaktionsfähige N-Carbonsäureester und N-carbonsäureamide des imidazols und triazols // Justus Liebigs Ann. Chem. – 1957. – Vol. 609. – N. 1. – P. 83–88.
166. Staab, H. A. Syntheses Using Heterocyclic Amides (Azolides) // Angew. Chemie Int. Ed. – 1962. – Vol. 1. – N. 7. – P. 351–367.
167. Staab, H. A., Maleck, G. Über den mechanismus der reaktion von n,n'-carbonyl-di-azolen mit carbonsäuren zu carbonsäure-azoliden // Chem. Berichte (in Ger. – 1966. – Vol. 99. – N. 9. – P. 2955–2961.
168. Ford, M. J., Ley, S. V. A simple, one-pot, glycosidation procedure via (1-imidazolylcaronyl) glycosides and zinc bromide // SynLett. – 1990. – N. 5. – P. 255–256.
169. Armstrong, A., Li, W. N,N'-Carbonyldiimidazole // e-EROS Encycl. Reagents Org. Synth. – 2007. – P. 1–8.
170. Ogura, H., Kobayashi, T., Shimizu, K., Kawabe, K., Takeda, K. A novel active ester synthesis reagent (N,N'-disuccinimidyl carbonate) // Tetrahedron Lett. – 1979. – Vol. 20. – N. 49. – P. 4745–4746.
171. Ghosh, A. K., Duong, T. T., McKee, S. P., Thompson, W. J. N,N'-Disuccinimidyl carbonate: a useful reagent for alkoxycarbonylation of amines // Tetrahedron Lett. – 1992. – Vol. 33. – N. 20. – P. 2781–2784.
172. Pereira, D., Hai, T. T., Nelson, D. A convenient large scale synthesis of N,N'-disuccinimidyl carbonate // Synth. Commun. – 1998. – Vol. 28. – N. 21. – P. 4019–4024.
173. Simon, M., Csunderlik, C., Jones, P. G., Neda, I., Tarta-Micle, A. N,N'-Disuccinimidyl carbonate // Acta Cryst/ Sect. E. – 2003. – Vol. 59. – N. 5. – P. o683–o685.
174. Davison, E. C., Ghosh, A. K., Kumaragurubaran, N., Morris, D. T. J., Clayden, J. N,N'-Disuccinimidyl Carbonate // e-EROS Encycl. Reagents Org. Synth. – 2018. – P. 1–8.
175. Li, T., Vanderah, D. Solubility of N, N'-disuccinimidyl carbonate and its relevance to polysaccharide functionalization // Anal/ Biochem. – 2021. – Vol. 626. – P. 114250.
176. Kachalova, A., Zubin, E., Stetsenko, D., Gait, M., Oretskaya, T. Oligonucleotides with 2'-O-carboxymethyl group: synthesis and 2'-conjugation via amide bond formation on solid phase //

- Org. Biomol. Chem. – 2004. – Vol. 2. – N. 19. – P. 2793–2797.
177. Roose, P., Eller, K., Henkes, E., Rossbacher, R., Höke, H. Amines, Aliphatic // Ullmann's Encycl. Ind. Chem. – 2015. – P. 1–15.
178. Von Hofmann, A. W. Beiträge zur Kenntniss der flüchtigen organischen Basen // Ann. Der Chemie Und Pharm. – 1851. – Vol. 78. – N. 3. – P. 253–286.
179. Gabriel, S. Ueber eine Darstellungsweise primärer Amine aus den entsprechenden Halogenverbindungen // Berichte Der Dtsch. Chem. Gesellschaft (Series A,B). – 1887. – Vol. 20. – N. 2. – P. 2224–2236.
180. Klyuev, M. V, Khidekel, M. L. Catalytic Amination of Alcohols, Aldehydes, and Ketones // Russ. Chem. Rev. – 1980. – Vol. 49. – N. 1. – P. 14–27.
181. Abdel-Magid, A. F., Carson, K. G., Harris, B. D., Maryanoff, C. A., Shah, R. D. Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures // J. Org. Chem. – 1996. – Vol. 61. – N. 11. – P. 3849–3862.
182. Zhang, S., Hu, Y., Li, M., Xie, Y. Reductive Amination of Aldehyde and Ketone with Ammonia and H<sub>2</sub> by an In Situ-Generated Cobalt Catalyst under Mild Conditions // Org. Lett. – 2024. – Vol. 26. – P. 7122–7127.
183. Wolff, H. The Schmidt Reaction // Org. React. Ed. by Scott E. Denmark ; John Wiley Sons, Inc. – 1946. – Vol. 3. – ch8. – P. 307–336.
184. Wroblewski, A., Coombs, T. C., Huh, C. W., Li, S.-W., Aubé, J. The Schmidt Reaction // Org. React. Ed. by Scott E. Denmark ; John Wiley Sons, Inc. – 2012. – Vol. 78. – ch1. – P. 1–320.
185. Hofmann, A. W. Ueber die Einwirkung des Broms in alkalischer Lösung auf Amide [On the action of bromine in alkaline solution on amides] // Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft. – 1881. – Vol. 14. – N. 2. – P. 2725–2736.
186. Book Editors,: Glaser, H.; Möller, F.; Pieper, G.; Schröter, R.; Spielberger, G.; Söll, H. Methoden der Organischen Chemie. XI/1. Stickstoffverbindungen // Methoden der Org. Chemie. XI/1. Stickstoffverbindungen. – 1957.
187. Ioffe, S. L., Tartakovskii, V. A., Novikov, S. S. Selective reduction of aliphatic nitro-compounds with other functional groups // Russ. Chem. Rev. – 1966. – Vol. 35. – N. 1. – P. 19–32.
188. Ram, S., Ehrenkauf, R. E. A general procedure for mild and rapid reduction of aliphatic and aromatic nitro compounds using ammonium formate as a catalytic hydrogen transfer agent // Tetrahedron Lett. – 1984. – Vol. 25. – N. 32. – P. 3415–3418.

189. Biggs, B. S., Bishop, W. S. Decamethylenediamine // *Org. Synth.* – 1947. – Vol. 27. – P. 18.
190. Barrault, J., Pouilloux, Y. Synthesis of fatty amines. Selectivity control in presence of multifunctional catalysts // *Catal. Today.* – 1997. – Vol. 37. – N. 2. – P. 137–153.
191. Smith, D. R., Maienthal, M., Tipton, J. Reduction of oximes with lithium aluminum hydride // *J. Org. Chem.* – 1952. – Vol. 17. – N. 2. – P. 294–297.
192. Boyer, H. Reduction of Organic Azides to Primary Amines with Lithium Aluminum Hydride // *J. Am. Chem. Soc.* – 1951. – Vol. 73. – N. 12. – P. 5865–5866.
193. Kamal, A., Reddy, P. S. M. M., Reddy, D. R. Simple and facile reduction of azides to amines: synthesis of DNA interactive pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepines // *Tetrahedron Lett.* – 2002. – Vol. 43. – N. 37. – P. 6629–6631.
194. Curtius, T. Ueber Stickstoffwasserstoffsäure (Azoimid) N<sub>3</sub>H [On hydrazoic acid (azoimide) N<sub>3</sub>H] // *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft zu Berlin.* – 1890. – Vol. 23. – N. 2. – P. 3023–3033.
195. Curtius, T. 20. Hydrazide und Azide organischer Säuren I. Abhandlung [Hydrazides and azides of organic acids I. paper] // *J. für Prakt. Chemie.* – 1894. – Vol. 50. – N. 1. – P. 275–294.
196. Smith, P. A. S. The Curtius reaction // *Org. React. John Wiley Sons, Inc.* – 1946. – Vol. 3. – N. chapter 9. – P. 337–449.
197. Kaiser, C., Weinstock, J. Amines from mixed carboxylic-carbonic anhydrides: 1-phenylcyclopentylamine // *Org. Synth. Collect. Vol.* – 1988. – Vol. 6. – N. (1971, V51, N48 check). – P. 910.
198. Scriven, E. F. V., Turnbull, K. Azides: their preparation and synthetic uses // *Chem. Rev.* – 1988. – Vol. 88. – N. 2. – P. 297–368.
199. Ghosh, A. K., Sarkar, A., Brindisi, M. The Curtius rearrangement: mechanistic insight and recent applications in natural product syntheses // *Org. Biomol. Chem.* – 2018. – Vol. 16. – N. 12. – P. 2006–2027.
200. Jaradat, D. M. M. Thirteen decades of peptide synthesis: key developments in solid phase peptide synthesis and amide bond formation utilized in peptide ligation // *Amino Acids.* – 2018. – Vol. 50. – P. 39–68.
201. Tung, C. H., Stein, S. Preparation and applications of peptide-oligonucleotide conjugates. // *Bioconjug. Chem.* – 2000. – Vol. 11. – N. 5. – P. 605–618.
202. 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.

203. Gras, M., Smietana, M., Adler, P. Peptide-Oligonucleotide Conjugates: Catalytic Preparation in Aqueous Solution or On-Column // *Curr. Protoc.* – 2025. – Vol. 5. – N. 6. – P. e70154.
204. Howarth, N. M., Wakelin, L. P. G.  $\alpha$ -PNA: A Novel Peptide Nucleic Acid Analogue of DNA // *J. Org. Chem.* – 1997. – Vol. 62. – N. 16. – P. 5441–5450.
205. Nielsen, P. E. Applications of peptide nucleic acids // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 1999. – Vol. 10. – N. 1. – P. 71–75.
206. Porcheddu, A., Giacomelli, G. Peptide Nucleic Acids (PNAs), A Chemical Overview // *Curr. Med. Chem.* – 2005. – Vol. 12. – N. 22. – P. 2561–2599.
207. Antsyrovich, S. I. Peptide nucleic acids: structure, properties, applications, strategies and practice of chemical synthesis // *Russ. Chem. Rev.* – 2002. – Vol. 71. – N. 1. – P. 71–83.
208. Sharma, C., Awasthi, S. K. Versatility of peptide nucleic acids (PNAs): role in chemical biology, drug discovery, and origins of life // *Chem. Biol. Drug Des.* – 2017. – Vol. 89. – N. 1. – P. 16–37.
209. Wachter, L., Jablonski, J.-A., Ramachandran, K. L. A simple and efficient procedure for the synthesis of 5'-aminoalkyl oligodeoxynucleotides // *Nucleic Acids Res.* – 1986. – Vol. 14. – N. 20. – P. 7985–7994.
210. Shevelev, G. Y., Krumkacheva, O. A., Lomzov, A. A., Kuzhelev, A. A., Rogozhnikova, O. Y., Trukhin, D. V., Troitskaya, T. I., Tormyshev, V. M., Fedin, M. V., Pyshnyi, D. V., Bagryanskaya, E. G. Physiological-Temperature Distance Measurement in Nucleic Acid using Triarylmethyl-Based Spin Labels and Pulsed Dipolar EPR Spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc.* – 2014. – Vol. 136. – N. 28. – P. 9874–9877.
211. Shevelev, G. Y., Krumkacheva, O. A., Lomzov, A. A., Kuzhelev, A. A., Trukhin, D. V., Rogozhnikova, O. Y., Tormyshev, V. M., Pyshnyi, D. V., Fedin, M. V., Bagryanskaya, E. G. Triarylmethyl Labels: Toward Improving the Accuracy of EPR Nanoscale Distance Measurements in DNAs // *J. Phys. Chem. B.* – 2015. – Vol. 119. – N. 43. – P. 13641–13648.
212. Korshun, V. A., Prokhorenko, I. A., Gontarev, S. V., Skorobogaty, M. V., Balakin, K. V., Manasova, E. V., Malakhov, A. D., Berlin, Y. A. New pyrene derivatives for fluorescent labeling of oligonucleotides // *Nucleosides Nucleotides.* – 1997. – Vol. 16. – N. 7–9. – P. 1461–1464.
213. Балакин, К. В., Коршун, В. А., Прохоренко, И. А., Малеев, Г. В., Куделина, И. А., Гонтарев, С. В., Берлин, Ю. А. Новый реагент для мечения биомолекул – активированное производное пиренового бихромофора с эксимерной флуоресценцией // *Биоорган. химия.* – 1997. – Vol. 23. – N. 1. – P. 33–41.
214. Balakin, K. V., Korshun, V. A., Mikhalev, I. I., Maleev, G. V., Malakhov, A. D.,

- Prokhorenko, I. A., YuA, B. Conjugates of oligonucleotides with polyaromatic fluorophores as promising DNA probes // *Biosens Bioelectron.* – 1998. – Vol. 13. – N. 7–8. – P. 771–778.
215. Krasheninina, O. A., Fishman, V. S., Lomzov, A. A., Ustinov, A. V., Venyaminova, A. G. Postsynthetic On-Column 2' Functionalization of RNA by Convenient Versatile Method // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21. – N. 14. – P. 5127.
216. Huisgen, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 1963. – Vol. 2. – N. 10. – P. 565–598.
217. Huisgen, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 1963. – Vol. 2. – N. 11. – P. 633–645.
218. Tornøe, C. W., Christensen, C., Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides // *J. Org. Chem.* – 2002. – Vol. 67. – N. 9. – P. 3057–3064.
219. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2002. – Vol. 41. – N. 14. – P. 2596–2599.
220. Baskin, J. M., Prescher, J. A., Laughlin, S. T., Agard, N. J., Chang, P. V., Miller, I. A., Lo, A., Codelli, J. A., Bertozzi, C. R. Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2007. – Vol. 104. – N. 43. – P. 16793–16797.
221. Rigolot, V., Biot, C., Lion, C. To View Your Biomolecule, Click inside the Cell // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2021. – Vol. 60. – N. 43. – P. 23084–23105.
222. Samira Husen Alamudi, Xiao Liu, Y.-T. C. Azide-based bioorthogonal chemistry: Reactions and its advances in cellular and biomolecular imaging // *Rev. Biophys Rev.* – 2021. – Vol. 2. – N. 2. – P. 021301.
223. El-Sagheer, A. H., Brown, T. Click chemistry with DNA // *Chem. Soc. Rev.* – 2010. – Vol. 39. – N. 4. – P. 1388–1405.
224. Yamada, T., Peng, C. G., Matsuda, S., Addepalli, H., Jayaprakash, K. N., Alam, M. R., Mills, K., Maier, M. A., Charisse, K., Sekine, M., Manoharan, M., Rajeev, K. G. Versatile site-specific conjugation of small molecules to siRNA using click chemistry // *J. Org. Chem.* – 2011. – Vol. 76. – N. 5. – P. 1198–1211.
225. Farzan, V. M., Ulashchik, E. A., Martynenko-Makaev, Y. V., Kvach, M. V., Aparin, I. O., Brylev, V. A., Prikazchikova, T. A., Maklakova, S. Y., Majouga, A. G., Ustinov, A. V., Shipulin, G. A., Shmanai, V. V., Korshun, V. A., Zatsepin, T. S. Automated Solid-Phase Click Synthesis of Oligonucleotide Conjugates: From Small Molecules to Diverse N - Acetylgalactosamine Clusters // *Bioconjug. Chem.* – 2017. – Vol. 28. – N. 10. – P. 2599–2607.

226. Tsai, C. S., Liu, P. Y., Yen, H. Y., Hsu, T. L., Wong, C. H. Development of trifunctional probes for glycoproteomic analysis // *Chem. Commun.* – 2010. – Vol. 46. – N. 30. – P. 5575–5577.
227. Haldón, E., Álvarez, E., Nicasio, M. C., Pérez, P. J. 1,2,3-Triazoles from carbonyl azides and alkynes: filling the gap // *Chem Commun.* – 2014. – Vol. 50. – N. 64. – P. 8978–8981.
228. Boyer, J. H., Canter, F. C. Alkyl and Aryl Azides // *Chem. Rev.* – 1954. – Vol. 54. – N. 1. – P. 1–57.
229. Sivaguru, P., Ning, Y., Bi, X. New Strategies for the Synthesis of Aliphatic Azides // *Chem. Rev.* – 2021. – Vol. 121. – N. 7. – P. 4253–4307.
230. Bräse, S., Gil, C., Knepper, K., Zimmermann, V. Organic Azides: An Exploding Diversity of a Unique Class of Compounds // *Angew. Chemie Int. Ed.* – 2005. – Vol. 44. – N. 33. – P. 5188–5240.
231. Bakulev, V. A., Shafran, Y. M., Beliaev, N. A., Beryozkina, T. V., Volkova, N. N., Joy, M. N., Fan, Z. Heterocyclic azides: advances in their chemistry // *Chem. Rev.* – 2022. – Vol. 91. – N. 7. – P. RCR5042.
232. Mitsunobu, O., Yamada, M., Mukaiyama, T. Preparation of Esters of Phosphoric Acid by the Reaction of Trivalent Phosphorus Compounds with Diethyl Azodicarboxylate in the Presence of Alcohols // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1967. – Vol. 40. – N. 4. – P. 935–939.
233. Hughes, D. L. The Mitsunobu Reaction // *Org. React. Publ. by John Wiley Sons, Inc Ed. Paquette L.A. al.* – 1992. – Vol. 42. – N. chapter 2. – P. 335–656.
234. Kitamura, M., Koga, T., Yano, M., Okauchi, T. Direct Synthesis of Organic Azides from Alcohols Using 2-Azido-1,3-dimethylimidazolinium Hexafluorophosphate. , . doi: // *Synlett.* – 2012. – Vol. 23. – N. 9. – P. 1335–1338.
235. Pandey, A. M., Mondal, S., Gnanaprakasam, B. Continuous-Flow Direct Azidation of Alcohols and Peroxides for the Synthesis of Quinoxalinone, Benzooxazinone, and Triazole Derivatives // *J. Org. Chem.* – 2022. – Vol. 87. – N. 15. – P. 9926–9939.
236. Yu, C., Liu, B., Hu, L. A Simple One-Pot Procedure for the Direct Conversion of Alcohols to Azides via Phosphate Activation. // *Org. Lett.* – 2000. – Vol. 2. – N. 13. – P. 1959–1961.
237. Barral, K., Moorhouse, A. D., Moses, J. E. Efficient conversion of aromatic amines into azides: a one-pot synthesis of triazole linkages. // *Org. Lett.* – 2007. – Vol. 9. – N. 9. – P. 1809–1811.
238. Cavender, C. J., Shiner, V. J., Jr. Trifluoromethanesulfonyl azide. Its reaction with alkyl amines to form alkyl azides. The Journal of Organic Chemistry // *J. Org. Chem.* – 1972. – Vol. 37. – N. 22. – P. 3567–3569.

239. Castro, V., Blanco-Canosa, J. B., Rodriguez, H., Albericio, F. Imidazole-1-sulfonyl azide-based diazo-transfer reaction for the preparation of azido solid supports for solid-phase synthesis // *ACS Comb Sci.* – 2013. – Vol. 15. – N. 7. – P. 331–334.
240. Pandiakumar, A. K., Sarma, S. P., Samuelson, A. G. Mechanistic studies on the diazo transfer reaction // *Tetrahedron Lett.* – 2014. – Vol. 55. – N. 18. – P. 2917–2920.
241. Meng, G., Guo, T., Ma, T., Zhang, J., Shen, Y., Sharpless, K. B., Dong, J. Modular click chemistry libraries for functional screens using a diazotizing reagent // *Nature.* – 2019. – Vol. 574. – P. 86–89.
242. Норман, А. Гексаметилфосфортриамид в органической химии // *Russ. Chem. Rev.* – 1970. – Vol. 39. – N. 6. – P. 457–484.
243. Wang, C.-G., Goto, A. Solvent-Selective Reactions of Alkyl Iodide with Sodium Azide for Radical Generation and Azide Substitution and Their Application to One-Pot Synthesis of Chain-End-Functionalized Polymers // *J. Am. Chem. Soc.* – 2017. – Vol. 139. – N. 30. – P. 10551–10560.
244. Liu, C., Wang, X., Li, Z., Cui, L., Li, C. Silver-catalyzed decarboxylative radical azidation of aliphatic carboxylic acids in aqueous solution // *J. Am. Chem. Soc.* – 2015. – Vol. 137. – N. 31. – P. 9820–9823.
245. Gerowska, M., Hall, L., Richardson, J., Shelbourne, M., Brown, T. Efficient reverse click labeling of azide oligonucleotides with multiple alkynyl Cy-Dyes applied to the synthesis of HyBeacon probes for genetic analysis // *Tetrahedron.* – 2012. – Vol. 68. – N. 3. – P. 857–864.
246. Santner, T., Hartl, M., Bister, K., Micura, R. Efficient access to 3'-terminal azide-modified RNA for inverse click-labeling patterns // *Bioconjug. Chem.* – 2014. – Vol. 25. – N. 1. – P. 188–195.
247. Krasheninina, O. A., Thaler, J., Erlacher, M. E., Micura, R. Amine-to-azide conversion on native RNA via metal-free diazo transfer opens new avenues for RNA manipulations // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2021. – Vol. 60. – N. 13. – P. 6970–6974.
248. Moreno, S., Ramos-Pittol, J. M., Hartl, M., Micura, R. Robust synthesis of 2'-azido modified RNA from 2'-amino precursors by diazotransfer reaction // *Org. Biomol. Chem.* – 2022. – Vol. 20. – N. 39. – P. 7845–7850.
249. Krell, K., Harijan, D., Ganz, D., Doll, L., Wagenknecht, H.-A. Postsynthetic modifications of DNA and RNA by means of copper-free cycloadditions as bioorthogonal reactions // *Bioconjug. Chem.* – 2020. – Vol. 31. – N. 4. – P. 990–1011.
250. Perrone, D., Marchesi, E., Preti, L., Navacchia, M. L. Modified Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids via Click Azide-Alkyne Cycloaddition for Pharmacological Applications //

- Molecules. – 2021. – Vol. 26. – N. 11. – P. 3100.
251. Meldal, M., Tornøe, C. W. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition // Chem. Rev. – 2008. – Vol. 108. – N. 8. – P. 2952–3015.
252. Lallana, E., Iguera, R., Fernandez-Megia, E. Reliable and Efficient Procedures for the Conjugation of Biomolecules through Huisgen Azide–Alkyne Cycloadditions // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2011. – Vol. 50. – N. 38. – P. 8794–8804.
253. Porte, K., Riberaud, M., Châtre, R., Audisio, D., Papot, S., Taran, F. Bioorthogonal Reactions in Animals // ChemBioChem. – 2021. – Vol. 22. – N. 1. – P. 100–113.
254. Agard, N. J., Prescher, J. A., Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems // J. Am. Chem. Soc. – 2004. – Vol. 126. – N. 46. – P. 15046–15047.
255. Warminski, M., Kowalska, J., Jemielity, J. Synthesis of RNA 5'-Azides from 2'- O - Pivaloyloxymethyl-Protected RNAs and Their Reactivity in Azide–Alkyne Cycloaddition Reactions // Org. Lett. – 2017. – Vol. 19. – N. 13. – P. 3624–3627.
256. Pourceau, G., Meyer, A., Chevolot, Y., Souteyrand, E., Vasseur, J. J., Morvan, F. Oligonucleotide Carbohydrate-Centered Galactosyl Cluster Conjugates Synthesized by Click and Phosphoramidite Chemistries // Bioconjug. Chem. – 2010. – Vol. 21. – N. 8. – P. 1520–1529.
257. Mukaiyama, T., Hashimoto, M. Phosphorylation by oxidation-reduction condensation: Preparation and reaction of S-(2-pyridyl) phosphorothioates // Tetrahedron Lett. – 1971. – Vol. 12. – N. 26. – P. 2425–2428.
258. Mukaiyama, T., Hashimoto, M. Synthesis of oligothymidylates and nucleoside cyclic phosphates by oxidation-reduction condensation // J. Am. Chem. Soc. – 1972. – Vol. 94. – N. 24. – P. 8528–8532.
259. Knorre, D. G., Buneva, V. N., Baram, G. I., Godovikova, T. S., Zarytova, V. F. Dynamic aspects of affinity labelling as revealed by alkylation and phosphorylation of pancreatic ribonuclease with reactive deoxyribodinucleotide derivatives // FEBS Lett. – 1986. – Vol. 194. – N. 1. – P. 64–68.
260. Амирханов, Н. В., Зарытова, В. Ф. Реакционноспособные производные фосфотиоатных аналогов олигонуклеотидов. I. Селективная активация концевых фосфатов и получение фосфамидных производных фосфотиоатных аналогов олигонуклеотидов // Биоорган. химия. – 1995. – Vol. 21. – N. 5. – P. 365–375.
261. Svinarchuk, F. P., Konevets, D. A., Pliasunova, O. A., Pokrovsky, A. . G., Vlasov, V. V. Inhibition of HIV proliferation in MT-4 cells by antisense oligonucleotide conjugated to lipophilic groups // Biochimie. – 1993. – Vol. 75. – N. 1–2. – P. 49–54.

262. Grimm, G. N., Boutorine, A. S., Helene, C. Rapid Routes of Synthesis of Oligonucleotide Conjugates from Non-Protected Oligonucleotides and Ligands Possessing Different Nucleophilic or Electrophilic Functional Groups // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. – 2000. – Vol. 19. – N. 10–12. – P. 1943–1965.
263. Novopashina, D. S., Totskaya, O. S., Kholodar', S. A., Meshchaninova, M. I., Ven'yaminova, A. G. Oligo(2'-O-methylribonucleotides) and their derivatives: III. 5'-Mono- and 5'-bispyrenyl derivatives of oligo(2'-O- methylribonucleotides) and their 3'-modified analogues: Synthesis and properties // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2008. – Vol. 34. – N. 5. – P. 602–612.
264. Krasheninina, O. A., Novopashina, D. S., Lomzov, A. A., Venyaminova, A. G. 2'-Bispyrene-Modified 2'- O -Methyl RNA Probes as Useful Tools for the Detection of RNA: Synthesis, Fluorescent Properties, and Duplex Stability // *ChemBioChem*. – 2014. – Vol. 15. – N. 13. – P. 1939–1946.
265. Jeong, J. H., Kim, S. W., Park, T. G. Novel Intracellular Delivery System of Antisense Oligonucleotide by Self-Assembled Hybrid Micelles Composed of DNA/PEG Conjugate and Cationic Fusogenic Peptide // *Bioconjug. Chem.* – 2003. – Vol. 14. – N. 2. – P. 473–479.
266. Wang, T.-P., Ko, N. C., Su, Y.-C., Wang, E.-C., Severance, S., Hwang, C.-C., Shih, Y. T., Wu, M. H., Chen, Y.-H. Advanced Aqueous-Phase Phosphoramidation Reactions for Effectively Synthesizing Peptide–Oligonucleotide Conjugates Trafficked into a Human Cell Line // *Bioconjug. Chem.* – 2012. – Vol. 23. – N. 12. – P. 2417–2433.
267. Atherton, F. R., Openshaw, H. T., Todd, A. R. 174. Studies on phosphorylation. Part II. The reaction of dialkyl phosphites with polyhalogen compounds in presence of bases. A new method for the phosphorylation of amines // *J. Chem. Soc.* – 1945. – N. 0. – P. 660–663.
268. Atherton, F. R., Todd, A. R. 129. Studies on phosphorylation. Part III. Further observations on the reaction of phosphites with polyhalogen compounds in presence of bases and its application to the phosphorylation of alcohols // *J. Chem. Soc.* – 1947. – N. 0. – P. 674–678.
269. Steinberg, G. M. Reactions of dialkyl phosphites. synthesis of dialkyl chlorophosphates, tetraalkyl pyrophosphates, and mixed orthophosphate esters // *J. Org. Chem.* – 1950. – Vol. 15. – N. 3. – P. 637–647.
270. Kong, A., Engel, R. A Mechanistic Investigation of the Todd Reaction // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1985. – Vol. 58. – N. 12. – P. 3671–3672.
271. Krutikov, V. I., Erkin, A. V., Krutikova, V. V. Krutikov, V. I.; Erkin, A. V.; Krutikova, V. V. *Russ. J. Gen. Chem.*.. doi: // *Russ. J. Gen. Chem.* – 2012. – Vol. 82. – N. 5. – P. 822–826.
272. Szardenings, A. K., Ordeev, M. F., Patel, D. V. A general and convenient synthesis of novel phosphotyrosine // *Tetrahedron Lett.* – 1996. – Vol. 37. – N. 21. – P. 3635–3638.

273. Mielniczak, G., Bopusiński, A. Iodoform, a New Reagent in the Todd-Atherton Reaction // *Synth. Commun.* – 2003. – Vol. 33. – N. 22. – P. 3851–3859.
274. Le Corre, S. S., Berchel, M., Couthon-Gourvès, H., Haelters, J.-P., Jaffrès, P.-A. Atherton–Todd reaction: mechanism, scope and applications // *Beilstein J. Org. Chem.* – 2014. – Vol. 10. – P. 1166–1196.
275. Vlaho, D., Fakhoury, J. F., Damha, M. J. Structural Studies and Gene Silencing Activity of siRNAs Containing Cationic Phosphoramidate Linkages // *Nucleic Acid Ther.* – 2018. – Vol. 28. – N. 1. – P. 34–43.
276. Gołębiewska, J., Rachwalak, M., Jakubowski, T., Romanowska, J., Stawinski, J. Reaction of Boranephosphonate Diesters with Amines in the Presence of Iodine: The Case for the Intermediacy of H-Phosphonate Derivatives // *J. Org. Chem.* – 2018. – Vol. 83. – N. 10. – P. 5496–5505.
277. Cooke, L. A., Frauendorf, C., Gilea, M. A., Holmes, S. C., Vyle, J. S. Solid-phase synthesis of terminal oligonucleotide–phosphoramidate conjugates // *Tetrahedron Lett.* – 2006. – Vol. 47. – N. 5. – P. 719–722.
278. Kostov, O., Liboska, R., Páv, O., Novák, P., Rosenberg, I. Solid-Phase Synthesis of Phosphorothioate/Phosphonothioate and Phosphoramidate/Phosphonamidate Oligonucleotides // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24. – N. 10. – P. 1872.
279. Nekrasov, M. D., Pyshnyi, D. V., Kupryushkin, M. S. Application of Iodine-Amine Oxidation Approach in the Synthesis of Various N-Alkyl Phosphoramidate Oligonucleotide Derivatives // *Med. Chem.* – 2025. – Vol. 21. – N. 3. – P. 229–238.
280. Staudinger, H., Meyer, J. Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylderivate und Phosphinimine // *Helv. Chim. Acta.* – 1919. – Vol. 2. – N. 1. – P. 635–646.
281. Saxon, E., Bertozzi, C. R. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction // *Science (80-. ).* – 2000. – Vol. 287. – N. 5460. – P. 2007–2010.
282. Köhn, M., Breinbauer, R. The Staudinger Ligation—A Gift to Chemical Biology // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2004. – Vol. 43. – N. 24. – P. 3106–3116.
283. van Berkel, S. S., van Eldijk, M. B., van Hest, J. C. Staudinger Ligation as a Method for Bioconjugation // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2011. – Vol. 50. – N. 38. – P. 8806–8827.
284. Nielsen, J., Caruthers, M. H. Directed Arbuzov-type reactions of 2-cyano-1,1-dimethylethyl deoxynucleoside phosphites // *J. Am. Chem. Soc.* – 1988. – Vol. 110. – N. 18. – P. 6275–6276.
285. Kupryushkin, M. S., Apukhtina, V. S., Vasilyeva, S. V., Pyshnyi, D. V., Stetsenko, D. A. A new simple and convenient method for preparation of oligonucleotides containing a pyrene or a

- cholesterol moiety // *Russ. Chem. Bull.* – 2015. – Vol. 64. – N. 7. – P. 1678–1681.
286. Shioiri, T., Inomiya, K., Yamada, S. New convenient reagent for a modified Curtius reaction and for peptide synthesis // *J. Am. Chem. Soc.* – 1972. – Vol. 94. – N. 17. – P. 6203–6205.
287. Babu, V. V. S., Ananda, K., Vasanthakumar, G.-R. (Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl (Fmoc) amino acid azides: synthesis, isolation, characterisation, stability and application to synthesis of peptides // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* – 2000. – N. 24. – P. 4328–4331.
288. Kim, J.-G., Jang, D. O. Direct synthesis of acyl azides from carboxylic acids by the combination of trichloroacetonitrile, triphenylphosphine and sodium azide // *Synlett.* – 2008. – N. 13. – P. 2072–2074.
289. Katritzky, A. R., Widyan, K., Kirichenko, K. Preparation of polyfunctional acyl azides // *J. Org. Chem.* – 2007. – Vol. 72. – N. 15. – P. 5802–5804.
290. Pozsgay, V., Jennings, H. J. Azide synthesis with stable nitrosyl salts // *Tetrahedron Lett.* – 1987. – Vol. 28. – N. 43. – P. 5091–5092.
291. Kim, Y. H., Kim, K., Shim, S. B. Facile synthesis of azides: conversion of hydrazines using dinitrogen tetroxide // *Tetrahedron Lett.* – 1986. – Vol. 27. – N. 39. – P. 4749–4752.
292. Matsuya, Y., Itoh, T., Nagata, K., Ohsawa, A. A mild dehydrazination reaction of arylhydrazines using nitric oxide in the presence of oxygen // *Tetrahedron.* – 1997. – Vol. 53. – N. 46. – P. 15701–15710.
293. Bose, D. S., Reddy, A. V. N. Iodine(V) reagents in organic synthesis. Dess–Martin periodinane mediated efficient one-pot oxidation of aldehydes to acyl azides // *Tetrahedron Lett.* – 2003. – Vol. 44. – N. 17. – P. 3543–3545.
294. Derzhalova, A., Markov, O., Fokina, A., Shiohama, Y., Zatsepin, T., Fujii, M., Zenkova, M., Stetsenko, D. Novel Lipid-Oligonucleotide Conjugates Containing Long-Chain Sulfonyl Phosphoramidate Groups: Synthesis and Biological Properties // *Appl. Sci.* – 2021. – Vol. 11. – N. 3. – P. 1174.
295. Klabenkova, K. V., Zhdanova, P. V., Burakova, E. A., Bizyaev, S. N., Fokina, A. A., Stetsenko, D. A. A Convenient Oligonucleotide Conjugation via Tandem Staudinger Reaction and Amide Bond Formation at the Internucleotidic Phosphate Position // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – Vol. 25. – N. 4. – P. 2007.
296. Klabenkova, K., Zakhryamina, A., Burakova, E., Bizyaev, S., Fokina, A., Stetsenko, D. Synthesis of New Polyfluoro Oligonucleotides via Staudinger Reaction // *Int. J. Mol. Sci.* – 2025. – Vol. 26. – N. 1. – P. 300.
297. Kupryushkin, M. S., Zharkov, T. D., Ilina, E. S., Markov, O. V., Kochetkova, A. S.,

- 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. Bioorg. Chem.* – 2021. – Vol. 47. – N. 3. – P. 719–733.
298. Burakova, E. A., Derzhalova, A. S., Chelobanov, B. P., Fokina, A. A., Stetsenko, D. A. New Oligodeoxynucleotide Derivatives Containing N-(Sulfonyl)-Phosphoramidate Groups // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2019. – Vol. 45. – N. 6. – P. 662–668.
299. Zharkov, T. D., Kupryushkin, M. S. General Approach for the Synthesis of Triazinyl Phosphoramidate Oligonucleotides via the Staudinger Reaction with the Use of 2-Azido-4,6-dichloro-1,3,5-triazine // *ACS Omega*. – 2025. – Vol. 10. – N. 39. – P. 45906–45920.
300. Novgorodceva, A. I., Vorob'ev, A. Y., Lomzov, A. A., Vasilyeva, S. V. Synthesis and Physicochemical Properties of New Phosphoramidate Oligodeoxyribonucleotides. I. N-Caffeine Derivatives // *Bioorg. Chem.* – 2025. – Vol. 157. – P. 108313.
301. Stetsenko, D. A. Mesyl Phosphoramidate Oligonucleotides: A New Promising Type of Antisense Agents // B. Sugimoto, N. Handb. Chem. Biol. Nucleic Acids. Springer, Singapore. – 2023. – P. 543–583.
302. Sergeeva, O., Akhmetova, E., Dukova, S., Beloglazkina, E., Uspenskaya, A., Machulkin, A., Stetsenko, D., Zatsepin, T. Structure-activity relationship study of mesyl and busyl phosphoramidate antisense oligonucleotides for unaided and PSMA-mediated uptake into prostate cancer cells // *Front. Chem.* – 2024. – Vol. 12. – P. 1342178.
303. Patrushev, D. E., Burakova, E. A., Bizyaev, S. N., Fokina, A. A., Stetsenko, D. A. New Zwitter-Ionic Oligonucleotides: Preparation and Complementary Binding // *Mol. Biol.* – 2023. – Vol. 57. – N. 2. – P. 320–328.
304. Malova, E. A., Pyshnaya, I. A., Meschaninova, M. I., Pyshnyi, D. V. Adaptation of the Protocol of the Automated Solid-Phase Phosphoramidite Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides for Preparing Their N-Unsubstituted Phosphoramidate Analogs (P-NH<sub>2</sub>) // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2024. – Vol. 50. – N. 6. – P. 2455–2472.
305. 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.
306. Zhukov, S., Pyshnyi, D., Kupryushkin, M. Synthesis of novel representatives of phosphoryl guanidine oligonucleotides // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2021. – Vol. 47. – N. 2. – P. 380–389.
307. Anderson, B. A., Freestone, G. C., Low, A., De-Hoyos, C. L., Iii, W. J. D., Østergaard, M. E., Migawa, M. T., Fazio, M., Wan, W. B., Berdeja, A., Scandalis, E., Burel, S. A., Vickers, T. A., Crooke, S. T., Swayze, E. E., Liang, X., Seth, P. P. Towards next generation antisense oligonucleotides: mesylphosphoramidate modification improves therapeutic index and duration

- of effect of gapmer antisense oligonucleotides // *Nucleic Acids Res.* – 2021. – Vol. 49. – N. 16. – P. 9026–9041.
308. Vasilyeva, S. V., Baranovskaya, E. E., Dyudeeva, E., 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.
309. Golyshev, V. M., Yushin, I. I., Gulyaeva, O. A., Baranovskaya, E. E., Lomzov, A. A. Properties of phosphoramidate benzoazole oligonucleotides (PABAOs). I. Structure and hybridization efficiency of N-benzimidazole derivatives // *Biochem. Biophys. Res. Com.* – 2024. – Vol. 693. – P. 149390.
310. Yushin, I. I., Golyshev, V. M., Novgorodceva, A. I., Lomzov, A. A. Properties of phosphoramidate benzoazole oligonucleotides (PABAOs). II. Structure and hybridization efficiency of N-benzoxazole derivatives // *Biochem. Biophys. Res. Com.* – 2024. – Vol. 740. – P. 150997.
311. Chubarov, A. S., Baranovskaya, E. E., Ocorbin, I. P., Yushin, I. I., Filipenko, M. L., Pyshnyi, D. V., Vasilyeva, S. V., Lomzov, A. A. Phosphoramidate Azole Oligonucleotides for Single Nucleotide Polymorphism Detection by PCR // *Int. J. Mol. Sci.* – 2024. – Vol. 25. – N. 1. – P. 617.
312. Hammond, S. M., Sergeeva, O. V., Melnikov, P. A., Goli, L., Stoodley, J., Zatsepin, T. S., Stetsenko, D. A., Wood, M. J. A. Mesyl Phosphoramidate Oligonucleotides as Potential Splice-Switching Agents: Impact of Backbone Structure on Activity and Intracellular Localization // *Nucleic Acid Ther.* – 2021. – Vol. 31. – N. 3. – P. 190–200.
313. Schiff, H. Mittheilungen aus dem Universitätslaboratorium in Pisa: Eine neue Reihe organischer Basen // *Ann. Der Chemie Und Pharm.* – 1864. – Vol. 131. – N. 1. – P. 118–119.
314. Tidwell, T. T. Hugo (Ugo) Schiff, Schiff Bases, and a Century of  $\beta$ -Lactam Synthesis // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2008. – Vol. 47. – N. 6. – P. 1016–1020.
315. Kratz, F., Beyer, U., Schutte, M. T. Drug-Polymer Conjugates Containing Acid-Cleavable Bonds // *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* – 1999. – Vol. 16. – N. 3. – P. 245–288.
316. Pang, X., Jiang, Y., Xiao, Q., Leung, A. W., Hua, H., Xu, C. pH-responsive polymer-drug conjugates: Design and progress // *J. Control. Release.* – 2016. – Vol. 22. – P. 116–129.
317. Ermolinskiĭ, B. S., Mikhaïlov, S. N. [Periodate oxidation in chemistry of nucleic acid. Dialdehyde derivatives of nucleosides, nucleotides, and oligonucleotides]. Review. Russian // *Bioorg Khim.* – 2000. – Vol. 26. – N. 7. – P. 483–504.
318. Wang, R., Lu, D., Bai, H., Jin, C., Yan, G., Ye, M., Qiu, L., Chang, R., Cui, C., Liang, H., Tan, W. Using modified aptamers for site specific protein-aptamer conjugations // *Chem. Sci.* –

2016. – Vol. 7. – N. 3. – P. 2157–2161.

319. Kozlov, I. A., Melnyk, P. C., Stromborg, K. E., Chee, M. S., Barker, D. L., Zhao, C. Efficient strategies for the conjugation of oligonucleotides to antibodies enabling highly sensitive protein detection // *Biopolymers*. – 2004. – Vol. 73. – N. 5. – P. 621–630.

320. Kachalova, A. V., Zubin, E. M., Oretskaya, T. S. Methods for the synthesis of oligonucleotides containing reactive electrophilic groups // *Russ. Chem. Rev.* – 2002. – Vol. 71. – N. 12. – P. 1041–1059.

321. Kachalova, A. V., Zatsepin, T. S., Romanova, E. A., Stetsenko, D. A., Gait, M. J., Oretskaya, T. S. Synthesis of modified nucleotide building blocks containing electrophilic groups in the 2'-position // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. – 2000. – Vol. 19. – N. 10–12. – P. 1693–1707.

322. Zatsepin, T. S., Stetsenko, D. A., Arzumanov, A. A., Romanova, E. A., Gait, M. J., Oretskaya, T. S. Synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates with single and multiple peptides attached to 2'-aldehydes through thiazolidine, oxime, and hydrazine linkages // *Bioconjug. Chem.* – 2002. – Vol. 13. – N. 4. – P. 822–830.

323. Zatsepin, T. S., Gait, M. J., Oretskaya, T. S., Stetsenko, D. A. Synthesis of DNA conjugates by solid-phase fragment condensation via aldehyde–nucleophile coupling // *Tetrahedron Lett.* – 2005. – Vol. 46. – N. 18. – P. 3191–3195.

324. Zatsepin, T. S., Ivanova, Y. M., Stetsenko, D. A., Gait, M. J., Oretskaya, T. S. Efficient conjugation and preferential DNA binding of oligonucleotides containing 2'-O-(2-oxoethyl)arabinouridine // *Tetrahedron Lett.* – 2004. – Vol. 45. – N. 39. – P. 7327–7330.

325. Zubin, E. M., Stetsenko, D. A., Zatsepin, T. S., Gait, M. J., Oretskaya, T. S. Oligonucleotides containing 2'-O-[2-(2,3-dihydroxypropyl) amino-2-oxoethyl]uridine as suitable precursors of 2'-aldehyde oligonucleotides for chemoselective ligation // *Bioorg. Med. Chem.* – 2005. – Vol. 13. – N. 16. – P. 4912–4920.

326. Khomyakova, E. V., Zubin, E. M., Smirnov, I. P., Pozmogova, G. E., Stetsenko, D. A., Oretskaya, T. S. DNA or RNA oligonucleotide 2'-hydrazides for chemoselective click-type ligation with carbonyl compounds // *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids*. – 2011. – Vol. 30. – N. 7–8. – P. 577–584.

327. Zatsepin, T. S., Stetsenko, D. A., Gait, M. J., Oretskaya, T. S. 2'-Hydrazine oligonucleotides: Synthesis and efficient conjugation with aldehydes // *Nucleic Acids Symp. Ser.* – 2005. – N. 49. – P. 133–134.

328. Zatsepin, T. S., Oretskaya, T. S., Gait, M. J., Stetsenko, D. A. Preparation of 2'-hydrazino oligonucleotides and their reaction with aldehydes and 1,3-diketones // *Nucleosides. Nucleotides*

- Nucleic Acids. – 2007. – Vol. 26. – N. 6–7. – P. 795–798.
329. Zatsepin, T. S., Gait, M. J., Oretskaya, T. S., Stetsenko, D. A. Synthesis of 2'-hydrazine oligonucleotides and their efficient conjugation with aldehydes and 1,3-diketones // *Tetrahedron Lett.* – 2006. – Vol. 47. – N. 31. – P. 5515–5518.
330. Zubin, E. M., Stetsenko, D. A., Oretskaya, T. S., Gait, M. J. 1,2-Diol and Hydrazide Phosphoramidites for Solid-Phase Synthesis and Chemoselective Ligation of 2'-Modified Oligonucleotides // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* – 2003. – Vol. 22. – N. 5–8. – P. 1375–1378.
331. Bourtoune, A. S., Brault, D., Takasugi, M., Delgado, O., Hélène, C. Chlorin-Oligonucleotide Conjugates: Synthesis, Properties, and Red Light-Induced Photochemical Sequence-Specific DNA Cleavage in Duplexes and Triplexes // *J. Am. Chem. Soc.* – 1996. – Vol. 118. – N. 40. – P. 9469–9476.
332. Ghosh, S. S., Kao, P. M., Kwok, D. Y. Synthesis of 5'-oligonucleotide hydrazide derivatives and their use in preparation of enzyme-nucleic acid hybridization probes // *Anal. Biochem.* – 1989. – Vol. 178. – N. 1. – P. 43–51.
333. Gritsenko, O. M., Gromova, E. S. Dialdehyde-containing nucleic acids and their components: synthesis, properties and affinity modification of proteins // *Russ. Chem. Rev.* – 1999. – Vol. 68. – N. 3. – P. 241–251.
334. Antsyrovich, S. I., Oretskaya, T. S. Double-stranded cross-linked nucleic acids. Synthesis and applications in the molecular biology // *Russ. Chem. Rev.* – 1998. – Vol. 67. – N. 3. – P. 245–262.
335. Antsyrovich, S. I., Oretskaya, T. S., Kiesrowski, G. New phosphoramidite derivatives for the preparation of oligonucleotides containing a hydrazide group in any specified position of the oligonucleotide chain // *Russ. Chem. Bull.* – 2005. – N. 11. – P. 2671–2681.
336. Achilles, K., Kiedrowski, G. V. Kinetic model studies on the chemical ligation of oligonucleotides via hydrazone formation // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2005. – Vol. 15. – N. 4. – P. 1229–1233.
337. Raddatz, S., Mueller-Ibeler, J., Kluge, J., Wäß, L., Burdinski, G., Havens, J. R., Onofrey, T. J., Wang, D., Schweitzer, M. Hydrazide oligonucleotides: new chemical modification for chip array attachment and conjugation // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30. – N. 21. – P. 4793–4802.
338. Antsyrovich, S. I., von Kiedrowski, G. A novel versatile phosphoramidite building block for the synthesis of 5'- and 3'-hydrazide modified oligonucleotides // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* – 2005. – Vol. 24. – N. 3. – P. 211–226.

339. Pon, R. T., Yu, S. Tandem oligonucleotide synthesis using linker phosphoramidites // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – Vol. 33. – N. 6. – P. 1940–1948.
340. Saraya, J. S., Horton, N. G., Sammons, S. R., O Flaherty, D. K. A Robust Strategy for Introducing Amino-Modifiers in Nucleic Acids: Enabling Novel AminoTandem Oligonucleotide Synthesis in DNA and RNA // *Chem. Eur. J.* – 2025. – Vol. 31. – N. 26. – P. e202500448.
341. Rosenmund, K. W. Über eine neue Methode zur Darstellung von Aldehyden. 1. Mitteilung // *Chem. Berichte (in Ger.)* – 1918. – Vol. 51. – N. 1. – P. 585–593.
342. Rosenmund, K. W. Das am Ring-Kohlenstoff gebundene Halogen und sein Ersatz durch andere Substituenten, III. Mitteilung: Die Darstellung von Arsin- und Sulfonsäuren // *Berichte Der Dtsch. Chem. Gesellschaft (A B Ser.)* – 1921. – Vol. 54. – N. 3. – P. 438–440.
343. Galatsis, P., Sollogoub, M., Sinaÿ, P. Diisobutylaluminum Hydride // *e-EROS Encycl. Reagents Org. Synth.* – 2008. – P. 1.
344. Poos, G. I., Arth, G. E., Beyler, R. E., Sarett, L. H. Approaches to the Total Synthesis of Adrenal Steroids. 1V. 4b-Methyl-7- ethylenedioxy-1,2,3,4,4 $\alpha$ ,4b,5,6,7,8,10,10a  $\beta$ -dodecahydrophenanthrene-4  $\beta$ -ol-1-one and Related Tricyclic Derivatives // *J. Am. Chem. Soc.* – 1953. – Vol. 75. – N. 2. – P. 422–429.
345. Collins, J. C., Hess, W. W., Frank, F. J. Dipyrindine-chromium(VI) oxide oxidation of alcohols in dichloromethane // *Tetrahedron Lett.* – 1968. – Vol. 9. – N. 30. – P. 3363–3366.
346. Corey, E. J., Suggs, J. W. Pyridinium Chlorochromate. An Efficient Reagent for Oxidation of Primary and Secondary Alcohols to Carbonyl Compounds // *Tetrahedron Lett.* – 1975. – Vol. 16. – N. 31. – P. 2647–2650.
347. Omura, K., Swern, D. Oxidation of alcohols by “activated” dimethyl sulfoxide. A preparative, steric and mechanistic study // *Tetrahedron.* – 1978. – Vol. 34. – N. 11. – P. 1651–1660.
348. Mancuso, A. J., Huang, S.-L., Swern, D. Oxidation of long-chain and related alcohols to carbonyls by dimethyl sulfoxide “activated” by oxalyl chloride // *J. Org. Chem.* – 1978. – Vol. 43. – N. 12. – P. 2480–2482.
349. Barriga, S. 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl (TEMPO) // *SynLett.* – 2001. – Vol. 2001. – N. 4. – P. 0563.
350. Reymond, J. L., Koch, T., Schröer, J., Tierney, E. A general assay for antibody catalysis using acridone as a fluorescent tag // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1996. – Vol. 93. – N. 9. – P. 4251–4256.
351. Fröhlichová, Z., Tomaščíková, J., Imrich, I., Kristian, P., Danihel, I., Böhm, S., Sabolová, D., Kožurková, M., Klika, K. D. Synthesis and properties of novel biologically interesting

- polycyclic 1,3,4-oxadiazoles containing acridine/acridone moieties // *Heterocycles*. – 2009. – Vol. 77. – N. 2. – P. 1019–1035.
352. Williamson, A. Theory of Etherification // *Philos. Mag.* – 1850. – Vol. 37. – N. 251. – P. 350–356.
353. Posner, T. Beiträge zur Kenntniss der ungesättigten Verbindungen. II. Ueber die Addition von Mercaptanen an ungesättigte Kohlenwasserstoffe // *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft*. – 1905. – Vol. 38. – N. 1. – P. 646–657.
354. Wetlaufer, D. B., Saxena, V. P. Formation of three-dimensional structure in proteins. I. Rapid nonenzymic reactivation of reduced lysozyme // *Biochemistry*. – 1970. – Vol. 9. – N. 25. – P. 5015–5023.
355. Lipmann, F., Kaplan, N. O. A common factor in the enzymatic acetylation of sulfanilamide and of choline. // *J. Biol. Chem.* – 1946. – Vol. 162. – N. 3. – P. 743–744.
356. Baddiley, J., Thain, E. M., Novelli, G. D., Lipmann, F. Structure of coenzyme A // *Nature*. – 1953. – Vol. 171. – N. 4341. – P. 76.
357. Ichihara, A. Retro-Diels-Alder Strategy in Natural Product Synthesis // *Synthesis (Stuttg)*. – 1987. – Vol. 1987. – N. 3. – P. 207–222.
358. Zhu, T., Tung, C. H., Breslauer, K. J., Dickerhof, W. A., Stein, S. Preparation and physical properties of conjugates of oligodeoxynucleotides with poly(delta)ornithine peptides // *Antisense Res. Dev.* – 1993. – Vol. 3. – N. 4. – P. 349–356.
359. Arar, K., Aubertin, A. M., Roche, A. C., Monsigny, M., Mayer, R. Synthesis and antiviral activity of peptide-oligonucleotide conjugates prepared by using N alpha-(bromoacetyl)peptides // *Bioconjug Chem.* – 1995. – Vol. 6. – N. 5. – P. 573–577.
360. Putta, M. R., Zhu, F. G., Wang, D., Bhagat, L., Dai, M., Kandimalla, E. R., Agrawal, S. Peptide conjugation at the 5'-end of oligodeoxynucleotides abrogates toll-like receptor 9-mediated immune stimulatory activity // *Bioconjug Chem.* – 2010. – Vol. 21. – N. 1. – P. 39–45.
361. McLoughlin, N. M., Kuepper, A., Neubacher, S., Grossmann, T. N. Synergistic DNA- and Protein-Based Recognition Promote an RNA-Templated Bio-orthogonal Reaction // *Chem. - A Eur. J.* – 2021. – Vol. 27. – N. 40. – P. 10477–10483.
362. Chaloin, L., Vidal, P., Lory, P., Méry, J., Lautredou, N., Divita, G., Heitz, F. Design of Carrier Peptide-Oligonucleotide Conjugates with Rapid Membrane Translocation and Nuclear Localization Properties // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – Vol. 243. – N. 2. – P. 601–608.
363. Tennilä, T., Antopolsky, M., Azhayev, A., Azhayeva, E. Peptide-oligonucleotide conjugates form stable and selective complexes with antibody and DNA. // *Bioconjug. Chem.* – 2008. –

Vol. 19. – N. 7. – P. 1361–1367.

364. Dovydenko, I., Tarassov, I., Venyaminova, A., Entelis, N. Method of carrier-free delivery of therapeutic RNA importable into human mitochondria: Lipophilic conjugates with cleavable bonds // *Biomaterials*. – 2016. – Vol. 76. – P. 408–417.

365. Kupihár, Z., Ferenc, G., Petrovicz, V. L., Fáy, V. R., Kovács, L., Martinek, T. A. Improved Metal-Free Approach for the Synthesis of Protected Thiol Containing Thymidine Nucleoside Phosphoramidite and Its Application for the Synthesis of Ligatable Oligonucleotide Conjugates // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15. – N. 1. – P. 248.

366. Dirin, M., Urban, E., Noe, C. R., Winkler, J. Fragment-based solid-phase assembly of oligonucleotide conjugates with peptide and polyethylene glycol ligands // *Eur. J. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 121. – P. 132–142.

367. Sánchez, A., Pedroso, E., Grandas, A. Conjugation Reactions Involving Maleimides and Phosphorothioate Oligonucleotides // *Bioconjug. Chem.* – 2012. – Vol. 23. – N. 2. – P. 300–307.

368. Raouane, M., Desmaele, D., Gilbert-Sirieix, M., Gueutin, C., Zouhiri, F., Bourgaux, C., Lepeltier, E., Gref, R., Ben Salah, R., Clayman, G., Massaad-Massade, L., Couvreur, P. Synthesis, Characterization, and in Vivo Delivery of siRNA-Squalene Nanoparticles Targeting Fusion Oncogene in Papillary Thyroid Carcinoma // *J. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 54. – N. 12. – P. 4067–4076.

369. Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I., Kent, S. B. H. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation // *Science (80-)*. – 1994. – Vol. 266. – N. 5186. – P. 776–779.

370. Stetsenko, D. A., Gait, M. J. Efficient conjugation of peptides to oligonucleotides by “native ligation”. // *J. Org. Chem.* – 2000. – Vol. 65. – N. 16. – P. 4900–4908.

371. Diezmann, F., Eberhard, H., Seitz, O. Native chemical ligation in the synthesis of internally modified oligonucleotide-peptide conjugates // *Biopolymers*. – 2010. – Vol. 94. – N. 4. – P. 397–404.

372. Geiermann, A.-S., Polacek, N., Micura, R. Native Chemical Ligation of Hydrolysis-Resistant 3'-Peptidyl-tRNA Mimics // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – Vol. 133. – N. 47. – P. 19068–19071.

373. Dastpeyman, M., Karas, J. A., Amin, A., Turner, B. J., Shabanpoor, F. Modular Synthesis of Trifunctional Peptide-oligonucleotide Conjugates via Native Chemical Ligation // *Front. Chem.* – 2021. – Vol. 9. – P. 627329.

374. Masaki, Y., Maruyama, A., Yoshida, K., Tomori, T., Kishimura, T., Seio, K. Oligodeoxynucleotides Modified with 2'-O-(Cysteinylaminobutyl)carbamoyl ethylribothymidine Residues for Native Chemical Ligation with Peptide at Internal Positions // *Bioconjug. Chem.* –

2022. – Vol. 33. – N. 2. – P. 272–278.

375. Polikanov, Y. S., Etheve-Quelquejeu, M., Micura, R. Synthesis of Peptidyl-tRNA Mimics for Structural Biology Applications // *Acc. Chem. Res.* – 2023. – Vol. 56. – N. 19. – P. 2713–2725.

376. Engelhardt, D., Nordberg, P., Knerr, L., Malins, L. R. Accessing Therapeutically-Relevant Multifunctional Antisense Oligonucleotide Conjugates Using Native Chemical Ligation // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2021. – Vol. 63. – N. 49. – P. e202409440.

377. Koval', I. V. The chemistry of disulfides // *Russ. Chem. Rev.* – 1994. – Vol. 63. – N. 9. – P. 735–750.

378. Zubin, E. M., Romanova, E. A., Oretskaya, T. S. Modern methods for the synthesis of peptide - oligonucleotide conjugates // *Russ. Chem. Rev.* – 2002. – Vol. 71. – N. 3. – P. 239–264.

379. Baldwin, A. D., Kiick, K. L. Tunable Degradation of Maleimide-Thiol Adducts in Reducing Environments // *Bioconjug. Chem.* – 2011. – Vol. 22. – N. 10. – P. 1946–1953.

380. Paris, C., Brun, O., Pedroso, E., Grandas, A. Exploiting Protected Maleimides to Modify Oligonucleotides, Peptides and Peptide Nucleic Acids // *Molecules.* – 2015. – Vol. 20. – N. 4. – P. 6389–6408.

381. Dirin, M., Urban, E., Lachmann, B., Noe, C. R., Winkler, J. Concise postsynthetic preparation of oligonucleotide-oligopeptide conjugates through facile disulfide bond formation. // *Futur. Med. Chem.* – 2015. – Vol. 7. – N. 13. – P. 1657–1673.

382. Wu, H., LeValley, P. J., Luo, T., Kloxin, A. M., Kiick, K. L. Manipulation of Glutathione-Mediated Degradation of Thiol–Maleimide Conjugates // *Bioconjug. Chem.* – 2018. – Vol. 29. – N. 11. – P. 3595–3605.

383. RenaultJean, K., Fredy, W., Renard, P., Sabot, C. Covalent Modification of Biomolecules through Maleimide-Based Labeling Strategies // *Bioconjug. Chem.* – 2018. – Vol. 29. – N. 8. – P. 2497–2513.

384. Niño-Ramírez, V. A., Insuasty-Cepeda, D. S., Rivera-Monroy, Z. J., Maldonado, M. Evidence of Isomerization in the Michael-Type Thiol-Maleimide Addition: Click Reaction between L-Cysteine and 6-Maleimidehexanoic Acid. // *Molecules.* – 2022. – Vol. 27. – N. 16. – P. 5064.

385. Klabenkova, K., Fokina, A., Stetsenko, D. Chemistry of Peptide-Oligonucleotide Conjugates: A Review // *Molecules.* – 2021. – Vol. 26. – N. 17. – P. 5420.

386. Cassar, L. Synthesis of aryl- and vinyl-substituted acetylene derivatives by the use of nickel and palladium complexes // *J. Organomet. Chem.* – 1975. – Vol. 93. – N. 2. – P. 253–257.

387. Dieck, H. A., Heck, R. F. Palladium catalyzed synthesis of aryl, heterocyclic and vinylic acetylene derivatives // *J. Organomet. Chem.* – 1975. – Vol. 93. – N. 2. – P. 259–263.
388. Sonogashira, K., Tohda, Y., Hagihara, N. A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines // *Tetrahedron Lett.* – 1975. – Vol. 16. – N. 50. – P. 4467–4470.
389. Miyaura, N., Yamada, K., Suzuki, A. A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides // *Tetrahedron Lett.* – 1979. – Vol. 20. – N. 36. – P. 3437–3440.
390. Repkova, M. N., Ivanova, T. M., Meshchaninova, M. I., Ven'yaminova, A. G. The H-phosphonate synthesis of oligoribonucleotides containing modified bases // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 1998. – Vol. 24. – N. 6. – P. 413–415.
391. Repkova, M. N., Ivanova, T. M., Komarova, N. I., Meshchaninova, M. I., Kuznetsova, M. A., Ven'yaminova, A. G. H-phosphonate synthesis of oligoribonucleotides containing modified bases. I. Photoactivatable derivatives of oligoribonucleotides with perfluoroarylazide groups in heterocyclic bases // *Bioorganicheskaya Khimiya.* – 2001. – Vol. 25. – N. 9. – P. 690–701.
392. Repkova, M., Meschaninova, M., Pyshnyi, D., Ven'yaminova, A. Oligoribonucleotides with functionalized nucleobases as new modifiers of biopolymers // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* – 2003. – Vol. 22. – N. 5–8. – P. 1509–1512.
393. Demeshkina, N. A., Laletina, E. S., Meschaninova, M. I., Repkova, M. N., Ven'yaminova, A. G., Graifer, D. M., Karpova, G. G. The mRNA Codon Environment at the P and E Sites of Human Ribosomes Deduced from Photocrosslinking with pUUUGUU Derivatives // *Mol. Biol.* – 2003. – Vol. 37. – N. 1. – P. 132–139.
394. Demeshkina, N., Laletina, E., Meschaninova, M., Ven'yaminova, A., Graifer, D., Karpova, G. Positioning of mRNA codons with respect to 18S rRNA at the P and E sites of human ribosome // *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* – 2003. – Vol. 1627. – N. 1. – P. 39–46.
395. Sharifulin, D., Khairulina, Y., Ivanov, A., Meschaninova, M., Ven'yaminova, A., Graifer, D., Karpova, G. A central fragment of ribosomal protein S26 containing the eukaryote-specific motif YxxPKxYxK is a key component of the ribosomal binding site of mRNA region 5' of the e site codon // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Vol. 40. – N. 7. – P. 3056–3065.
396. Babaylova, E. S., Ivanov, A. V., Malygin, A. A., Vorobjeva, M. A., Ven'yaminova, A. G., Polienko, Y. F., Kirilyuk, I. A., Krumkacheva, O. A., Fedin, M. V., Karpova, G. G., Bagryanskaya, E. G. A versatile approach for site-directed spin labeling and structural EPR studies of RNAs // *Org. Biomol. Chem.* – 2014. – Vol. 12. – N. 19. – P. 3129–3136.

397. Malygin, A. A., Graifer, D. M., Meschaninova, M. I., Venyaminova, A. G., Krumkacheva, O. A., Fedin, M. V., Karpova, G. G., Bagryanskaya, E. G. Doubly Spin-Labeled RNA as an EPR Reporter for Studying Multicomponent Supramolecular Assemblies // *Biophys. J.* – 2015. – Vol. 109. – N. 12. – P. 2637–2643.
398. Malygin, A. A., Graifer, D. M., Meschaninova, M. I., Venyaminova, A. G., Timofeev, I. O., Kuzhelev, A. A., Krumkacheva, O. A., Fedin, M. V., Karpova, G. G., Bagryanskaya, E. G. Structural rearrangements in mRNA upon its binding to human 80S ribosomes revealed by EPR spectroscopy // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – Vol. 46. – N. 2. – P. 897–904.
399. Bulygin, K. N., Timofeev, I. O., Malygin, A. A., Graifer, D. M., Meschaninova, M. I., Venyaminova, A. G., Krumkacheva, O. A., Fedin, M. V., Frolova, Y. L., Karpova, G. G., Bagryanskaya, E. G. Two alternative conformations of mRNA in the human ribosome during elongation and termination of translation as revealed by EPR spectroscopy // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* – 2021. – Vol. 19. – P. 4702–4710.
400. Piton, N., Mu, Y., Stock, G., Prisner, T. F., Schiemann, O., Engels, J. W. Base-specific spin-labeling of RNA for structure determination // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – Vol. 35. – N. 9. – P. 3128–3143.
401. Miller, G. P., Kool, E. T. A simple method for electrophilic functionalization of DNA // *Org. Lett.* – 2002. – Vol. 4. – N. 21. – P. 3599–3601.
402. Miller, G. P., Kool, E. T. Versatile 5'-functionalization of oligonucleotides on solid support: amines, azides, thiols, and thioethers via phosphorus chemistry // *J. Org. Chem.* – 2004. – Vol. 69. – N. 7. – P. 2404–2410.
403. Qiu, J., El-Sagheer, A. H., Brown, T. Solid phase click ligation for the synthesis of very long oligonucleotides // *Chem. Commun.* – 2013. – Vol. 49. – N. 62. – P. 6959–6961.
404. Alvira, M., Eritja, R. Synthesis of oligonucleotides carrying 5'-5' linkages using copper-catalyzed cycloaddition reactions. // *Chem. Biodivers.* – 2007. – Vol. 4. – N. 12. – P. 2798–2809.
405. Mazzini, S., García-Martin, F., Alvira, M., Aviñó, A., Manning, B., Albericio, F., Eritja, R. Synthesis of oligonucleotide derivatives using ChemMatrix supports // *Chem. Biodivers.* – 2008. – Vol. 5. – N. 1. – P. 209–218.
406. Hudson, R., Li, G., Tse, J. The use of Sonogashira coupling for the synthesis of modified uracil peptide nucleic acid // *Tetrahedron Lett.* – 2002. – Vol. 43. – N. 8. – P. 1381–1386.
407. Seela, F., Sirivolu, V. R., Chittepu, P. The Modification of DNA with Octadiynyl Side Chains : Synthesis , Base Pairing and Formation of Fluorescent Coumarin Dye Conjugates of Four Nucleobases by the Alkyne – Azide “ Click ” Reaction Table of Contents Table 1 : T m Data of Oligonucleotide Duplex // *Bioconjug. Chem.* – 2008. – Vol. 19. – N. 1. – P. 211–224.

408. Hervé, G., Len, C. Heck and Sonogashira couplings in aqueous media – application to unprotected nucleosides and nucleotides // *Sustain Chem Process.* – 2015. – Vol. 3. – P. 3.
409. Ejlersen, M., Lou, C., Sanghvi, Y. S., Tor, Y., Wengel, J. Modification of oligodeoxynucleotides by on-column Suzuki cross-coupling reactions // *Chem. Commun.* – 2018. – Vol. 54. – N. 57. – P. 8003–8006.
410. Walunj, M. B., Srivatsan, S. G. Nucleic Acid Conformation Influences Postsynthetic Suzuki–Miyaura Labeling of Oligonucleotides // *Bioconjug. Chem.* – 2020. – Vol. 31. – N. 11. – P. 2513–2521.
411. Fitzgerald, P. R., Paegel, B. M. DNA-Encoded Chemistry: Drug Discovery from a Few Good Reactions // *Chem. Rev.* – 2021. – Vol. 121. – N. 12. – P. 7155–7177.
412. Mikami, A., Mori, S., Osawa, T., Obika, S. Post-Synthetic Nucleobase Modification of Oligodeoxynucleotides by Sonogashira Coupling and Influence of Alkynyl Modifications on the Duplex-Forming // *Chem. - A Eur. J.* – 2023. – Vol. 29. – N. 63. – P. e202301928.
413. Nelson, A. J., Sniderman, A. D., Ditmarsch, M., Dicklin, M. R., Nicholls, S. J., Davidson, M. H., Kastelein, J. J. P. Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition Reduces Major Adverse Cardiovascular Events by Lowering Apolipoprotein B Levels // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23. – N. 16. – P. 9417.
414. Santa-María, C., López-Enríquez, S., Montserrat-de la Paz, S., Geniz, I., Reyes-Quiroz, M. E., Moreno, M., Palomares, F., Sobrino, F., Alba, G. Update on Anti-Inflammatory Molecular Mechanisms Induced by Oleic Acid // *Nutrients.* – 2023. – Vol. 15. – N. 1. – P. 224.
415. Farag, M. A., Gad, M. Z. Omega-9 fatty acids: potential roles in inflammation and cancer management // *J. Genet. Eng. Biotechnol.* – 2022. – Vol. 20. – N. 1. – P. 48.
416. Zagoskin, P. P., Erlykina, E. I. Bile Acids as a New Type of Steroid Hormones Regulating Nonspecific Energy Expenditure of the Body (Review) // *Sovrem. Tehnol. v Med.* – 2020. – Vol. 12. – N. 5. – P. 114.
417. Asami, Y., Yoshioka, K., Nishina, K., Nagata, T., Yokota, T. Drug delivery system of therapeutic oligonucleotides // *Drug Discov. Ther.* – 2016. – Vol. 10. – N. 5. – P. 256–262.
418. Ma, H., Patti, M. E. Bile acids, obesity, and the metabolic syndrome // *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* – 2014. – Vol. 28. – N. 4. – P. 573–583.
419. Hayashi, T. The Sigma-1 Receptor in Cellular Stress Signaling // *Front. Neurosci.* – 2019. – Vol. 13. – 733 (5 pp).
420. Li, S.-L., Wang, Y., Zhang, J., Wei, W., Lu, H. Targeted delivery of a guanidine-pendant Pt(IV)-backboned poly-prodrug by an anisamide-functionalized polypeptide // *J. Mater. Chem. B.* – 2017. – Vol. 5. – N. 48. – P. 9546–9557.

421. Dasargyri, A., Kūmin, C. D., Leroux, J. Targeting Nanocarriers with Anisamide: Fact or Artifact // *Adv. Mater.* – 2017. – Vol. 29. – N. 7.
422. Singh, T., Murthy, A. S. N., Yang, H.-J., Im, J. Versatility of cell-penetrating peptides for intracellular delivery of siRNA // *Drug Deliv.* – 2018. – Vol. 25. – N. 1. – P. 1996–2006.
423. Ullah, I., Chung, K., Beloor, J., Kim, J., Cho, M., Kim, N., Lee, K. Y., Kumar, P., Lee, S.-K. Trileucine residues in a ligand-CPP-based siRNA delivery platform improve endosomal escape of siRNA // *J. Drug Target.* – 2017. – Vol. 25. – N. 4. – P. 320–329.
424. Salim, L., Islam, G., Desaulniers, J.-P. Targeted delivery and enhanced gene-silencing activity of centrally modified folic acid–siRNA conjugates // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – Vol. 48. – N. 1. – P. 75–85.
425. [www.idtdna.com/pages/products/custom-dna-rna](http://www.idtdna.com/pages/products/custom-dna-rna).
426. <https://www.agilent.com/en/product/crispr-cas>.
427. [www.genscript.com](http://www.genscript.com).
428. Wincott, F., Drenzo, A., Shaffer, C., Grimm, S., Tracz, D., Workman, C., Sweedler, D., Gonzalez, C., Scaringe, S., Usman, N. Synthesis , deprotection , analysis and purification of RNA and ribozymes // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – Vol. 23. – N. 14. – P. 2677–2684.
429. Sack, M., Hölz, K., Holik, A.-K., Kretschy, N., Somoza, V., Stengele, K.-P., Somoza, M. M. Express photolithographic DNA microarray synthesis with optimized chemistry and high-efficiency photolabile groups // *J. Nanobiotechnology.* – 2016. – Vol. 14. – N. 1. – P. 14.
430. Krotz, A. H., et al. On the formation of longmers in phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide synthesis // *Tetrahedron Lett.* – 1997. – Vol. 38. – P. 3875.
431. Pitsch S. et al. Ribonucleoside-derivative and method for preparing the same 2'-TOM // 1999. – P. US 5986084A.
432. Basila, M., Kelley, M. L., Smith, A. van B. Minimal 2'-O-methyl phosphorothioate linkage modification pattern of synthetic guide RNAs for increased stability and efficient CRISPR-Cas9 gene editing avoiding cellular toxicity // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12. – N. 11. – P. e0188593.
433. Ryan, D. E., Taussig, D., Steinfeld, I., Phadnis, S. M., Lunstad, B. D., Singh, M., Vuong, X., Okochi, K. D., McCaffrey, R., Olesiak, M., Roy, S., Yung, C. W., Curry, B., Sampson, J. R., Bruhn, L., Dellinger, D. J. Improving CRISPR–Cas specificity with chemical modifications in single-guide RNAs // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – Vol. 46. – N. 2. – P. 792–803.
434. Lyu, Z., Katolik, A., Yaseen, I., Pater, A. A., Robert, F., Huang, S., Gagnon, K. T., Unrau, P. J., Damha, M. J. Synthesis of long and functionally active RNAs facilitated by acetal levulinic ester chemistry // *Nucleic Acids Res.* – 2026. – Vol. 54. – N. 2. – P. gkaf1525.
435. Mullah, B., Andrus, A., Zhao, H., Jones, R. A. Oxidative Conversion of N-

- Dimethylformamidine Nucleosides to N-Cyano Nucleosides // *Tetrahedron Lett.* – 1995. – Vol. 36. – N. 25. – P. 4373–4376.
436. 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.
437. Reddy, M. P. Ultrafast Cleavage and Deprotection of Oligonucleotides Synthesis and Use of C-Ac Derivatives // *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids.* – 1997. – Vol. 16. – P. 1589.
438. Westman, E., Stromberg, R. Removal of t-butyltrimethylsilyl protection in RNA-synthesis . Triethylamine trihydrofluoride ( TEA , 3HF ) is a more reliable alternative to tetrabutylammonium fluoride ( TBAF ) // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – Vol. 22. – N. 12. – P. 2430–2431.
439. Новопашина, Д. С., Ахметова, Е. А., Мещанинова, М. И., Вохтанцев, И. П., Жарков, Д. О., Венямина, А. Г. Модифицированная направляющая РНК, обладающая способностью инактивировать систему редактирования генома CRISPR/Cas9, и способ ее получения // патент RU2020128457A. – 2020. – P. Application events 2020-08-26.
440. Semikolenova, O., Sakovina, L., Akhmetova, E., Kim, D., Vokhtantsev, I., Golyshev, V., Vorobyeva, M., Novopashin, S., Novopashina, D. Photoactivatable nanoCRISPR/Cas9 System Based on crRNA Reversibly Immobilized on Carbon Nanoparticles // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – N. 20. – P. 10919.
441. Sakovina, L., Vokhtantsev, I., Vorobyeva, M., Vorobyev, P., Novopashina, D. Improving Stability and Specificity of CRISPR/Cas9 System by Selective Modification of Guide RNAs with 2'-fluoro and Locked Nucleic Acid Nucleotides // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23. – N. 21. – P. 13460.
442. Akhmetova, E. A., Vokhtantsev, I. P., Meschaninova, M. I., Vorobyeva, M. A., Zharkov, D. O. Novopashina, D. S. Photocleavable Guide RNA for Photocontrolled CRISPR/Cas9 System // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2024. – Vol. 50. – N. 4. – P. 1314–1324.
443. Ivanskaya, E. V., Meschaninova, M. I., Vorobyeva, M. A., Zharkov, D. O., Novopashina, D. S. An Approach to the Synthesis of Cyclic Photocleavable RNA for Photoactivatable CRISPR/Cas9 System // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2024. – Vol. 50. – P. 1807–1821.
444. Ким, Д. В., Доме, А. С., Мещанинова, М. И., Новопашина, Д. С. Новый подход к синтезу фотоблокированных малых интерферирующих РНК для активируемой светом РНК-интерференции // *Биоорган. химия.* – 2022. – Vol. 48. – N. 5. – P. 580–588.
445. Akhmetova, E. A., Kim, D. V., Dome, A. S., Meschaninova, M. I., Novopashina, D. S. Photocaged Small Interfering RNA // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2022. – Vol. 48. – N. 5. – P.

1036–1042.

446. Фокина, А. А., Воробьева, М. А., Тимошенко, В. . В., Поповецкая, А. С., Невинский, Г. А., Веняминова, А. Г. РНК-аптамер, обладающий способностью узнавать аутоантитела, характерные для рассеянного склероза // патент RU2549704C1. – 2015.
447. Тимошенко, В. В., Воробьева, М. А., Невинский, Г. А., Веняминова, А. Г. РНК-аптамер, обладающий способностью узнавать аутоантитела, характерные для рассеянного склероза // патент RU2644229C1. – 2017.
448. Davydova, A., Vorobyeva, M., Bashmakova, E., Vorobjev, P., Krasheninina, O., Tupikin, A., Kabilov, M., Krasitskaya, V., Frank, L., Venyaminova, A. Development and characterization of novel 2'-F-RNA aptamers specific to human total and glycated hemoglobins // *Anal. Biochem.* – 2019. – Vol. 570. – P. 43–50.
449. Davydova, A. S., Timoshenko, V. V., Lomzov, A. A., Pyshnyi, D. V., Venyaminova, A. G., Vorobyeva, M. A. G-quadruplex 2'-F-modified RNA aptamers targeting hemoglobin: Structure studies and colorimetric assays // *Anal. Biochem.* – 2020. – Vol. 611. – P. 113886.
450. Novopashina, D. S., Vorobyeva, M. A., Lomzov, A. A., Silnikov, V. N., Venyaminova, A. G. Terminal Mono- and Bis-Conjugates of Oligonucleotides with Closo-Dodecaborate: Synthesis and Physico-Chemical Properties // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 22. – N. 1. – P. 182.
451. Vorobyeva, M. A., Dymova, M. A., Novopashina, D. S., Kuligina, E. V., Timoshenko, V. V., Kolesnikov, I. A., Taskaev, S. Y., Richter, V. A., Venyaminova, A. G. Tumor Cell-Specific 2'-Fluoro RNA Aptamer Conjugated with Closo-Dodecaborate as A Potential Agent for Boron Neutron Capture Therapy // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – N. 14. – P. 7326.
452. Vorobyeva, M. A., Dymova, M. A., Novopashina, D. S., Kuligina, E. V., Kolesnikov, I. A., Taskaev, S. Y., Richter, V. A., Meschaninova, M. I. Oligonucleotide aptamers as novel cell-specific delivery agents for boron neutron capture therapy // *Sib. Med. Rev.* – 2022. – N. 5. – P. 108.
453. Novopashina, D. S., Dymova, M. A., Davydova, A. S., Meschaninova, M. I., Malysheva, D. O., Kuligina, E. V., Richter, V. A., Kolesnikov, I. A., Taskaev, S. Y., Vorobyeva, M. A. Aptamers for Addressed Boron Delivery in BNCT: Effect of Boron Cluster Attachment Site on Functional Activity // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24. – N. 1. – P. 306.
454. Новопашина, Д. С., Должикова, О. А., Мещанинова, М. И., Сильников, В. Н., Воробьева, М. А. Способ получения конъюгатов олигонуклеотидов с кластерами бора // патент RU2786533C1. – P. 2022-09-06.
455. Won Lee, J., Kyu Shim, M., Kim, H., Jang, H., Lee, Y., Hwa Kim, S. RNAi therapies: Expanding applications for extrahepatic diseases and overcoming delivery challenges // *Adv.*

Drug Deliv. Rev. – 2023. – Vol. 201. – P. 115073.

456. Corydon, I. J., Fabian-Jessing, B. K., Jakobsen, T. S., Jørgensen, A. C., Jensen, E. G., Askou, A. L., Aagaard, L., Corydon, T. J. 25 years of maturation: A systematic review of RNAi in the clinic // Mol. Ther. - Nucleic Acids. – 2023. – Vol. 33. – P. 469–482.

457. Isenmann, M., Stoddart, M. J., Schmelzeisen, R., Gross, C., Della Bella, E., Rothweiler, R. M. Basic Principles of RNA Interference: Nucleic Acid Types and In Vitro Intracellular Delivery Methods // Micromachines. – 2023. – Vol. 14. – N. 7. – P. 1321.

458. Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y., Liang, X.-J. Therapeutic siRNA: state of the art // Signal Transduct. Target. Ther. – 2020. – Vol. 5. – N. 1. – P. 101.

459. Веняминава, А. Г., Левина, А. С., Репкова, М. Н., Ченцова, Н. А. Фосфорилирование олигонуклеотидов с использованием β-цианэтилфосфита // Биоорган. химия. – 1989. – Vol. 15. – P. 844.

460. Harborth, J., Elbashir, S. M., Vandenburgh, K., Manninga, H., Scaringe, S. a, Weber, K., Tuschl, T. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. // Antisense Nucleic Acid Drug Dev. – 2003. – Vol. 13. – N. 2. – P. 83–105.

461. Веняминава, А. Г., Сергеева, З. А., Баширова, В. З. Н-Фосфонаты гидроксистероидов - новые ключевые соединения для синтеза стероидсодержащих моно- и олигонуклеотидов и их аналогов // Биоорган. химия. – 1991. – Vol. 17. – P. 1294.

462. Kanamala, M., Wilson, W. R., Yang, M., Palmer, B. D., Wu, Z. Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review // Biomaterials. – 2016. – Vol. 85. – P. 152–167.

463. Yang, Y., Mu, J., Xing, B. Photoactivated drug delivery and bioimaging // WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology. – 2017. – Vol. 9. – N. 2.

464. Guo, X., Cheng, Y., Zhao, X., Luo, Y., Chen, J., Yuan, W.-E. Advances in redox-responsive drug delivery systems of tumor microenvironment // J. Nanobiotechnology. – 2018. – Vol. 16. – N. 1. – P. 74.

465. Eroğlu, İ., İbrahim, M. Liposome–ligand conjugates: a review on the current state of art // J. Drug Target. – 2020. – Vol. 28. – N. 3. – P. 225–244.

466. Stasińska, A. R., Putaj, P., Chmielewski, M. K. Disulfide bridge as a linker in nucleic acids' bioconjugation. Part II: A summary of practical applications // Bioorg. Chem. – 2020. – Vol. 95. – P. 103518.

467. Aho, A., Äärelä, A., Korhonen, H., Virta, P. Expanding the Scope of the Cleavable N-(Methoxy)oxazolidine Linker for the Synthesis of Oligonucleotide Conjugates // Molecules. –

2021. – Vol. 26. – N. 2. – P. 490.

468. Han, M., Beon, J., Lee, J. Y., Oh, S. S. Systematic Combination of Oligonucleotides and Synthetic Polymers for Advanced Therapeutic Applications // *Macromol. Res.* – 2021. – Vol. 29. – N. 10. – P. 665–680.

469. Smith, S. A., Selby, L. I., Johnston, A. P. R., Such, G. K. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery // *Bioconjug. Chem.* – 2019. – Vol. 30. – N. 2. – P. 263–272.

470. Wolff, J. A., Rozema, D. B. Breaking the Bonds: Non-viral Vectors Become Chemically Dynamic // *Mol. Ther.* – 2008. – Vol. 16. – N. 1. – P. 8–15.

471. Stanton, M. G., Colletti, S. L. Medicinal Chemistry of siRNA Delivery // *J. Med. Chem.* – 2010. – Vol. 53. – N. 22. – P. 7887–7901.

472. Oumzil, K., Benizri, S., Tonelli, G., Staedel, C., Appavoo, A., Chaffanet, M., Navailles, L., Barthélémy, P. pH-Cleavable Nucleoside Lipids: A New Paradigm for Controlling the Stability of Lipid-Based Delivery Systems // *ChemMedChem.* – 2015. – Vol. 10. – N. 11. – P. 1797–1801.

473. Movahedi, F., Hu, R. G., Becker, D. L., Xu, C. Stimuli-responsive liposomes for the delivery of nucleic acid therapeutics // *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* – 2015. – Vol. 11. – N. 6. – P. 1575–1584.

474. Jacques, S. A., Leriche, G., Mosser, M., Nothisen, M., Muller, C. D., Remy, J.-S., Wagner, A. From solution to in-cell study of the chemical reactivity of acid sensitive functional groups: a rational approach towards improved cleavable linkers for biospecific endosomal release // *Org. Biomol. Chem.* – 2016. – Vol. 14. – N. 21. – P. 4794–4803.

475. Dirksen, A., Yegneswaran, S., Dawson, P. E. Bisaryl Hydrazones as Exchangeable Biocompatible Linkers // *Angew. Chemie Int. Ed.* – 2010. – Vol. 49. – N. 11. – P. 2023–2027.

476. Zatsepin, T. S., Stetsenko, D. A., Gait, M. J., Oretskaya, T. S. Use of Carbonyl Group Addition–Elimination Reactions for Synthesis of Nucleic Acid Conjugates // *Bioconjug. Chem.* – 2005. – Vol. 16. – N. 3. – P. 471–489.

477. Khomyakova, E. A., Zubin, E. M., Pavlova, L. V., Kazanova, E. V., Smirnov, I. P., Pozmogova, G. E., Muller, S., Dolinnaya, N. G., Kubareva, E. A., Hartmann, R. K., Oretskaya, T. S. 2'-modified oligoribonucleotides containing 1,2-diol and aldehyde groups. Synthesis and properties // *Russ. J. Bioorganic Chem.* – 2012. – Vol. 38. – N. 5. – P. 488–499.

478. Podyminogin, M. A. Attachment of benzaldehyde-modified oligodeoxynucleotide probes to semicarbazide-coated glass // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – Vol. 29. – N. 24. – P. 5090–5098.

479. Lartia, R. Synthesis of 5'-Aldehyde Oligonucleotide // *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* –

2016. – Vol. 64. – N. 1.

480. Ma, Y., Lv, Z., Li, T., Tian, T., Lu, L., Liu, W., Zhu, Z., Yang, C. Design and synthesis of ortho -phthalaldehyde phosphoramidite for single-step, rapid, efficient and chemoselective coupling of DNA with proteins under physiological conditions // *Chem. Commun.* – 2018. – Vol. 54. – N. 68. – P. 9434–9437.

481. Küpfer, P. A., Leumann, C. J. RNA Abasic Sites: Preparation and Trans-Lesion Synthesis by HIV-1 Reverse Transcriptase // *ChemBioChem.* – 2005. – Vol. 6. – N. 11. – P. 1970–1973.

482. Hirano, Y., Kojima, N., Komatsu, Y. Synthesis and Application of Interstrand Cross-Linked Duplexes by Covalently Linking a Pair of Abasic Sites // *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* – 2018. – Vol. 75. – N. 1.

483. He, J., Liu, G., Dou, S., Gupta, S., Rusckowski, M., Hnatowich, D. An Improved Method for Covalently Conjugating Morpholino Oligomers to Antitumor Antibodies // *Bioconjug. Chem.* – 2007. – Vol. 18. – N. 3. – P. 983–988.

484. Flor, A. C., Williams, J. H., Blaine, K. M., Duggan, R. C., Sperling, A. I., Schwartz, D. A., Kron, S. J. DNA-Directed Assembly of Antibody–Fluorophore Conjugates for Quantitative Multiparametric Flow Cytometry // *ChemBioChem.* – 2014. – Vol. 15. – N. 2. – P. 267–275.

485. He, Z., Chen, Q., Chen, F., Zhang, J., Li, H., Lin, J.-M. DNA-mediated cell surface engineering for multiplexed glycan profiling using MALDI-TOF mass spectrometry // *Chem. Sci.* – 2016. – Vol. 7. – N. 8. – P. 5448–5452.

486. Abu Ajaj, K., El-Abadla, N., Welker, P., Azab, S., Zeisig, R., Fichtner, I., Kratz, F. Comparative evaluation of the biological properties of reducible and acid-sensitive folate prodrugs of a highly potent doxorubicin derivative // *Eur. J. Cancer.* – 2012. – Vol. 48. – N. 13. – P. 2054–2065.

487. Rodrigues, P. C. A., Roth, T., Fiebig, H. H., Unger, C., Mülhaupt, R., Kratz, F. Correlation of the acid-sensitivity of polyethylene glycol daunorubicin conjugates with their in vitro antiproliferative activity // *Bioorg. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 14. – N. 12. – P. 4110–4117.

488. Rodrigues, P. C. A., Beyer, U., Schumacher, P., Roth, T., Fiebig, H. H., Unger, C., Messori, L., Orioli, P., Paper, D. H., Mülhaupt, R., Kratz, F. Acid-sensitive polyethylene glycol conjugates of doxorubicin: preparation, in vitro efficacy and intracellular distribution // *Bioorg. Med. Chem.* – 1999. – Vol. 7. – N. 11. – P. 2517–2524.

489. Bolin, D. R., Sytwu, I.-I., Humiec, F., Meienhofer, J. Preparation of oligomer-free N $\alpha$ -Fmoc and N $\alpha$ -urethane amino acids // *Int. J. Pept. Protein Res.* – 1989. – Vol. 33. – P. 353.

490. Zatsepin, T. S., Stetsenko, D. A., Gait, J., Oretskaya, T. S. Synthesis of DNA conjugates by solid-phase fragment condensation via aldehyde – nucleophile coupling // *Tetrahedron Lett.* –

2005. – Vol. 46. – P. 3191–3195.

491. Burgstaller, J. P., Johnston, I. G., Jones, N. S., Albrechtová, J., Kolbe, T., Vogl, C., Futschik, A., Mayrhofer, C., Klein, D., Sabitzer, S., Blattner, M., Güllý, C., Poulton, J., Rülícke, T., Piáleek, J., Steinborn, R., Brem, G. mtDNA Segregation in Heteroplasmic Tissues Is Common In Vivo and Modulated by Haplotype Differences and Developmental Stage // *Cell Rep.* – 2014. – Vol. 7. – N. 6. – P. 2031–2041.

492. Loutre, R., Heckel, A., Smirnova, A., Entelis, N., Tarassov, I. Can Mitochondrial DNA be CRISPRized: Pro and Contra // *IUBMB Life.* – 2018. – Vol. 70. – N. 12. – P. 1233–1239.

493. Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V., Zhang, F. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System // *Cell.* – 2015. – Vol. 163. – N. 3. – P. 759–771.

494. Zhou, Y., Guan, J., Gao, W., Lv, S., Ge, M. Quantification and confirmation of fifteen carbamate pesticide residues by multiple reaction monitoring and enhanced product ion scan modes via LC-MS/MS QTRAP system // *Molecules.* – 2018. – Vol. 23. – P. 2496.

495. Manoharan, M., Kesavan, V., Rajeev, K. G. Modified iRNA agents // Pat. 20050107325 A1 United States. Fish Richardson Pap. Corp. (United States) - 19.05.05, U.S. Bost. MA. - 245 pp.

496. Trindade, A. F., Frade, R. F. M., Maçôas, E. M. S., Graça, C., Rodrigues, C. A. B., Martinho, J. M. G., Afonso, C. A. M. “Click and go”: simple and fast folic acid conjugation // *Org. Biomol. Chem.* – 2014. – Vol. 12. – N. 20. – P. 3181–3190.

497. Xu, Z., Peng, J., Yan, N., Yu, H., Zhang, S., Liu, K., Fang, Y. Simple design but marvelous performances: Molecular gels of superior strength and self-healing properties // *Soft. Matter.* – 2013. – Vol. 9. – P. 1091–1099.

498. Hermanson, G. Bioconjugate Techniques // Elsevier, 2008; ISBN 9780123705013.

499. Zalipsky, S., Seltzer, R., Menon-Rudolph, S. Evaluation of a new reagent for covalent attachment of polyethylene glycol to proteins // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 1992. – Vol. 15. – N. 1. – P. 100–114.

500. Diala, I., Osada, A., Maruoka, S., Imanisi, T., Murao, S., Ato, T., Ohba, H., Fujii, M. Synthesis of phosphorothioate oligonucleotide–peptide conjugates by solid phase fragment condensation // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2007. – Vol. 17. – N. 23. – P. 6576–6578.

501. Liu, Z., Ren, Y., Pan, L., Xu, H.-M. In Vivo Anti-Tumor Activity of Polypeptide HM-3 Modified by Different Polyethylene Glycols (PEG) // *Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – Vol. 12. – N. 4. – P. 2650–2663.

502. Jorda, R., Dušek, J., Řezníčková, E., Pauk, K., Magar, P. P., Imramovský, A., Kryštof, V.

- Synthesis and antiproteasomal activity of novel O-benzyl salicylamide-based inhibitors built from leucine and phenylalanine // *Eur. J. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 135. – P. 142–158.
503. Nuhant, P., Roush, W. R. Enantio- and diastereoselective synthesis of N-acetyl dihydrotetrafibricin methyl ester // *J. Am. Chem. Soc.* – 2013. – Vol. 135. – N. 14. – P. 5340–5343.
504. Kellenberger, J. L., Shapiro, S. R., Mathews, S., Guery, P., Barbier, P. J. N. New macrolides // *Pat. WO/2006/084410*, Basel, Switzerland. – 54 pp.
505. Chen, J., Zhao, J., Gong, X., Xu, D., Zhao, B. A new type of chiral-pyridoxamines for catalytic asymmetric transamination of  $\alpha$ -keto acids // *Tetrahedron Lett.* – 2016. – Vol. 57. – N. 41. – P. 4612–4615.
506. Coffey, D. S., McDonald, A. I., Overman, L. E., Rabinowitz, M. H., Renhowe, P. A. A Practical Entry to the Crambescidin Family of Guanidine Alkaloids. Enantioselective Total Syntheses of Ptilomycalin A, Crambescidin 657 and Its Methyl Ester (Neofolitispates 2), and Crambescidin 800 // *J. Am. Chem. Soc.* – 2000. – Vol. 122. – N. 20. – P. 4893–4903.
507. Dandliker, P. J., Diederich, F., Gross, M., Knobler, C. B., Louati, A., Sanford, E. M. Dendritic Porphyrins: Modulating Redox Potentials of Electroactive Chromophores with Pendant Multifunctionality // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 1994. – Vol. 33. – N. 17. – P. 1739 – 1742.
508. Dovydenko, I. S., Kupryushkin, M. S., Pyshnyi, D. V., Apartsin, E. K. A convenient solid phase approach to obtain lipophilic 5'-phosphoramidate derivatives of DNA and RNA oligonucleotides // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* – 2018. – Vol. 37. – N. 2. – P. 102–111.
509. Jain, P. K., Friedman, S. H. The ULTIMATE Reagent: A Universal Photocleavable and Clickable Reagent for the Regiospecific and Reversible End Labeling of Any Nucleic Acid // *ChemBioChem.* – 2018. – Vol. 19. – N. 12. – P. 1264–1270.
510. Bramsen, J. B., Laursen, M. B., Damgaard, C. K., Lena, S. W., Ravindra Babu, B., Wengel, J., Kjems, J. Improved silencing properties using small internally segmented interfering RNAs // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – Vol. 35. – N. 17. – P. 5886–5897.
511. Sekine, M., Tsuruoka, H., Iimura, S., Kusuoku, H., Wada, T., Furusawa, K. Studies on Steric and Electronic Control of 2'-3' Phosphoryl Migration in 2'-Phosphorylated Uridine Derivatives and Its Application to the Synthesis of 2'-Phosphorylated Oligouridylates // *J. Org. Chem.* – 1996. – Vol. 61. – N. 12. – P. 4087–4100.
512. Novopashina, D. S., Totskaia, O. S., Kholodar', S. A., Meshchaninova, M. I., Ven'iaminova, A. G. Oligo(2'-O-methylribonucleotides) and their derivatives: III. 5'-mono- and 5'-bispyrenyl derivatives of oligo(2'-O-methylribonucleotides) and their 3'-modified analogues:

- synthesis and properties // *Bioorg. Khim.* – 2008. – Vol. 34. – N. 5. – P. 671–682.
513. Chernikov, I. V., Karelina, U. A., Meshchaninova, M. I., Venyaminova, A. G., Zenkova, M. A., Vlassov, V. V., Chernolovskaya, E. L. Investigation of the mechanism of internalization of fluorescently labeled lipophilic siRNA into cultured tumor cells // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2019. – Vol. 45. – N. 6. – P. 765–772.
514. Chernikov, I. V., Gladkikh, D. V., Meschaninova, M. I., Ven'yaminova, A. G., Zenkova, M. A., Vlassov, V. V., Chernolovskaya, E. L. Cholesterol-Containing Nuclease-Resistant siRNA Accumulates in Tumors in a Carrier-free Mode and Silences MDR1 Gene // *Mol. Ther. - Nucleic Acids.* – 2017. – Vol. 6.
515. Chernikov, I. V., Meschaninova, M. I., Venyaminova, A. G., Zenkova, M. A., Vlassov, V. V., Chernolovskaya, E. L. Cholesterol-conjugated siRNA accumulates in the different hematopoietic and lymphoid cells // *J. Hematol. Oncol. Res.* – 2016. – Vol. 2. – N. 2. – P. 13–19.
516. Chernikov, I. V., Ponomareva, U. A., Meschaninova, M. I., Bachkova, I. K., Teterina, A. A., Gladkikh, D. V., Savin, I. A., Vlassov, V. V., Zenkova, M. A., Chernolovskaya, E. L. Cholesterol-conjugated supramolecular multimeric siRNAs: effect of siRNA length on accumulation and silencing in vitro and in vivo // *Nucleic Acid Ther.* – 2023. – Vol. 33. – N. 6. – P. 361–373.
517. Chernikov, I. V., Bachkova, I. K., Sen'kova, A. V., Meschaninova, M. I., Savin, I. A., Vlassov, V. V., Zenkova, M. A., Chernolovskaya, E. L. Cholesterol-Modified Anti-IL6 siRNA Reduces the Severity of Acute Lung Injury in Mice // *Cells.* – 2024. – Vol. 13. – N. 9. – P. 767.
518. Chernikov, I. V., Ponomareva, U. A., Meschaninova, M. I., Bachkova, I. K., Vlassov, V. V., Zenkova, M. A., Chernolovskaya, E. L. Cholesterol Conjugates of Small Interfering RNA: Linkers and Patterns of Modification // *Molecules.* – 2024. – Vol. 29. – P. 786.
519. Gvozdeva, O. V., Belogurov, A. A., Kuzina, E. S., Gabibov, A. G., Meschaninova, M. I., Ven'yaminova, A. G., Zenkova, M. A., Vlassov, V. V., Chernolovskaya, E. L. Modified siRNA effectively silence inducible immunoproteasome subunits in NSO cells // *Biochimie.* – 2016. – Vol. 125. – P. 75–82.
520. Petrova (Kruglova), N. S., Meschaninova, M. I., Venyaminova, A. G., Zenkova, M. A., Vlassov, V. V., Chernolovskaya, E. L. 2'-O-methyl-modified anti-MDR1 fork-siRNA duplexes exhibiting high nuclease resistance and prolonged silencing activity // *Oligonucleotides.* – 2010. – Vol. 20. – N. 6. – P. 297–308.
521. Miroshnichenko, S. K., Amirloo, B., Bichenkova, E. V., Vlassov, V. V., Zenkova, M. A., Patutina, O. A. 2'OMe Modification of Anti-miRNA-21 Oligonucleotide–Peptide Conjugate Improves Its Hybridization Properties and Catalytic Activity // *Russ. J. Bioorg. Chem.* – 2020. –

Vol. 45. – P. 803–812.

522. Sen'kova, A. V., Savin, I. A., Kabilova, T. O., Zenkova, M. A., Chernolovskaya, E. L. Tumor-Suppressing, Immunostimulating, and Hepatotoxic Effects of Immunostimulatory RNA in Combination with Dacarbazine in a Murine Melanoma Model // *Mol. Cell Biol.* – 2020. – Vol. 54. – P. 233–242.

523. Chernikov, I. V., Staroseletz, Y. Y., Tatarnikova, I. S., Sen'kova, A. V., Savin, I. A., Markov, A. V., Logashenko, E. B., Chernolovskaya, E. L., Zenkova, M. A., Vlassov, V. V. siRNA-Mediated Timp1 Silencing Inhibited the Inflammatory Phenotype during Acute Lung Injury // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24. – N. 2. – P. 1641.

524. Патутина, О. А., Мирошниченко, С. К., Ломзов, А. А., Миронова, Н. Л., Зенкова, М. А. Выбор олигонуклеотидов, селективно связывающих онкогенную miR-211 // *Биоорганическая химия.* – 2017. – Vol. 43. – N. 1. – P. 35–44.

525. Chernikov, I. V., Gladkikh, D. V., Meshchaninova, M. I., Venyaminova, A. G., Zenkova, M. A., Chernolovskaya, E. L. Effect of attachment of trileucine on the biological activity and accumulation of cholesterol-siRNA conjugates // *New Horizons Transl. Med.* – 2014. – Vol. 4. – N. 1–4. – P. 57.

526. Черников, И. В., Буланов, Д. А., Мещанинова, М. И., Черноловская, Е. Л. Стабильность связи между siРНК и липофильной транспортной группой не влияет на кинетику и эффективность ингибирующего действия // *Евразийский Союз Ученых.* – 2014. – N. 8. – P. 107–109.

527. Kolokolov, M., Malygin, A. A., Graifer, D. M., Meschaninova, M.I., Vorobyeva, M. A., Fedin, M. V., Babaylova, E.S., Bagryanskaya, E. G. Exploring combined spin-labeling approach for structural studies of mRNA in the human ribosome // *J. Chem. Phys.* – 2025. – Vol. 162. – N. 11. – P. 115103.

528. Sharifulin, D. E., Grosheva, A. S., Bartuli, Y. S., Malygin, A. A., Meschaninova, M. I., Ven'yaminova, A. G., Stahl, J., Graifer, D. M., Karpova, G. G. Molecular contacts of ribose-phosphate backbone of mRNA with human ribosome // *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* – 2015. – Vol. 1849. – N. 8. – P. 930–939.

529. Gopanenko, A.V., Kolobova, A.V., Meschaninova, M.I., Venyaminova, A.G., Tupikin, A. E., Kabilov, M. R., Malygin, A. A., Karpova, G. G. Knockdown of the mRNA encoding the ribosomal protein eL38 in mammalian cells causes a substantial reorganization of genomic transcription // *Biochimie.* – 2021. – Vol. 184. – P. 132–142.

530. Gopanenko, A. V., Kolobova, A. V., Meschaninova, M. I., Venyaminova, A. G., Tupikin, A. E., Kabilov, M. R., Malygin, A. A., Karpova, G. . Knockdown of the ribosomal protein eL29

- in mammalian cells leads to significant changes in gene expression at the transcription level // Cells. – 2020. – Vol. 9. – P. 1228.
531. Knauer, N., Pashkina, E., Aktanova, A., Boeva, O., Arkhipova, V., Barkovskaya, M., Meschaninova, M., Karpus, A., Majoral, J. P., Kozlov, V., Apartsin, E. Effects of Cationic Dendrimers and Their Complexes with microRNAs on Immunocompetent Cells // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15. – P. 148.
532. Knauer, N., Arkhipova, V., Li, G., Hewera, M., Pashkina, E., Nguyen, P.-H., Meschaninova, M., Kozlov, V., Zhang, W., Croner, R. S., Caminade, A.-M., Majoral, J.-P., Apartsin, E. K., Kahlert, U. D. In vitro validation of the therapeutic potential of dDendrimer-based nanoformulations against tumor stem cells // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – Vol. 23. – P. 5691.
533. Knauer, N., Pashkina, E., Boeva, O., Aktanova, A., Arkhipova, V., Meschaninova, M., Gomez, R., Sánchez-Nieves, J., Nickel, A.-C., Kahlert, U., Majoral, J.-P., Kozlov, V., Apartsin, E. PB2207: In vitro validation of dendrimer-based approach for micro-RNA delivery into Leukemia cells // HemaSphere. – 2022. – Vol. 6. – N. S.3. – P. 2077–2078.
534. Шатунова, Е. А., Королев, М. А., Мещанинова, М. И., Воробьева, М. А. ДНК-аптамер, специфично связывающийся с белком Dickkopf-1 человека // патент RU2814580. – 2023. – P. 28-07–2023.
535. Shatunova, E. A., Rychkova, A. S., Meschaninova, M., Kabilov, M. R., Tupikin, A. E., Kurochkina, Y. D., Korolev, M. A., Vorobyeva, M. A. Novel DNA Aptamers to Dickkopf-1 Protein Selected from Pre-Structured Libraries, and Colorimetric Test Systems on Their Basis for Analyses of Blood Samples from Patients with Ankylosing Spondylitis // Int. J. Mol. Sci. – 2024. – Vol. 25. – P. 12214.
536. Sen'kova, A. V., Savin, I. A., Chernolovskaya, E. L., Davydova, A. S., Meschaninova, M. I., Bishani, A., Vorobyeva, M. A., Zenkova, M. A. LPS-Induced Acute Lung Injury: Analysis of the Development and Suppression by the TNF- $\alpha$ -Targeting Aptamer // Acta Naturae. – 2024. – Vol. 16. – N. 2. – P. 61–71.
537. Krasitskaya, V. V., Davydova, A. S., Vorobjeva, M. A., Frank, L. The Ca<sup>2+</sup>-Regulated Photoprotein Obelin as a Target for the RNA Aptamer Selection // Russ. J. Bioorg. Chem. – 2018. – Vol. 44. – P. 296–301.
538. Tonin, Y., Heckel, A. M., Vysokikh, M., Dovydenko, I., Meschaninova, M., Rötig, A., Munnich, A., Venyaminova, A., Tarassov, I., Entelis, N. Modeling of antigenomic therapy of mitochondrial diseases by mitochondrially addressed RNA targeting a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA // J. Biol. Chem. – 2014. – Vol. 289. – N. 19. – P. 13323–13334.
539. Dovydenko, I., Venyaminova, A., Pyshnyi, D., Tarassov, I., Entelis, N. Modifications in

- Therapeutic Oligonucleotides Improving the Delivery. // Jurga, S., Erdmann (Deceased), V., Barciszewski, J. *Modif. Nucleic Acids Biol. Med. RNA Technol.* Springer, Cham. – 2016. – Ch 14.
540. [www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer](http://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer)
541. Borer, P. N. Optical properties of nucleic acids, absorption and circular dichroism spectra // *Handb. Biochem. Mol. Biol.* Clevel. CRC Press. 1975.
542. Barton, D. H., Boivin, J., Lelandais, P. Functionalisation of saturated hydrocarbons. Part 13. Further studies on the gif oxidation of cholesterol derivatives // *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* – 1989. – P. 463–468.
543. Rump, E. T., de Vruh, R. L., Sliedregt, L. a, Biessen, E. a, van Berkel, T. J., Bijsterbosch, M. K. Preparation of conjugates of oligodeoxynucleotides and lipid structures and their interaction with low-density lipoprotein // *Bioconjug. Chem.* – 1998. – Vol. 9. – N. 3. – P. 341–9.
544. Сергеева, З. А., Лохов, С. Г., Веняминаова, А. Г. Олиго-(2'-О-метилрибонуклеотиды) и их производные. II. Синтез и свойства олиго-(2'-О-метилрибонуклеотидов) с N-(2-гидроксиэтил)-феназиниевыми и стероидными группировками на 5'-конце // *Биоорган. химия.* – 1996. – Vol. 22. – N. 12. – P. 916–922.
545. Glen Report 20.24: Deprotection—Volume 1—Deprotect to Completion (accessed on 7 April 2024) (<https://www.glenresearch.com/reports/gr20-24>).
546. Proudnikov, D., Mirzabekov, A. Chemical methods of DNA and RNA fluorescent labeling // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – Vol. 24. – N. 22. – P. 4535–4542.
547. Lokhov, S. G., Podyminogin, M. A., Sergeev, D. S., Sil'nikov, V. N., Kutyaev, I. V., Shishkin, G. V., Zarytova, V. P. Synthesis and high stability of complementary complexes of N-(2-hydroxyethyl)phenazinium derivatives oligonucleotides // *Bioconjug. Chem.* – 1992. – Vol. 3. – P. 414–419.

### **Благодарности**

Автор посвящает эту работу памяти Веняминовой Алии Гусейновны, руководителя и наставника.

Автор выражает глубокую признательность своему научному консультанту, член-корр. РАН, д.х.н. Пышному Дмитрию Владимировичу за всестороннюю поддержку и помощь при написании диссертационной работы. Автор сердечно благодарит за поддержку своих коллег из Лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН, а также коллег из многих лабораторий ИХБФМ и других институтов за тесное сотрудничество.

**Список работ, в которых изложены основные результаты диссертации***{в тексте диссертации данные работы приведены курсивом в фигурных скобках}*

1. **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. Т.95. RCR5207. doi:10.59761/RCR5207 (обзорная статья)
2. Repkova M., Mazurkov O., Filippova E., Protsenko M., Mazurkova N., **Meschaninova M.**, Levina A., Zarytova V. Effect of modification of siRNA molecules delivered with aminopropylsilanol nanoparticles on suppression of A/H5N1 virus in cell culture. BBA - General Subjects. 2024. V.1868. 130727. doi:10.1016/j.bbagen.2024.130727
3. Bishani A., **Meschaninova M.I.**, Zenkova M.A., Chernolovskaya E.L. The Impact of Chemical Modifications on the Interferon-Inducing and Antiproliferative Activity of Short Double-Stranded Immunostimulating RNA. Molecules. 2024. V.29. 3225. doi:10.3390/molecules29133225
4. Novak D.D., Troitskaya O.S., Nushtaeva A.A., Zhilnikova M.V., Richter V.A., **Meschaninova M.I.**, Koval O.A. EGFR Suppression Inhibits the Sphere Formation of MCF7 Cells Overexpressing EGFR. Acta Naturae. 2023 V.15. P.59-69. doi: 10.32607/actanaturae.17857
5. Knauer N., **Meschaninova M.**, Muhammad S., Hänggi D., Majoral J.-P., Kahlert U.D., Kozlov V., Apartsin E.K. Effects of Dendrimer-microRNA Nanoformulations against Glioblastoma Stem Cells. Pharmaceutics. 2023. V.15. P.968. doi:10.3390/pharmaceutics15030968
6. Kropacheva N.O., Golyshkin A.A., Vorobyeva M.A., **Meschaninova M.I.** Convenient solid-phase attachment of small-molecule ligands to oligonucleotides via a biodegradable acid-labile P-N-bond. Molecules. 2023. V.28. P.1904. doi:10.3390/molecules28041904
7. Ochkasova A.S., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Graifer D.M., Karpova G.G. AP sites in various mRNA positions cross-link to the protein uS3 in the translating mammalian ribosome. Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom. 2021. V.1869. P.140698. doi:10.1016/j.bbapap.2021.140698
8. **Meschaninova M.I.**, Entelis N.S., Chernolovskaya E.L., Venyaminova A.G. A versatile solid-phase approach to the synthesis of oligonucleotide conjugates with biodegradable hydrazone linker. Molecules. 2021. V.26. P.2119. doi:10.3390/molecules26082119
9. Dovydenko I., **Meschaninova M.**, Heckel AM., Tarassov I., Venyaminova A., Entelis N. Lipophilic conjugates for carrier-free delivery of RNA importable into human mitochondria

- // Mitochondrial Medicine. Methods in Molecular Biology / Eds. Weissig V., Edeas M. New York, NY: Humana, 2021. V.2277. P.49-67. doi:10.1007/978-1-0716-1270-5\_4
10. Черников И.В., **Мещанинова М.И.**, Гладких Д.В., Веняминова А.Г., Зенкова М.А., Власов В.В., Черноловская Е.Л. Взаимодействие липофильных конъюгатов модифицированных siРНК с гемопоэтическими клетками *in vitro* и *in vivo*. Биоорган. химия. 2021. Т.47. С.195-207. doi:10.1134/S1068162021020072
  11. Ахметова Е.А., Гольшев В.М., Вохтанцев И.П., **Мещанинова М.И.**, Веняминова А.Г., Новопашина Д.С. Фотоактивируемая система CRISPR/Cas9. Биоорган. химия. 2021. Т.47. С.276-286. doi:10.1134/S1068162021020023
  12. Chernikov I.V., **Meschaninova M.I.**, Chernolovskaya E.L Preparation, determination of activity and biodistribution of cholesterol-containing nuclease-resistant siRNAs *in vivo*. Methods in Molecular Biology. 2020. V.2115. P.57-77. doi: 10.1007/978-1-0716-0290-4\_3
  13. Chernikov I.V., Gladkikh D.V., Karelina U.A., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Trimeric small interfering RNAs and their cholesterol-containing conjugates exhibit improved accumulation in tumors, but dramatically reduced silencing activity. Molecules. 2020. V.25. P.1877. doi:10.3390/molecules25081877
  14. Ritter G.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Kisaretova P.E., Taranov O.S., Dubatolova T.D., Dolgova E.V., Potter E.A., Kirikovich S.S., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Romanenko M.V., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Kolchanov N.A., Shurdov M.A., Bogachev S.S. Characterization of biological peculiarities of the radioprotective activity of double-stranded RNA isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. Int. J. Radiat. Biol. 2020. V.96. P.1173-1191. doi: 10.1080/09553002.2020.1793020
  15. Malygin A.A., Krumkacheva O.A., Graifer D.M., Timofeev I.O., Ochkasova A.S., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Fedin M.V., Bowman M., Karpova G.G., Bagryanskaya E.G.Exploring the interactions of short RNAs with the human40S ribosomal subunit near the mRNA entry site by EPR spectroscopy. Nucleic Acids Res. 2019. V.47. P.11850-11860. doi:10.1093/nar/gkz1039
  16. **Meschaninova M.I.**, Novopashina D.S., Semikolenova O.A., Silnikov V.N., Venyaminova A.G. Novel convenient approach to the solid-phase synthesis of oligonucleotide conjugates. Molecules. 2019. V.24. P.4266. doi:10.3390/molecules24234266
  17. Gusachenko O.N., Patutina O.A., Gvozdev V.A., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Incorporation of antisense oligonucleotides into lipophilic Concatemeric complexes provides their effective penetration into cells. Russ. J. Bioorg. Chem. 2019. V.45. P.739-748. doi:10.1134/S1068162019060177

18. Ochkasova A.S., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Ivanov A.V., Graifer D.M., Karpova G.G. The human ribosome can interact with the abasic site in mRNA *via* a specific peptide of the uS3 protein located near the mRNA entry channel. *Biochimie*. 2019. V.158. P.117-125. doi:10.1016/j.biochi.2018.12.015
19. Chernikov I.V., Gladkikh D.V., **Meschaninova M.I.**, Karelina U.A., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Fluorophore labeling affects the cellular accumulation and gene silencing activity of cholesterol-modified siRNAs in vitro. *Nucleic Acid Ther.* 2019. V.29. P.33-43. doi:10.1089/nat.2018.0745
20. Gvozdeva O.V., Gladkih D.V., Chernikov I.V., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Nuclease-resistant 63-bp trimeric siRNAs simultaneously silence three different genes in tumor cells. *FEBS Lett.* 2018. V.592. P.122-129. doi:10.1002/1873-3468.12927
21. Кабилова Т.О., **Мещанинова М.И.**, Веняминаова А.Г., Власов В.В., Зенкова М.А., Черноловская Е.Л. Влияние химических модификаций в составе исРНК на ее антипролиферативные и иммуностимулирующие свойства. *Биоорган. химия*. 2017. Т.43. С.59-67. doi:10.1134/S1068162017010046
22. Sharifulin D.E., Bartuli Y.S., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Graifer D.M., Karpova G.G. Exploring accessibility of structural elements of the mammalian 40S ribosomal mRNA entry channel at various steps of translation initiation. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 2016. V.1864. P.1328-1338. DOI:10.1016/j.bbapap.2016.06.011
23. Tonin Y., Heckel A.M., Dovydenko I., **Meschaninova M.**, Comte C., Venyaminova A., Pyshnyi D., Tarassov I., Entelis N. Characterization of chemically modified oligonucleotides targeting a pathogenic mutation in human mitochondrial DNA. *Biochimie*. 2014. V.100. P.192-199. doi:10.1016/j.biochi.2013.08.020
24. Kabilova T.O., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Nikolin V.P., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Short double-stranded RNA with immunostimulatory activity: sequence dependence. *Nucleic Acid Ther.* 2012. V.22. P.196-204. doi:10.1089/nat.2011.0328
25. Petrova N.S., Chernikov I.V., **Meschaninova M.I.**, Dovydenko I.S., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Carrier-free cellular uptake and the gene-silencing activity of the lipophilic siRNAs is strongly affected by the length of the linker between siRNA and lipophilic group. *Nucleic Acids Res.* 2012. V.40. P.2330-2344. doi:10.1093/nar/gkr1002

26. Petrova N.S., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Silencing activity of 2'-O-methyl modified anti-MDR1 siRNAs with mismatches in the central part of the duplexes. FEBS Lett. 2011. V.585. P. 2352-2356. doi:10.1016/j.febslet.2011.06.003
27. Volkov A.A., Kruglova N.S., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect. Oligonucleotides. 2009. V.19. P.191-202. doi:10.1089/oli.2008.0162
28. Iglina A.A., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G. 5'-Lipophilic conjugates of oligonucleotides as components of cell delivery systems. Nucleic acids symp. ser. 2009. №.53. P.121-122. doi:10.1093/nass/nrp061.