

На правах рукописи



ЖАРКОВ ТИМОФЕЙ ДМИТРИЕВИЧ

**РАЗВИТИЕ ПОДХОДА К ПОЛУЧЕНИЮ
ТРИАЗИНИЛАМИДОФОСФАТНЫХ МОДИФИЦИРОВАННЫХ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ОСНОВАННОГО НА РЕАКЦИИ
ШТАУДИНГЕРА С ПРИМЕНЕНИЕМ АЗИДО-ТРИАЗИНОВ**

1.4.9 – биоорганическая химия

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

Купрюшкин Максим Сергеевич, к.х.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Официальные оппоненты:

Мещанинова Мария Ивановна, к.х.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, с.н.с.

Готтих Марина Борисовна, д.х.н., профессор, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, г.н.с.

Волчо Константин Петрович, д.х.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, г.н.с.

Защита состоится «24» апреля 2026 г. в 12:00
на заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, проспект академика Лаврентьева, 8, Новосибирск

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «23» марта 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



Пестряков П.Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

В настоящее время применение синтетических олигонуклеотидов в качестве различных молекулярно-биологических инструментов активно развивается. Одной из наиболее перспективных областей применения олигонуклеотидов можно назвать терапию генетических заболеваний. Так, по состоянию на 2026 год одобрено уже более 20 препаратов на основе олигонуклеотидов для лечения подобных заболеваний [Cronin J.M., Yu A., 2025]. Все НК-препараты представляют собой олигонуклеотиды, содержащие в своем составе различные химические модификации, которые наделяют олигонуклеотид свойствами, важными в контексте терапевтического применения. С помощью введения модификаций возможно повысить эффективность проникновения олигонуклеотидов через клеточную мембрану, увеличить устойчивость к ферментативному и химическому расщеплению, скорректировать избирательность связывания с комплементарной мишенью, и т.п. [Østergaard M.E. et al., 2019; Crooke S.T. et al., 2021].

При создании НК-препаратов нового поколения исследователи все чаще прибегают к использованию сложных комбинаций модификаций [Kandasamy P. et al., 2022], что позволяет получать олигонуклеотиды с четко заданными свойствами. Данный подход, однако, не лишен недостатков, основным из которых является необходимость длительного подбора соотношения и состава модификаций для точечного изменения совокупности свойств олигонуклеотида. Для более тонкого настраивания свойств олигонуклеотидов возможно использование подходов, позволяющих варьирование функциональных групп в рамках однотипных модификаций. В настоящее время, однако, подобных подходов практически не существует.

Ранее в лаборатории химии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН был предложен новый класс модифицированных олигонуклеотидов в виде триазиниламидофосфатных производных (ТАО). Подход к получению данных производных основан на применении различных азидо-триазинов в качестве реагентов на этапе окисления в ходе амидофосфитного синтеза. Основной особенностью подхода является возможность введения широкого разнообразия функциональных заместителей в состав триазинового остова модификации. Несмотря на значительный потенциал данного класса НК-производных в качестве инструмента для тонкого настраивания свойств олигонуклеотидов, он был изучен недостаточно широко с точки зрения как определения границ применимости и фундаментальных аспектов подхода, так и исследования важных свойств создаваемых конструкций.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является развитие подхода к получению нового класса модифицированных олигонуклеотидов в виде триазиниламидофосфатных производных, а также изучение свойств отдельных представителей класса.

Задачи, которые необходимо решить для достижения поставленной цели:

1. Разработать и оптимизировать методы получения триазиламидофосфатных олигонуклеотидов с применением различных реагентов-модификаторов в виде азидо-триазинов в рамках основного подхода, основанного на реакции Штаудингера.

2. Определить границы применимости разработанных методов при получении триазиламидофосфатных олигонуклеотидных производных, несущих различные заместители.

3. Изучить как фундаментальные свойства самого класса триазиламидофосфатных олигонуклеотидов, так и влияние заместителей в составе триазинового остова на свойства отдельных представителей исследуемого класса.

Научная новизна представляемой работы заключается в фундаментальном развитии подхода к получению ТАО, основанного на реакции Штаудингера с применением различных 2-азидо-1,3,5-триазинов в качестве реагентов-модификаторов. Показано, что с использованием 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина возможно гибкое варьирование заместителей в составе триазинового остова модификации с получением ТАО различного нуклеотидного состава, несущих гидрофобные и катионные функциональные группы или их комбинации, заместители с остатками аминов и спиртов, а также заместители сложной структуры, полученные путем поэтапной сборки на твердофазном носителе. В работе установлена ключевая роль отдельной стадии β -элиминирования 2-цианоэтильной группы при триазиламидофосфатной модификации. Дополнительно предложено несколько новых вариантов азидо-триазинов, позволяющих получать ТАО с эффективностью вплоть до 95%. Для ряда реагентов-модификаторов типа 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов показана возможность введения в том числе и нескольких модификаций в состав олигонуклеотидов в автоматизированном варианте. При изучении свойств ТАО впервые продемонстрированы стабильность триазиламидофосфатной группы в сильноокислых условиях, ее незначительное влияние на термодинамическую стабильность ДНК-ДНК дуплексов, устойчивость олигонуклеотидов к нуклеазному расщеплению при обработке цельноклеточными экстрактами. Для додецил-содержащих ТАО продемонстрирована способность к образованию мицеллоподобных структур, а также высокая эффективность внутриклеточного проникновения.

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

Положения, выносимые на защиту

1. В рамках основного подхода к получению триазиламидофосфатных олигонуклеотидов, основанного на реакции Штаудингера, предложено 4 новых типа реагентов-модификаторов в виде 4,6-замещенных 2-азидо-1,3,5-триазинов, для каждого из которых определена реакционная способность.

2. Включение в синтетическую схему получения триазиламидофосфатных производных отдельной стадии β -элиминирования 2-цианоэтильной защитной группы способно повысить выходы получаемых олигонуклеотидов в 1,5 – 2 раза.

3. Применение реагента-модификатора в виде 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина с использованием оптимизированных условий позволяет вводить триазиламидофосфатное звено в состав олигонуклеотидного остова с возможностью широкой вариации функциональных групп и с эффективностью вплоть до 95%.

4. С использованием различных 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов возможно получение триазиламидофосфатных производных, несущих две разных функциональных группы в составе одного триазинового остова, а также автоматизированное введение до четырех триазиламидофосфатных модификаций в состав олигонуклеотида.

5. P-N связь в составе триазиламидофосфатной группы стабильна в кислых условиях.

6. Наличие триазиламидофосфатной группы минимально дестабилизирует ДНК-ДНК дуплекс.

7. Додецил-содержащие триазиламидофосфатные олигонуклеотиды способны образовывать мицеллоподобные структуры, эффективно накапливаются в клетках, обладают повышенной устойчивостью к действию нуклеаз при обработке цельноклеточными экстрактами, и проявляют низкую цитотоксичность.

Вклад автора. Автором работы синтезированы все азиды-модификаторы и триазиламидофосфатные олигонуклеотидные производные, проведены электрофоретический и хроматографический анализы олигонуклеотидов, исследование и характеристика додецил-содержащих триазиламидофосфатных олигонуклеотидов методом динамического светорассеяния, зарегистрированы и проанализированы ^{31}P ЯМР спектры модифицированных динуклеотидов. Также автором принято непосредственное участие в интерпретации результатов работы, полученных другими методами. Спектры ИК, ^1H ЯМР и ^{13}C ЯМР азидов-модификаторов зарегистрированы в ЦКП при НИОХ СО РАН. Масс-спектры MALDI-TOF и ESI-MS олигонуклеотидов зарегистрированы сотрудником ОЦКП ЦМСА ИХБФМ СО РАН Олейник Г.А. (зав. ОЦКП – д.х.н., Чернонос А.А.). Термическая денатурация с оптической регистрацией сигнала дуплексов олигонуклеотидов проведена сотрудниками ЛСТБ ИХБФМ СО РАН, к.ф.-м.н. Гольшевым В.М. и к.ф.-м.н., зав. ЛСТБ Ломзовым А.А. Результаты цитофлуорометрии для додецил-содержащих олигонуклеотидов получены сотрудником ЛБНК

ИХБФМ СО РАН, к.б.н. Марковым О.В. (зав. лаб. – чл.-корр. РАН, д.б.н. Зенкова М.А.). Эксперименты по определению цитотоксичности олигонуклеотидов и их устойчивости к действию нуклеаз цельноклеточных экстрактов проведены сотрудником ЛБХФ ИХБФМ СО РАН, к.х.н. Ильиной Е.С. (зав. лаб. – академик РАН, д.х.н. Лаврик О.И.).

Апробация и публикации результатов. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, а также получен патент на изобретение в РФ. Результаты, представленные в работе, апробированы на 7 конференциях всероссийского и международного уровней в форме устных и стендовых докладов: Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Химия и химическая технология в XXI веке» (2022, г. Томск), Всероссийская конференция «Синтетическая биология и биофармацевтика» (2022, г. Новосибирск), Молодежная научная школа-конференция «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты» (2023, г. Казань), Молодежная школа-конференция «BioTop-2023. Достижения молодых ученых ИХБФМ СО РАН» (2023, г. Новосибирск), Молодежная школа-конференция «Современные вызовы структурной и синтетической биологии» (2024, п. Шерегеш), V Всероссийская конференция «Физико-химическая биология» (2024, г. Новосибирск), II школа молодых ученых «Современные вызовы молекулярной биологии» (2025, п. Шерегеш).

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждений, выводов, списка литературы. Работа изложена на 152 страницах, содержит 59 рисунков и 5 таблиц. Работа содержит 6 приложений, в каждом приложении представлено по 1 рисунку. Библиография включает 177 литературных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

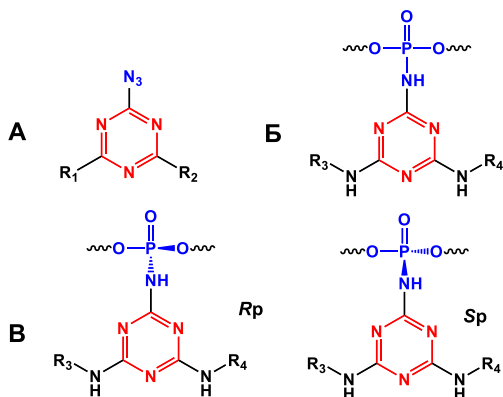
1. Выбор подхода к модификации олигонуклеотидов и общей структуры реагентов-модификаторов

Одним из удобных положений для введения модификаций в состав олигонуклеотида с точки зрения возможности его гибкой функционализации является межнуклеотидная фосфатная группа. Наиболее эффективный способ введения модификаций в состав межнуклеотидных фосфатных групп основан на альтернативном окислении фосфит-триэфирного звена в ходе олигонуклеотидного синтеза. Среди всех типов фосфат-модифицированных олигонуклеотидов, амидофосфатные производные представлены самым широким набором классов и их представителей. Это связано с особенностями подходов к их получению, подразумевающих использование окисляющих реагентов, уже содержащих желаемые функциональные группы или же промежуточные группы с возможностью переменного введения функциональных групп. Одним из основных современных подходов к получению различных амидофосфатных производных можно назвать реакцию

Штаудингера [Zhukov S.A. et al., 2021; Santorelli A. et al., 2022]. Популярность данного подхода обусловлена прежде всего эффективностью реакции Штаудингера при использовании электрондефицитных органических азидов в качестве окисляющих реагентов.

В данной работе в качестве реагентов-модификаторов были выбраны различные 2-азидо-1,3,5-триазины (Рис. 1 А). Структура 1,3,5-триазина подразумевает возможность введения сразу двух функциональных групп в рамках одной модификации с возможностью их варьирования при рациональном дизайне конкретных 2-азидо-1,3,5-триазинов, что указывает на потенциальную гибкость разрабатываемого подхода. После проведения реакции Штаудингера и введения в триазиновый остов необходимых функциональных групп в виде остатков алкиламинов, представленных широким кругом коммерчески доступных реагентов, образуется электронейтральная триазиниламидофосфатная группа (Рис. 1 Б). Стоит отметить, что в конечной структуре олигонуклеотида триазиниламидофосфатная группа представлена в виде смеси двух оптических *Rp*- и *Sp*-стереоизомеров (Рис. 1 В), образование которых характерно при получении фосфат-модифицированных олигонуклеотидов.

Рис. 1. А – Общее строение реагентов-модификаторов в виде 2-азидо-1,3,5-триазинов. Б – Общая структура триазиниламидофосфатного звена в составе олигонуклеотида. В – Строение *Rp*- и *Sp*-стереоизомеров триазиниламидофосфатной группы. -R₁, -R₂ – промежуточные заместители или -NHR₃, -NHR₄; -R₃, -R₄ – функциональные заместители.



В данной работе было проведено систематическое изучение класса триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов (ТАО;

олигонуклеотид, содержащий как минимум одну триазиниламидофосфатную модификацию) с точки зрения их получения с применением различных азидо-триазинов, а также были исследованы некоторые их базовые свойства, и некоторые свойства отдельных представителей класса.

2. Пути получения азидо-триазинов и триазиниламидофосфатных групп

В качестве исходного соединения для получения всех азидо-триазинов был использован 2,4,6-трихлоро-1,3,5-триазин (цианурхлорид, Рис. 2, соединение I). Самым простым вариантом азидо-триазина, который может быть получен из цианурхлорида всего в одну стадию путем взаимодействия с азидом натрия, является 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазин (Рис. 2, путь 1, соединение II). Несмотря на простоту синтетической схемы, при получении данного реагента необходимо соблюдать строгие температурные условия реакции для

минимизации количества побочных продуктов избыточного замещения атомов хлора на азидо-группы, образование которых обусловлено кинетическими закономерностями нуклеофильного замещения в триазиновом остове [Blotny G., 2006].

Вторым основным вариантом структуры азидо-триазинов являются различные 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазины (Рис. 2, соединение III). В данной работе была разработана следующая схема получения таких реагентов – изначально был получен 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазин, атомы хлора которого далее были замещены на целевые остатки аминов (Рис. 2, путь 2). По предложенной схеме были получены азидо-триазины, содержащие остатки метиламина и бутиламина.

Третьим вариантом структур азидо-триазинов являются 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазины (Рис. 2, соединение IV). Для получения данных реагентов-модификаторов была разработана схема синтеза, обеспечивающая контролируемое введение заместителей. На первом этапе разработанной схемы один атом хлора в цианурхлориде был селективно замещен на целевой остаток амина, после чего азидо-группа при замещении второго атома хлора была введена количественно (Рис. 2, путь 3). Ранее в лаборатории по предложенной схеме был синтезирован азидо-триазин, несущий липофильный остаток додециламина. В данной работе были дополнительно синтезированы подобные азидо-триазины, содержащие в триазиновом остове остатки аммиака, метиламина, бутиламина, морфолина, олеиламина и (N-метил-N-октадецил)амина.

Вышеперечисленные варианты структур азидо-триазинов выступали в качестве основных реагентов-модификаторов; комбинаторика заместителей в составе азидо-триазинов в виде атомов хлора и алкиламиногрупп основана на коммерческой доступности цианурхлорида в качестве исходного соединения, и на необходимости введения остатков аминов в финальную структуру триазиламидофосфатной группы. В качестве дополнительных вариантов азидо-триазинов с другими типами заместителей были получены 2-азидо-4,6-диiodo-1,3,5-триазин (Рис. 2, соединение V) и 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазин (Рис. 2, соединение VI). Синтез иод-содержащего азидо-триазина был осуществлен в две стадии – первоначально из цианурхлорида при обработке иодидом калия был получен циануриодид, в котором далее один атом иода селективно замещался на азидо-группу (Рис. 2, путь 4). При получении 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина была использована схема, аналогичная синтезу азидо-триазинов, содержащих две алкиламиногруппы – в состав 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина были введены метокси-группы при обработке соединения избытком метанола (Рис. 4, путь 5).

Все из указанных выше азидов были очищены и охарактеризованы методами ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР и ИК-спектроскопии, что позволило четко установить структуру получаемых соединений.

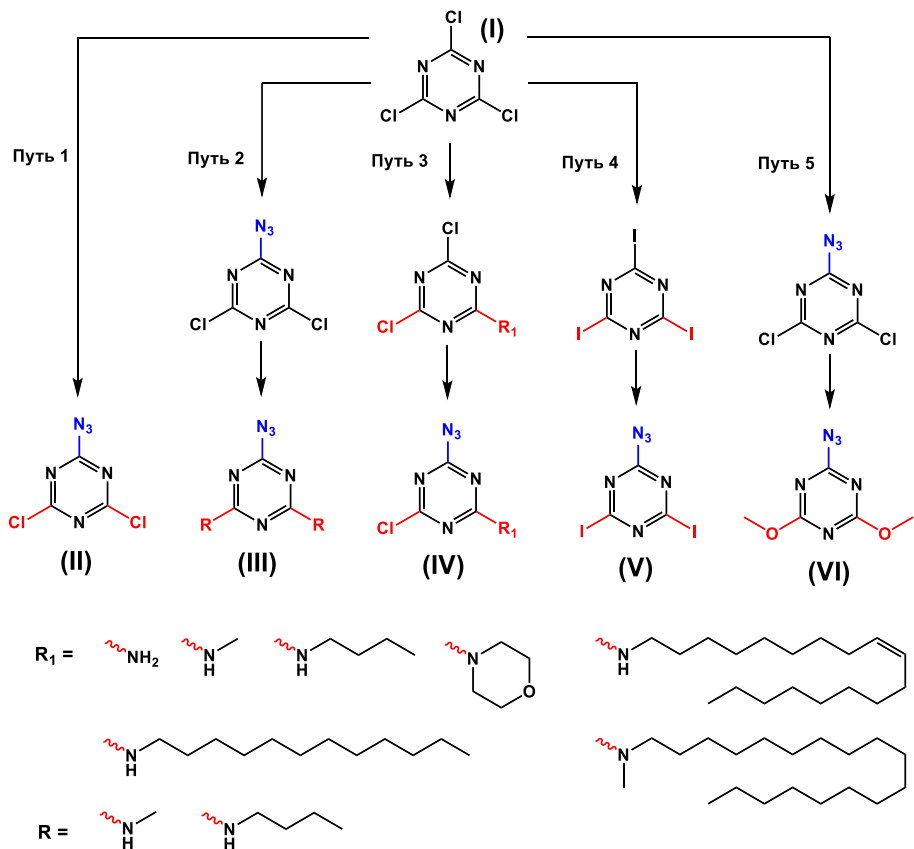


Рис. 2. Структура исходного соединения для получения азидо-триазинов в виде цианурхлорида (I), а также пути получения и структуры реагентов-модификаторов в виде 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (путь 1, соединение II), 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазина (путь 2, соединение III), 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина (путь 3, соединение IV), 2-азидо-4,6-диiodo-1,3,5-триазина (путь 4, соединение V), 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина (путь 5, соединение VI). Снизу указаны заместители в составе конкретных реагентов-модификаторов типа 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазинов (R) и 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов (R_1).

При использовании азидо-триазинов разных типов, пути получения триазиниламидофосфатной группы будут несколько отличаться. Так, например, при получении триазиниламидофосфатной группы с использованием 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина на первом этапе после проведения реакции Штаудингера образуется хлор-содержащий интермедиат, в состав которого далее вводят остатки алкиламинов (Рис. 3, путь 1, X = -Cl). Аналогично при использовании 2-азидо-4,6-диiodo-1,3,5-триазина и 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина для получения триазиниламидофосфатов образуются соответствующие интермедиаты, в составе которых атомы иода и метокси-группы впоследствии замещаются на алкиламиногруппы (Рис. 3, путь 1, X = -I, -OMe). Реагенты типа 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазинов уже содержат

в своем составе необходимые заместители, поэтому получение триазиламидофосфатной группы с их использованием протекает всего в одну стадию (Рис. 3, путь 2). Введение в состав олигонуклеотида реагентов в виде 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов подразумевает замещение второго атома хлора в триазиновом остова с получением в том числе и несимметрично замещенных триазиламидофосфатных групп, несущих две разные функциональные группы (Рис. 3, путь 3).

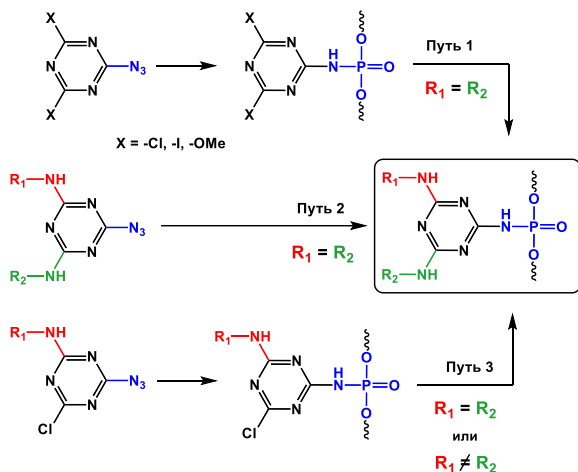


Рис. 3. Пути получения триазиламидофосфатных групп в составе олигонуклеотидов, несущих два остатка алкиламина, с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, 2-азидо-4,6-диокси-1,3,5-триазина, и 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина (путь 1, X = -Cl, -I, -OMe соответственно), 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазина (путь 2), 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина (путь 3). R₁, R₂ – функциональные заместители.

3. Оценка эффективности получения ТАО с применением различных 2-азидо-1,3,5-триазинов

3.1. Реакционная способность 2-азидо-1,3,5-триазинов

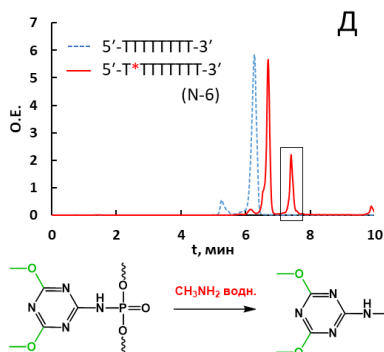
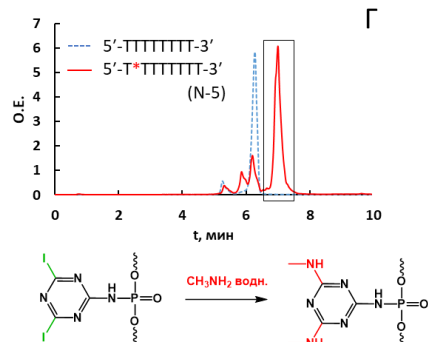
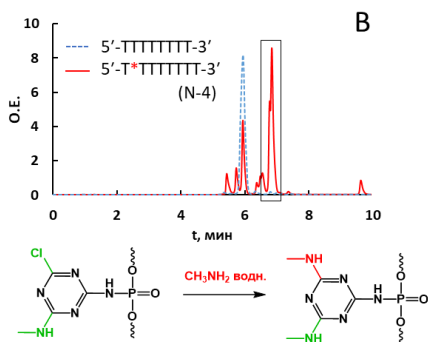
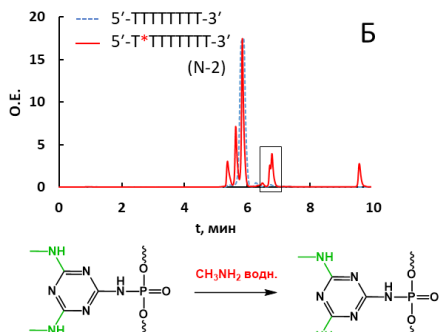
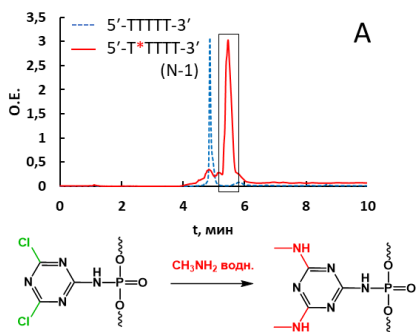
Для валидации предложенных схем и сравнительной оценки реакционной способности используемых азидо-триазинов были проведены модельные эксперименты с получением олиготимидилатов, несущих по ближайшему к 5'-концу простейшую триазиламидофосфатную группу с двумя остатками метиламина в триазиновом остова.

Первоначально была проверена реакционная способность 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина. Ранее в лаборатории было обнаружено, что данный реагент-модификатор может быть введен в состав олигонуклеотида практически количественно в очень мягких условиях (0.1M концентрация азиды, 15 минут, 25°C). В данной работе высокая эффективность модификации олигонуклеотида 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином была подтверждена на пентатимидилатной системе (5'-Т*ТТТТ-3', где * – место введения модификации). По результатам ОФ ВЭЖХ анализа реакционной смеси олигонуклеотида видно, что конверсия в целевой продукт составляет порядка 90% (Рис. 4 А; олигонуклеотид N-1); замещение атомов хлора в триазиновом остова на остатки метиламина в данном случае происходит в процессе

деблокирования олигонуклеотида с твердофазного носителя. Такая высокая реакционная способность реагента связана с его акцепторным характером.

Для прямого сравнения реакционной способности азидо-триазинов, другие типы реагентов-модификаторов были введены в состав олигонуклеотидов в идентичных условиях (0.1М концентрация азиды, 15 минут, 25°C). Так, конверсия в целевой продукт при введении 2-азидо-4,6-диметиламино-1,3,5-триазина в состав октатимидилата (5'-T*TTTTTTT-3') в данных условиях не превышает 15% (Рис. 4 Б; олигонуклеотид N-2). Такое падение выходов целевого продукта может быть объяснено донорной природой остатков метиламина, входящих в состав азидо-триазина. 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазин обладает промежуточной реакционной способностью, что связано с наличием как донорного остатка метиламина, так и акцепторного атома хлора в триазиновом остове реагента-модификатора. В данном случае конверсия в целевой продукт в приведенных условиях после замещения атома хлора на остаток метиламина в ходе финального деблокирования составила около 50% (Рис. 4 В; олигонуклеотид N-4). При оценке реакционной способности 2-азидо-4,6-диiodo-1,3,5-триазина ожидалось падение выходов целевого продукта, что связано с менее акцепторным характером атомов иода по сравнению с атомами хлора. Тем не менее, при использовании данного реагента конверсия в целевой продукт после замещения атомов иода на остатки метиламина снизилась незначительно и составила около 85% (Рис. 4 Г; олигонуклеотид N-5). При введении в состав олигонуклеотида 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина, конверсия в целевой продукт составила 15% (Рис. 4 Д; олигонуклеотид N-6). Наличие донорных остатков метанола в состав азидо-триазина значительно снижает его реакционную способность, что согласуется с предыдущими данными. Интересно отметить, что в условиях деблокирования олигонуклеотида с твердофазного носителя замещения метоксигрупп в триазиновом остове на остатки метиламина не происходит, что было подтверждено масс-спектрометрическим анализом.

Полученные данные об эффективности введения различных типов азидо-триазинов в состав олигонуклеотидов в зависимости от типов заместителей при триазиновом остове суммированы на Рис. 4 Е. Результаты свидетельствуют о четкой зависимости степени протекания реакции Штаудингера от донорно-акцепторных свойств заместителей в триазиновом ядре используемых реагентов-модификаторов.



Код	Заместители в триазиновом остове азидо-триазина	Конверсия по ОФ ВЭЖХ
N-1	2 × (-Cl)	>95%
N-2	2 × (-NHCH ₃)	10%
N-4	1 × (-Cl), 1 × (-NHCH ₃)	50%
N-5	2 × (-I)	85%
N-6	2 × (-OCH ₃)	15%

Условия реакции Штаудингера: 0.1M концентрация азидо-триазина, 15 минут, 25°C

Рис. 4. Профили ОФ ВЭЖХ реакционной смеси контрольных олиготимидилатов и олиготимидилатов после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином (А, олигонуклеотид N-1), 2-азидо-4,6-диметиламино-1,3,5-триазином (Б, олигонуклеотид N-2), 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазином (В, олигонуклеотид N-4), 2-азидо-4,6-диiodo-1,3,5-триазином (Г, олигонуклеотид N-5), 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазином (Д, олигонуклеотид N-6) и введения остатков метиламина в ходе финального деблокирования; Е – суммированные данные об эффективности введения различных типов азидо-триазинов в состав олигонуклеотидов. Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-90% (N-1) или 0-45% (N-2, N-4, N-5, N-6) ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02M водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм.

3.2. Влияние этапа β -элиминирования на эффективность получения ТАО

При получении ТАО после протекания реакции Штаудингера первоначально образуется лабильный фосфазеновый интермедиат, который в ходе финального деблокирования олигонуклеотида может либо гидролизироваться до фосфатной группы и амина, либо переходить в стабильную амидофосфатную форму в результате β -элиминирования цианоэтильной защитной группы (Рис. 5 А). На примере некоторых азидо-триазинов была показана возможность повышения эффективности введения модификации при включении в синтетическую схему получения ТАО отдельного этапа β -элиминирования после протекания реакции Штаудингера и до отщепления олигонуклеотида от твердофазного носителя. Наиболее контрастно данный эффект проявляется при использовании 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина. Так, конверсия в целевой продукт при получении ТАО без отдельной стадии β -элиминирования составляет около 40% (Рис. 5 Б, олигонуклеотид N-9), в то время как проведение этой стадии увеличивает конверсию более чем в два раза – до 85% (Рис. 5 Б, олигонуклеотид N-5).

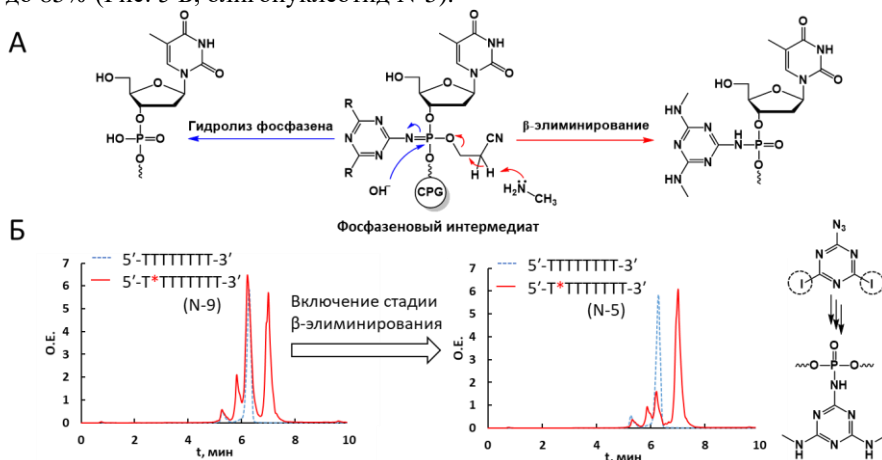


Рис. 5. А – Возможные пути преобразования триазирилфосфазенового ядра в ходе финального деблокирования олигонуклеотида. Б – Влияние этапа β -элиминирования на эффективность получения ТАО с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина. Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-45% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе TEA*AcOH, $\lambda = 260$ нм.

4. Разнообразие функциональных групп в составе ТАО

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

Возможность получения широкого разнообразия представителей класса ТАО с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина основана на использовании так называемой прекурсорной стратегии. После проведения реакции Штаудингера и дальнейшего β -элиминирования образуется промежуточное соединение в форме амидофосфата, содержащее атомы хлора в триазиновом остове. Данный интермедиат является прекурсором для всех ТАО

– путем варьирования раствора амина на последующей стадии замещения атомов хлора возможно введение различных функциональных остатков (Табл. 1, рисунок сверху). По данной схеме был получен широкий набор ТАО, несущих, например, гидрофобные и катионные заместители, остатки диаминов и аминокспиртов, а также ароматические группы (Табл. 1, рисунок снизу). Некоторые примеры синтезированных ТАО, эффективность их получения по данным ОФ ВЭЖХ, а также данные масс-спектрометрического анализа реакционных смесей, подтверждающие наличие в них олигонуклеотидов целевой массы, приведены в Табл. 1. С применением данного подхода также была показана возможность эффективного получения ТАО гетеронуклеотидного состава (Табл. 1, производное N-56).

Табл. 1. Последовательности, конверсии в целевые продукты и результаты масс-спектрометрического анализа реакционных смесей синтезированных ТАО. Рисунок сверху – общая схема прекурсорной стратегии при получении ТАО. Рисунок снизу – структуры триазиныламинодофосфатного звена некоторых полученных ТАО.

Код	Последовательность (5'→3')	Конверсия, %	М (теор.)	М (эксп.)
N-16	T*TTTT	~70	1902.7	1902.6
N-17	T*TTTT	~90	1903.8	1902.6
N-19	T*TTTT	~80	2066.9	2066.6
N-21	T*TTTTTTTT	>95	3262.7	3262.8
N-23	T*TTTTTTTT	>95	3202.6	3203.6
N-26	T*TTTTTTTT	~90	3344.8	3345.0
N-27	T*TTTT	>95	2040.5	2040.6
N-30	T*TTTTTTTT	>95	3224.7	3225.6
N-31	T*TTTTTTTT	~70	2630.5	2631.0
N-56	G*CGCCAAACAT	~90	3446.4	3445.5

N* N =

R:

N - нуклеозид
B - азотистое основание

Помимо одностадийного введения алкиламиногрупп в триазиновый остов модификации, была показана возможность получения более сложных

структур заместителей. Для этого была реализована стратегия поэтапной сборки на твердофазном носителе – после введения в триазиновый остов остатков диаминов или аминоспиртов, иммобилизованный олигонуклеотид последовательно обрабатывали различными растворами с постепенным наращиванием цепи заместителя. Характерные примеры сборки приведены на рисунке при Табл. 2. Так, например, к остаткам пиперазина в составе триазинового остова (Табл. 2, рисунок, соединение I) был присоединен остаток цианурхлорида с дальнейшим замещением атомов хлора на остатки метиламина или бутиламина (N-33, N-34). Первичные аминогруппы в составе остатков трис-(2-аминоэтил)амина, присоединенных к триазиновому остову (Табл. 2, рисунок, соединение II), были модифицированы в том числе уксусным ангидридом с получением ацетамида (N-38). К спиртовым гидроксильным группам 3-аминопропанола-1 (Табл. 2, рисунок, соединение III) были присоединены, например, тимидилатные звенья после проведения одного цикла автоматического синтеза (N-41). Последовательности полученных производных, а также результаты ESI-MS масс-спектрометрии реакционных смесей ТАО представлены в Табл. 2.

Табл. 2. Последовательности и результаты масс-спектрометрического анализа некоторых реакционных смесей ТАО, содержащих заместители, полученные путем поэтапной сборки. Рисунок снизу – примеры поэтапной сборки заместителей в триазиновом остове ТАО.

Код	Последовательность (5'→3')	М (теор.)	М (эксп.)
N-33	5'-T*TTTTTTTT-3'	3498.8	3498.9
N-34	5'-T*TTTTTTTT-3'	3667.0	3667.8
N-38	5'-T*TTTT-3'	1992.6	1992.4
N-41	5'-TT(T) ₂ *TTTTT-3'	3202.6	3203.6

R = (I) → → (N-33) (N-34)

R = (II) → (N-38)

R = (III) → (N-41)

$R_1 = -CH_3$ (N-33)
 $R_1 = -C_4H_9$ (N-34)

4.2. Получение функционализированных ТАО с применением 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов

С использованием 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов также возможно получение функционализированных олигонуклеотидов, причем атом хлора в триазиновом кольце может быть замещен на произвольный остаток алкиламина, что позволяет получать несимметрично замещенные ТАО

с различными функциональными группами (Рис. 6 А). На примере серии 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов были получены ТАО, содержащие гидрофобные остатки додециламина, олеиламина и (N-метил-N-октадецил)амина (Рис. 6 Б, производные N-44, N-45, N-46), а также ТАО, несущий комбинацию остатков гидрофобного додециламина и положительно заряженного (N,N-диметиламинопропил)амина (Рис. 6 Б, производное N-47). Для проведения реакции Штаудингера были выбраны довольно мягкие условия: 0.1M концентрация азида, 2 часа, 25°C. По результатам ОФ ВЭЖХ анализа, конверсия в целевой продукт в данных условиях составляет порядка 80% для додецил-содержащего олигонуклеотида (N-44) и порядка 60% для производных с остатками олеиламина и (N-метил-N-октадецил)амина (N-45, N-46) (Рис. 6 Б). Такая разница в выходах может быть объяснена стерическими эффектами протяженных заместителей в составе соответствующих азидо-триазинов. При этом второй заместитель может быть количественно введен в триазиновый остов с получением бифункционализированных несимметрично замещенных ТАО (Рис. 6 Б, N-47).

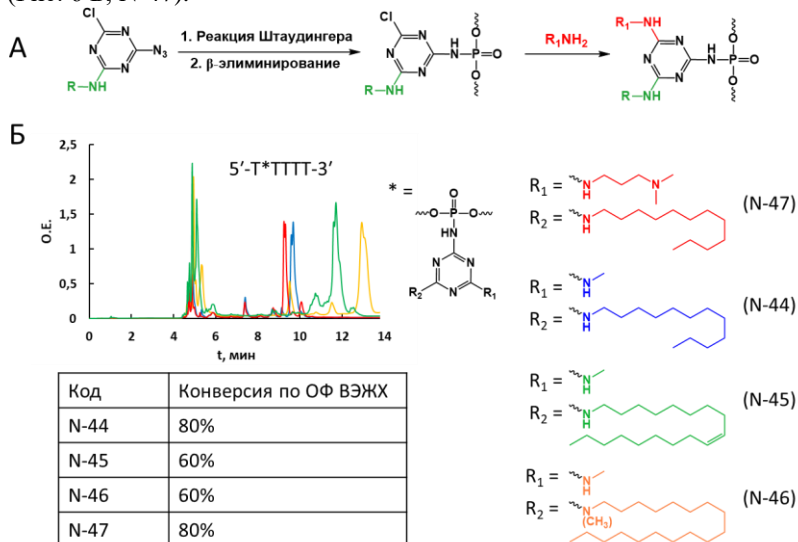


Рис. 6. А – Общая схема получения несимметрично замещенных ТАО с использованием 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов. Б – Профили ОФ ВЭЖХ реакционных смесей ТАО, содержащих в триазиновом остове остатки додециламина и метиламина (N-44), олеиламина и метиламина (N-45), (N-метил-N-октадецил)амина и метиламина (N-46), додециламина и (N,N-диметиламинопропил)амина (N-47). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-90% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02M водном растворе ТЕА*AcOH, $\lambda = 260$ нм.

5. Автоматизированное получение ТАО

Возможность эффективного автоматического синтеза ТАО была продемонстрирована на примере реагентов-модификаторов промежуточной реакционной способности в виде 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов, несущих компактные остатки алкиламинов. При введении

модификации в октатимидилат состава 5'-TTTTTTT*T-3' в выбранных условиях реакции Штаудингера (0.25M раствор азида, этап окисления – 2 часа) наиболее удовлетворительных результатов удалось достичь при использовании 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина – в данном случае конверсия в целевой продукт по результатам ВЭЖХ составила более 95% (олигонуклеотид N-51, Рис. 7). С использованием данного азидо-триазина также была показана возможность множественного введения триазиламидофосфатных модификаций в автоматическом режиме в состав олигонуклеотида. Так, были получены ТАО, содержащие от 2 до 4 последовательно введенных модификаций со стороны 3'-конца (олигонуклеотиды N-52, N-53, N-54). Анализ ВЭЖХ реакционных смесей показал, что введение двух модификаций подряд протекает количественно, однако с последующим увеличением количества модификаций выходы целевых продуктов падают до 80% для трех, и до 60% для четырех модификаций соответственно (Рис. 7, N-53, N-54). Вероятно, такое падение выходов связано со стерическими эффектами объемных триазиновых групп. Электрофоретический анализ очищенных олигонуклеотидов N-51 – N-54 показал характерное уменьшение подвижности производных равными интервалами при увеличении числа электронеЙтральных модификаций (Рис. 7).

Рис. 7. Профили ОФ ВЭЖХ реакционных смесей ТАО, содержащих одну (N-51), две (N-52), три (N-53) и четыре (N-54) модификации, введенные в автоматическом режиме с использованием 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина (слева) и электрофоретический профиль выделенных олигонуклеотидов N-51 – N-54 (справа). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-45% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02M водном растворе TEA*AcOH, $\lambda = 260$ нм.

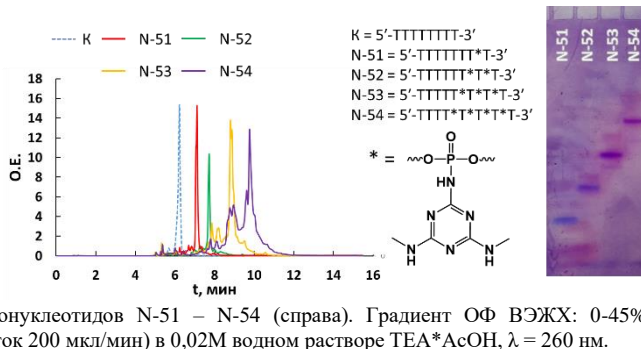
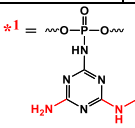
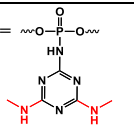
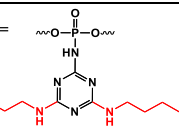


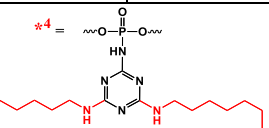
Табл. 3. Значения температур плавления (T_m) и разницы температур плавления по сравнению с немодифицированным комплексом (ΔT_m) для дуплексов ТАО состава 5'-GCGCCAAACA*Т-3' и 5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTAT*Т-3' (комплементарные цепи – нативные). ^a – буфер 1 М NaCl и 10 мМ (CH₃)₂AsO₂Na (какодилат натрия), концентрация каждой из цепей дуплекса – 5·10⁻⁶ М; ^b – буфер PBS×1, концентрация каждой из цепей дуплекса – 2,5·10⁻⁶ М.

Код	Олигонуклеотид	T_m , °C ^a	ΔT_m , °C ^a
К	5'-GCGCCAAACAT-3'	66,0	0,0
М-А1	5'-GCGCCAAACA* ¹ Т-3'	65,1	-0,9
М-М1	5'-GCGCCAAACA* ² Т-3'	64,6	-1,4
Код	Олигонуклеотид	T_m , °C ^b	ΔT_m , °C ^b
К1	5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTATT-3'	50,0	0,0
ТВ1	5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTAT* ³ Т-3'	49,6	-0,4
ТД1	5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTAT* ⁴ Т-3'	49,2	-0,8

*1 = 

*2 = 

*3 = 

*4 = 

Как видно из приведенных данных, триазиновый остов модификации в составе олигонуклеотида незначительно понижает температуру плавления дуплекса (1–1,5°C в буфере 1 М NaCl и 10 мМ какодилат натрия; олигонуклеотиды М-А1 и М-М1, Табл. 3). Вероятно, снижение стабильности модифицированного дуплекса по сравнению с нативным связано с искажением сольватной оболочки комплекса в растворах с повышенной ионной силой, что характерно для электронейтральных фосфатных модификаций [Golyshev V. M. et al., 2021]. Степень дестабилизации дуплекса практически не зависит от объема заместителей в составе триазиламидофосфатной модификации (0,5–1°C в буфере 1 × PBS; олигонуклеотиды ТВ1 и ТД1, Табл. 3), что указывает на общий характер данного свойства для класса ТАО.

6.2. Химическая стабильность триазиламидофосфатной группы

Стабильность триазиламидофосфатной группы в кислой среде была определена на примере ТАО, содержащего два бутильных остатка при триазиновом остове. Синтезированные декатимидилаты состава 5'-Т*ТТТТТТТТТТ-3', содержащие триазиламидофосфатную группу (М-В) и кислотолабильную бензиламидофосфатную модификацию (Вz) были обработаны 0.1М соляной кислотой в течение разных промежутков времени (от 30 минут до 13 часов). Исходя из результатов ВЭЖХ анализа с оценкой количества оставшегося модифицированного олигонуклеотида был построен график времязависимой деградации (Рис. 8 А). Было обнаружено, что бензиламидофосфатная группа в составе соответствующего олигонуклеотида практически полностью гидролизуеться в конечной точке эксперимента (780 минут), при этом триазиламидофосфатная модификация остается

стабильной. Кислотная стабильность Р-Н связи в составе триазиламидофосфатной модификации обусловлена, вероятно, сопряжением неподеленной пары азота с ароматической системой триазина, а также акцепторным характером триазинового остова модификации, показанного методом ^{31}P -ЯМР спектроскопии модифицированного динуклеотида (Рис. 8 Б). Такая зависимость характера остова амидофосфатной модификации с кислотной стабильностью коррелирует с ранее полученными данными для других классов, в частности сульфонамидофосфатных, алкиламидофосфатных и фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов (Рис. 8 Б).

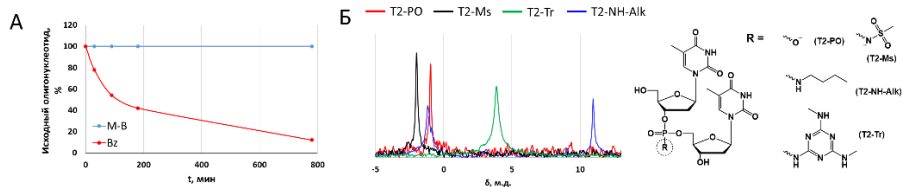


Рис. 8. А – Устойчивость триазиламидофосфатной и бензиламидофосфатной модификаций в кислой среде. Процентное содержание исходного олигонуклеотида было определено методом ОФ ВЭЖХ. Б – Фрагменты спектров ^{31}P -ЯМР дитимидилатов, содержащих сульфонамидофосфатную, алкиламидофосфатную, триазиламидофосфатную модификации, и нативного дитимидилата.

7. Додecil-содержащие ТАО

Среди всех полученных представителей класса ТАО наибольший интерес представляют додецил-содержащие производные, что обусловлено потенциальной возможностью их использования в качестве самопроникающих в клетки НК-конструкций и дальнейшего изучения их биологических свойств. На примере некоторых додецил-содержащих ТАО были детально исследованы их характерные свойства.

7.1. Мицеллообразование в растворе додецил-содержащих ТАО

Одним из свойств олигонуклеотидов, несущих гидрофобные группы, является возможность самосборки в мицеллоподобные структуры. В данной работе возможность образования мицеллоподобных структур для додецил-содержащих ТАО была показана на примере производного TD2 состава 5'-[FAM]-AGTCTCGACTTGCTAT*T-3' ([FAM] – остаток 6-карбоксихлорофлуоресцеина; Рис. 9) с применением метода динамического светорассеяния (ДСР). Полученные данные ДСР-анализа после 10 измерений 5 мкМ раствора олигонуклеотида TD2 в среде DMEM в течение 4 часов с равным временным интервалом в виде усредненных значений распределения по размеру частиц в зависимости от числа зарегистрированных сигналов представлены на Рис. 9. Из полученных данных видно, что производное TD2 образует стабильные частицы со средним гидродинамическим диаметром около 10 нм, что согласуется с литературными данными по схожим олигонуклеотидным системам [Bauer I. A. et al. 2023].

TD2 5'-[FAM]-AGTCTCGACTTGCTAT*Т-3'

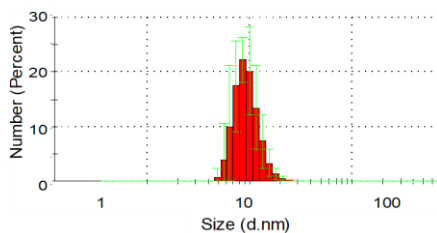
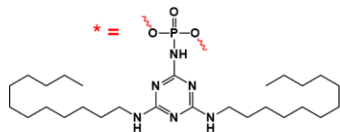


Рис. 9. Графики зависимости распределения значений размера частиц от числа измерений для додецил-содержащего ТАО в виде 5 мкМ раствора в DMEM-среде после 10 измерений в течение 4 часов. Ось X – размер частиц, нм; ось Y – число измерений, проценты. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

7.2. Проникновение додецил-содержащих ТАО в клетки

Эффективность внутриклеточного накопления додецил-содержащих ТАО была продемонстрирована на примере олигонуклеотида TD1 состава 5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTAT*Т-3'. После трансфекции клеток линии НЕК293Т олигонуклеотидом TD1 в концентрации 5 мкМ в течение 4 часов и дальнейшего цитофлуорометрического анализа было обнаружено, что производное TD1 накапливается в клетках с высокой эффективностью – флуоресцентный сигнал детектируется для 100% клеток, а интенсивность флуоресценции практически на два порядка превышает таковую для контрольного олигонуклеотида К (Рис 10). Более того, эффективность проникновения производного TD1 сопоставима с доставкой олигонуклеотида К коммерчески доступным трансфектантом «Lipofectamine2000» (LF/K). Сравнение степени накопления олигонуклеотида TD1 с его аналогом, содержащим в триазиновом остове бутильные остатки (TB1), также показало значительное преимущество додецил-содержащего ТАО (Рис. 10). Вероятно, высокая эффективность проникновения додецил-содержащего ТАО связана с возможностью образования им мицеллоподобных структур (см. п. 7.1).

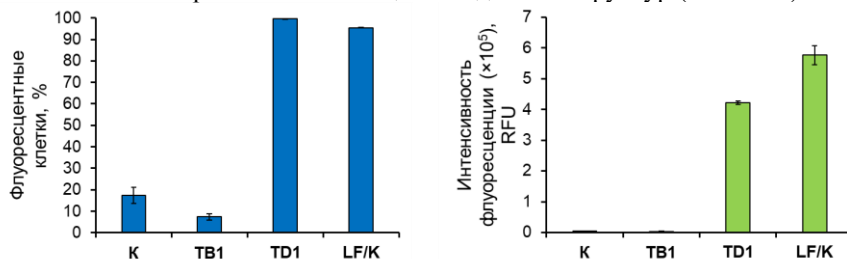


Рис. 10. Процент флуоресцентных клеток (слева) и интенсивность флуоресценции (справа) при трансфекции клеток линии НЕК293Т ТАО последовательности 5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTAT*Т-3', содержащими остатки бутиламина (TB1) или додециламина (TD1), а также нативным контрольным олигонуклеотидом (К) и его комплексом с трансфецирующим агентом «Lipofectamine2000» (LF/K). Концентрация олигонуклеотидов – 5 мкМ. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

7.3. Цитотоксичность и ферментативная устойчивость додецил-содержащих ТАО

На примере производного TD1 дополнительно была продемонстрирована ферментативная устойчивость и низкая цитотоксичность додецил-содержащих ТАО. Так, при обработке олигонуклеотида, нуклеазами цельноклеточных экстрактов клеточных линий HEK293T и T98G в течение 15 минут образуется лишь небольшое количество продуктов деградации, в то время как нативный олигонуклеотид К в тех же условиях полностью гидролизуется (Рис. 11 А). При анализе цитотоксичности олигонуклеотида было обнаружено, что концентрация полувывживаемости клеток HEK293T ($IC_{50} = 201.8$ мкМ) в несколько раз превышает рабочие концентрации олигонуклеотидов при оценке биологических свойств (1–5 мкМ) (Рис. 11 Б).

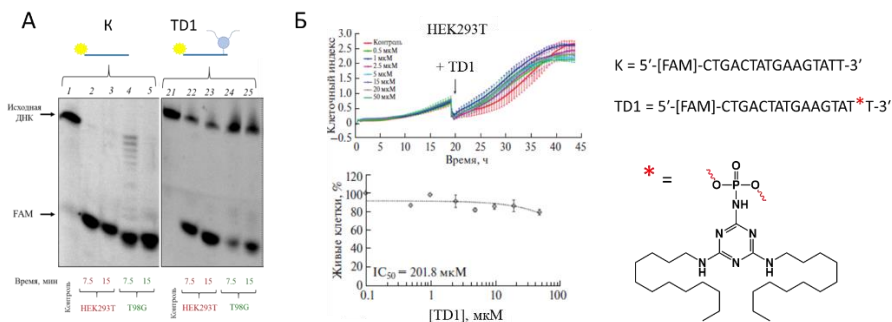


Рис. 11. А – Электрофоретический профиль реакционных смесей контрольного олигонуклеотида (К) и додецил-содержащего ТАО (TD1) состава 5'-(FAM)-CTGACTATGAAGTAT*Т-3' после обработки нуклеазами цельноклеточных экстрактов клеточных линий HEK293T и T98G. Б – Концентрационные кривые зависимости клеточного индекса от времени (сверху) и кривые выживаемости клеток в зависимости от концентраций (снизу) для додецил-содержащего ТАО (TD1) состава 5'-(FAM)-CTGACTATGAAGTAT*Т-3' на клетках линии HEK293T.

Заключение

В ходе выполнения данной работы был значительно развит предложенный ранее подход к получению нового класса триазиламидофосфатных олигонуклеотидов (ТАО). Были предложены различные варианты 2-азидо-1,3,5-триазинов, оценена их реакционная способность. Была показана возможность повышения эффективности получения ТАО путем включения в синтетическую схему стадии β-элиминирования 2-цианоэтильной группы. С применением различных азидо-триазинов синтезирована широкая библиотека функционализированных ТАО, а также показана возможность автоматизированного синтеза ТАО. На примере некоторых ТАО была продемонстрирована их высокая химическая и ферментативная устойчивость, незначительная дестабилизация дуплексов, а для додецил-содержащих ТАО показана высокая эффективность проникновения в клетки, способность образовывать мицеллоподобные структуры, и низкая цитотоксичность, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных инструментов доставки НК в клетки.

Выводы

1. Разработаны методы получения триазиниламидофосфатных производных, основанные на применении библиотеки из 12 азидо-триазинов различной реакционной способности в реакции Штаудингера. В ходе оптимизации процесса получения триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов установлена ключевая роль дополнительной стадии β -элиминирования 2-цианоэтильной группы, способствующей переводу лабильного триазинил-фосфазена в стабильную амидофосфатную форму.

2. Продемонстрирована возможность широкой функционализации олигонуклеотидов в твердофазном варианте с применением разработанных методов:

- Использование 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина не только позволяет получать триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды различного состава, в том числе содержащие две одинаковые гидрофобные или катионные группы, но и вводит остатки диаминов или аминоспиртов, способных к дальнейшей функционализации с получением заместителей сложной структуры;

- Использование набора 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов позволяет получать производные олигонуклеотидов, несущие в составе триазинового остова комбинацию двух различных заместителей, в том числе сочетание гидрофобного и катионного;

- При исследовании совместимости азидо-триазинов различной структуры с условиями амидофосфитного синтеза обнаружено, что использование 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов, несущих компактные заместители, позволяет проводить автоматизированный синтез триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов, в том числе содержащих множественные модификации.

3. При изучении свойств модифицированных олигонуклеотидов показано:

- Триазиновое ядро положительно влияет на стабильность фосфамидной связи в широком диапазоне pH;

- Наличие единичного триазинового фрагмента незначительно дестабилизирует ($0.5-1^\circ\text{C}$ в буфере $1 \times \text{PBS}$; $1-1.5^\circ\text{C}$ в буфере 1 M NaCl и 10 mM какодилат натрия) ДНК/ДНК дуплекс независимо от типа введенных заместителей;

- Наличие додецильных остатков в триазиновом фрагменте способствует формированию мицеллоподобных структур, увеличивая эффективность проникновения в клетки при сохранении низкой цитотоксичности и

обеспечивая устойчивость производных к нуклеазам цельноклеточных экстрактов.

Список публикаций по теме диссертации

1. Купрюшкин М.С., **Жарков Т.Д.**, Ильина Е.С., Марков О.В., Кочеткова А.С., Ахметова М.М., Ломзов А.А., Пышный Д.В., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. Триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды: получение и исследование их взаимодействия с клетками и ДНК-связывающими белками // Биоорганическая химия. – 2021. – Т. 47. – № 3. – С. 348-364. <https://doi.org/10.1134/S1068162021030110>;
2. **Zharkov, T.D.**, Mironova, E.M., Markov, O.V., Zhukov, S.A., Khodyreva, S.N., Kupryushkin, M.S. Fork- and Comb-like Lipophilic Structures: Different Chemical Approaches to the Synthesis of Oligonucleotides with Multiple Dodecyl Residues // Int J Mol Sci. – 2023. – V. 24. – N. 19. – P. 14637. <https://doi.org/10.3390/ijms241914637>;
3. **Zharkov, T.D.**, Markov, O.V., Zhukov, S.A., Khodyreva, S.N., Kupryushkin, M.S. Influence of Combinations of Lipophilic and Phosphate Backbone Modifications on Cellular Uptake of Modified Oligonucleotides // Molecules. – 2024. – V. 29. – N. 12. – P. 452. <https://doi.org/10.3390/molecules29020452>;
4. **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. – V. 10. – N. 39. – P. 45906–45920. <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c06606>.
5. Купрюшкин М.С., **Жарков Т.Д.**, Довыденко И.С., Марков О.В. Химическое соединение с триазиновой группой и способ его получения. Патент на изобретение, № RU2799452C2 (выдан 05.07.2023).