

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук
(ИХБФМ СО РАН)**

На правах рукописи

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

ЖАРКОВ ТИМОФЕЙ ДМИТРИЕВИЧ

1.4.9. Биоорганическая химия

**Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

**Научный руководитель:
кандидат химических наук
Купрюшкин Максим Сергеевич**

Новосибирск – 2026

Оглавление

Оглавление	2
Список сокращений	5
1. ВВЕДЕНИЕ	7
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
2.1. Типы модифицированных олигонуклеотидов и подходы к их получению – вводимые ограничения	13
2.2. Подходы к введению модификаций в (дезоксир)рибозный цикл в составе нуклеозида ..	17
<i>2.2.1. Аналоги нуклеозидов, содержащие химические модификации в 2'-положении рибозного цикла.....</i>	<i>17</i>
<i>2.2.2. Аналоги нуклеозидов, содержащие замкнутый или разомкнутый рибозный цикл.....</i>	<i>19</i>
<i>2.2.3. Аналоги нуклеозидов на основе альтернативных циклических структур</i>	<i>22</i>
2.3. Методы получения фосфат-модифицированных олигонуклеотидов	27
<i>2.3.1. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-S</i>	<i>27</i>
<i>2.3.1.1. Получение тиофосфатов</i>	<i>27</i>
<i>2.3.1.2. Получение дитиофосфатов</i>	<i>30</i>
<i>2.3.1.3. Получение тиолофосфатов</i>	<i>32</i>
<i>2.3.2. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-B.....</i>	<i>34</i>
<i>2.3.3. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-C.....</i>	<i>36</i>
<i>2.3.3.1. Получение метилфосфонатов</i>	<i>36</i>
<i>2.3.3.2. Получение этинилфосфонатов.....</i>	<i>38</i>
<i>2.3.3.3. Получение отрицательно заряженных C-фосфонатов.....</i>	<i>39</i>
<i>2.3.4. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-O-R</i>	<i>43</i>
<i>2.3.5. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-N</i>	<i>44</i>
<i>2.3.5.1. Получение N-алкиламидофосфатов</i>	<i>46</i>
<i>2.3.5.2. Получение сульфониламидофосфатов.....</i>	<i>47</i>
<i>2.3.5.3. Получение фосфорилгуанидинов.....</i>	<i>48</i>
<i>2.3.5.4. Получение N3'-P5' амидофосфатов</i>	<i>50</i>
2.4. Заключение.....	52
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	54
3.1. Химические реагенты	54
3.2. Азидо-триазины	54
<i>3.2.1. Методы характеристики и очистки азидо-триазинов.....</i>	<i>54</i>
<i>3.2.2. Органический синтез азидо-триазинов</i>	<i>55</i>
<i>3.2.3. Исследование взаимодействия азидо-триазинов с нуклеозидами</i>	<i>61</i>
3.3. Синтез олигонуклеотидов.....	61
3.4. Характеризация и очистка олигонуклеотидов.....	69
3.5. Методы исследования олигонуклеотидов	70
<i>3.5.1. Формирование ДНК-дуплексов и определение температур их плавления</i>	<i>70</i>

3.5.2. <i>Исследование олигонуклеотидов методом динамического светорассеяния</i>	71
3.5.3. <i>Исследование химической устойчивости олигонуклеотидов</i>	71
3.5.4. <i>Исследование устойчивости олигонуклеотидов к нуклеазам цельноклеточных экстрактов</i>	71
3.5.5. <i>Исследование цитотоксичности олигонуклеотидов</i>	71
3.5.6. <i>Исследование эффективности внутриклеточного проникновения олигонуклеотидов методом проточной цитофлуорометрии</i>	72
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	73
4.1. Выбор подхода к модификации олигонуклеотидов и общей структуры реагентов-модификаторов	73
4.2. Пути получения азидо-триазинов и триазиниламидофосфатных групп	76
4.2.1 <i>Строение и способы получения различных 2-азидо-1,3,5-триазинов в качестве реагентов-модификаторов</i>	76
4.2.2 <i>Общие структуры триазиниламидофосфатных групп, полученных с применением различных 2-азидо-1,3,5-триазинов</i>	79
4.3. Оценка эффективности получения модельных триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов с применением различных 2-азидо-1,3,5-триазинов	81
4.3.1 <i>Реакционная способность 2-азидо-1,3,5-триазинов</i>	81
4.3.2. <i>Стабильность модифицированного звена олигонуклеотида</i>	89
4.3.2.1. <i>Влияние этапа β-элиминирования на эффективность получения триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов</i>	89
4.3.2.2. <i>Варианты деградации триазинилфосфазеновой группы и заместителей в ее составе</i> ..	91
4.4. Разнообразие функциональных групп в составе триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов	94
4.4.1. <i>Получение функционализированных олигонуклеотидов с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина</i>	94
4.4.1.1. <i>Одностадийное введение заместителей в триазиновый остов</i>	95
4.4.1.2. <i>Поэтапная сборка заместителей в триазиновом остове</i>	97
4.4.2. <i>Получение функционализированных олигонуклеотидов с применением других 2-азидо-1,3,5-триазинов</i>	100
4.5. Границы применимости подхода к получению триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов	104
4.5.1. <i>Автоматизированное получение триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов</i>	104
4.5.2. <i>Получение триазиниламидофосфатных НК-производных различного нуклеотидного состава</i>	107
4.6. Некоторые фундаментальные свойства класса триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов	111
4.6.1. <i>Гибридизационные свойства триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов</i>	112
4.6.2. <i>Химическая стабильность триазиниламидофосфатной группы</i>	114
4.7. Додецил-содержащие триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды	117
4.7.1. <i>Мицеллообразование в растворе додecil-содержащих триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов</i>	122

<i>4.7.2. Проникновение додецил-содержащих триазиламидофосфатных олигонуклеотидов в клетки, их цитотоксичность и ферментативная устойчивость</i>	123
4.8. Заключение	127
5. ВЫВОДЫ	130
6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	131
Приложение 1	147
Приложение 2	148
Приложение 3	149
Приложение 4	150
Приложение 5	151
Приложение 6	152

Список сокращений

BSA – (N,O-бистриметилсилил)ацетамид;

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

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

DIPEA – (N,N-диизопроил)этиламин;

DMAPA – (N,N-диметиламино)пропиламин;

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

DMF – диметилформамид;

DMI – диметилимидазолидин фосфорилгуанидиновая группа;

DMTr – 4,4'-диметокситритильная группа;

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

EtOAc – этилацетат;

FAM – 6-карбоксихлоресцеиновая группа;

HEK293T (human embryotic kidney) – иммортализованная линия клеток почек эмбриона человека;

IC₅₀, IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования;

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

LF – доставщик нуклеиновых кислот Lipofectamine2000;

MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight) – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией;

МОЕ – метоксиэтильная группа;

PBS (phosphate buffered saline) – фосфатно-солевой буфер;

Pu – пиридин;

R_f (retraction factor) – коэффициент удерживания в ТСХ;

T98G – иммортализованная линия клеток глиобластомы человека;

TBE (tris/borate/EDTA) – трис-боратный буфер;

THF – тетрагидрофуран;

μ – электрофоретическая подвижность;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ДСР – динамическое светорассеяние;

ИК – инфракрасный;

НК – нуклеиновая кислота;

ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;

ПААГ – полиакриламидный гель;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин;

T_{пл}, T_m – температура плавления дуплексов олигонуклеотидов;

ТСХ – тонкослойная хроматография;

ФГ – фосфорилгуанидин;

ФГО – фосфорилгуанидиновый олигонуклеотид;

ЭДТА – этилендиамин тетраацетат;

ЯМР – ядерный магнитный резонанс.

1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время применение синтетических олигонуклеотидов в качестве различных молекулярно-биологических инструментов активно развивается. Наиболее перспективными областями применения олигонуклеотидов можно назвать диагностику и терапию заболеваний, обусловленных нарушением различных процессов при реализации генетической информации. Так, например, по состоянию на 2026 год одобрено уже более 20 препаратов на основе олигонуклеотидов для лечения подобных заболеваний, и их число продолжает кратно увеличиваться [1–7]. Все НК-препараты представляют собой олигонуклеотиды, содержащие в своем составе различные химические модификации, которые наделяют олигонуклеотид свойствами, важными в контексте терапевтического применения, тем самым повышая его терапевтический потенциал. С помощью введения модификаций возможно повысить эффективность проникновения олигонуклеотидов через клеточную мембрану, и, как следствие, эффективность доставки препаратов, увеличить устойчивость к ферментативному и химическому расщеплению, скорректировать биораспределение и избирательность связывания с комплементарной мишенью, и т.п. [1, 8–10]. Несмотря на то, что целый ряд модификаций уже рутинно применяется при создании НК-препаратов и диагностических инструментов (например, тиофосфатные, 2'-F и 2'-МОЕ модификации), научное сообщество продолжает предлагать новые типы модификаций для более тонкой регуляции свойств олигонуклеотидов с целью максимизации их эффективности.

Ключевым фактором при создании новых типов НК-модификаций, определяющим эффективность их дальнейшего изучения, является возможность их введения в состав олигонуклеотида в рамках автоматического твердофазного амидофосфитного синтеза – стандартного метода получения олигонуклеотидов. Для этого во многих случаях используют строительные блоки для синтеза в виде структурно измененных амидофосфитных мономеров, а также стратегии, основанные на незначительном изменении протоколов синтеза. К последним, в частности, относится изменение реагентов на этапе окисления фосфит-триэфирной группы олигонуклеотида. Подобная стратегия позволяет получать разнообразные фосфат-модифицированные НК-производные, в частности наиболее широко изученные тиофосфатные олигонуклеотиды.

Каждый тип химической модификации наделяет олигонуклеотид уникальным набором свойств. При этом эффекты от одних модификаций проявляются лишь при их множественном введении в олигонуклеотид, а от других – при встраивании в единичном варианте. Например, при создании НК-препаратов нового поколения исследователи прибегают к использованию все более сложных комбинаций модификаций [11, 12], что

позволяет получать олигонуклеотиды с очень четко заданными свойствами. Несмотря на возможность быстрого и автоматизированного синтеза модифицированных НК, получение подобных олигонуклеотидов достаточно ресурсозатратно. Кроме того, даже для незначительного изменения совокупности свойств олигонуклеотида, зачастую необходимо значительно изменять соотношение и состав модификаций. Для более тонкого настраивания свойств олигонуклеотидов возможно использование универсальных подходов, позволяющих варьирование функциональных групп, обуславливающих различные свойства, в рамках однотипных модификаций. В настоящее время, однако, подобных подходов практически не существует.

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

Ранее в лаборатории химии нуклеиновых кислот ИХБФМ СО РАН был предложен новый класс модифицированных олигонуклеотидов в виде триазириламидофосфатных производных. Подход к получению данных производных основан на применении различных азидо-триазинов в качестве реагентов на этапе окисления в ходе амидофосфитного синтеза. Основной особенностью подхода при рациональном дизайне реагентов-модификаторов 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.

Целью данной работы является развитие подхода к получению нового класса модифицированных олигонуклеотидов в виде триазириламидофосфатных производных, а также изучение свойств отдельных представителей класса.

Задачи, которые необходимо решить для достижения поставленной цели:

1. Разработать и оптимизировать методы получения триазириламидофосфатных 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 триазиниламидофосфатных олигонуклеотидных производных, несущих различные заместители.

3. Изучить как фундаментальные свойства самого класса триазиниламидофосфатных 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 триазиниламидофосфатных олигонуклеотидных производных, основанного на реакции Штаудингера с применением различных 2-азидо-1,3,5-триазинов в качестве реагентов-модификаторов. Показано, что использование ранее предложенного 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, позволяет эффективно варьировать заместители в составе триазинового остова модификации. В исследовании были впервые синтезированы триазиниламидофосфатные НК-производные, несущие гидрофобные и катионные функциональные группы или их комбинации, заместители с остатками аминов и спиртов, а также заместители сложной структуры, полученные путем поэтапной сборки на твердофазном носителе. В рамках оптимизации подхода установлена ключевая роль отдельной стадии β -элиминирования 2-цианоэтильной группы при триазиниламидофосфатной модификации. Для 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина также показана применимость для введения модификации в структуру олигонуклеотидов различного нуклеотидного состава, в том числе содержащих 2'-замещенные рибонуклеотидные звенья. Дополнительно предложено несколько новых вариантов азидо-триазинов, позволяющих получать триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды 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 триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов впервые продемонстрированы стабильность триазиниламидофосфатной 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 триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов 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 триазириламидофосфатные олигонуклеотиды, обладающие высокой степенью внутриклеточного накопления, могут быть использованы в качестве эффективных доставщиков НК в клетки.

Методология и методы исследования

Основные результаты работы получены с применением методов ИК-спектроскопии, ЯМР-спектроскопии на ядрах ^1H , ^{13}C и ^{31}P , твердофазного амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов, обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии, электрофореза в полиакриламидном геле, масс-спектрометрии MALDI-TOF и ESI-MS, динамического светорассеяния, цитофлуорометрии, термической денатурации с оптической регистрацией сигнала.

Положения, выносимые на защиту

1. В рамках основного подхода к получению триазириламидофосфатных 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 триазириламидофосфатных 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 триазириламидофосфатное 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 триазириламидофосфатных производных, несущих две разных функциональных группы в составе одного триазинового остова, а также автоматизированное введение до четырех триазириламидофосфатных модификаций в состав олигонуклеотида.

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

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

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

Апробация и публикация 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).

Личный вклад автора

Автором работы синтезированы все азиды-модификаторы и триазиниламидофосфатные олигонуклеотидные производные, проведены электрофоретический и хроматографический анализы олигонуклеотидов, исследование и характеристика додecil-содержащих триазиниламидофосфатных 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., Черноносков А.А.). Термическая денатурация с оптической регистрацией сигнала дуплексов олигонуклеотидов проведена сотрудниками ЛСТБ ИХБФМ СО РАН, к.ф.-м.н. Голышевым В.М. и к.ф.-м.н., зав. ЛСТБ Ломзовым А.А. Результаты цитофлуорометрии для додecil-содержащих олигонуклеотидов получены сотрудником ЛБНК ИХБФМ СО РАН, к.б.н. Марковым О.В. (зав. лаб. – чл.-корр. РАН, д.б.н. Зенкова М.А.). Эксперименты по определению

цитотоксичности олигонуклеотидов и их устойчивости к действию нуклеаз цельноклеточных экстрактов проведены сотрудником ЛБХФ ИХБФМ СО РАН, к.х.н. Ильиной Е.С. (зав. лаб. – академик РАН, д.х.н. Лаврик О.И.).

Структура и объем диссертации

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

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

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

В настоящее время научным сообществом предложено значительное количество вариантов химических модификаций олигонуклеотидов. С точки зрения строения нуклеотидного звена – мономерной единицы олигонуклеотида – существует три различных структурных элемента, в которых может присутствовать химическая модификация, а именно азотистое основание, остаток (дезокси)рибозы, и фосфатная группа. В данном обзоре литературы будут рассмотрены только различные варианты модификаций сахаро-фосфатного остова олигонуклеотида. Данный выбор обусловлен возможностью гибкого варьирования свойств создаваемых НК-производных путем изменения типа вводимых функциональных групп в составе модификаций, а также количества, положения и соотношения подобных модификаций без изменения принципиальной возможности образования комплементарных комплексов. Дополнительно стоит отметить, что, помимо модификаций азотистых оснований, в обзоре не будут рассмотрены различные варианты модификаций 3'- и 5'-гидроксильных групп олигонуклеотидов, несмотря на их широкую представленность, в связи с возможностью введения лишь одной подобной модификации в состав концевых нуклеотидных звеньев.

Для возможности корректной систематизации рассматриваемых модификаций, их разнообразие будет ограничено. В рамках установленного ограничения будут рассмотрены только такие модификации, которые могут быть введены в состав олигонуклеотида непосредственно в процессе стандартного твердофазного амидофосфитного синтеза без возможных постсинтетических обработок полученного НК-производного в жидкофазном варианте, направленных на изменение его структуры. Кроме того, структуры рассматриваемых модификаций должны быть устойчивы на протяжении всего олигонуклеотидного синтеза. Для определения конкретных типов соединений и реакций, позволяющих вводить модификации, следует отдельно рассмотреть цикл амидофосфитного синтеза (Рис. 1).

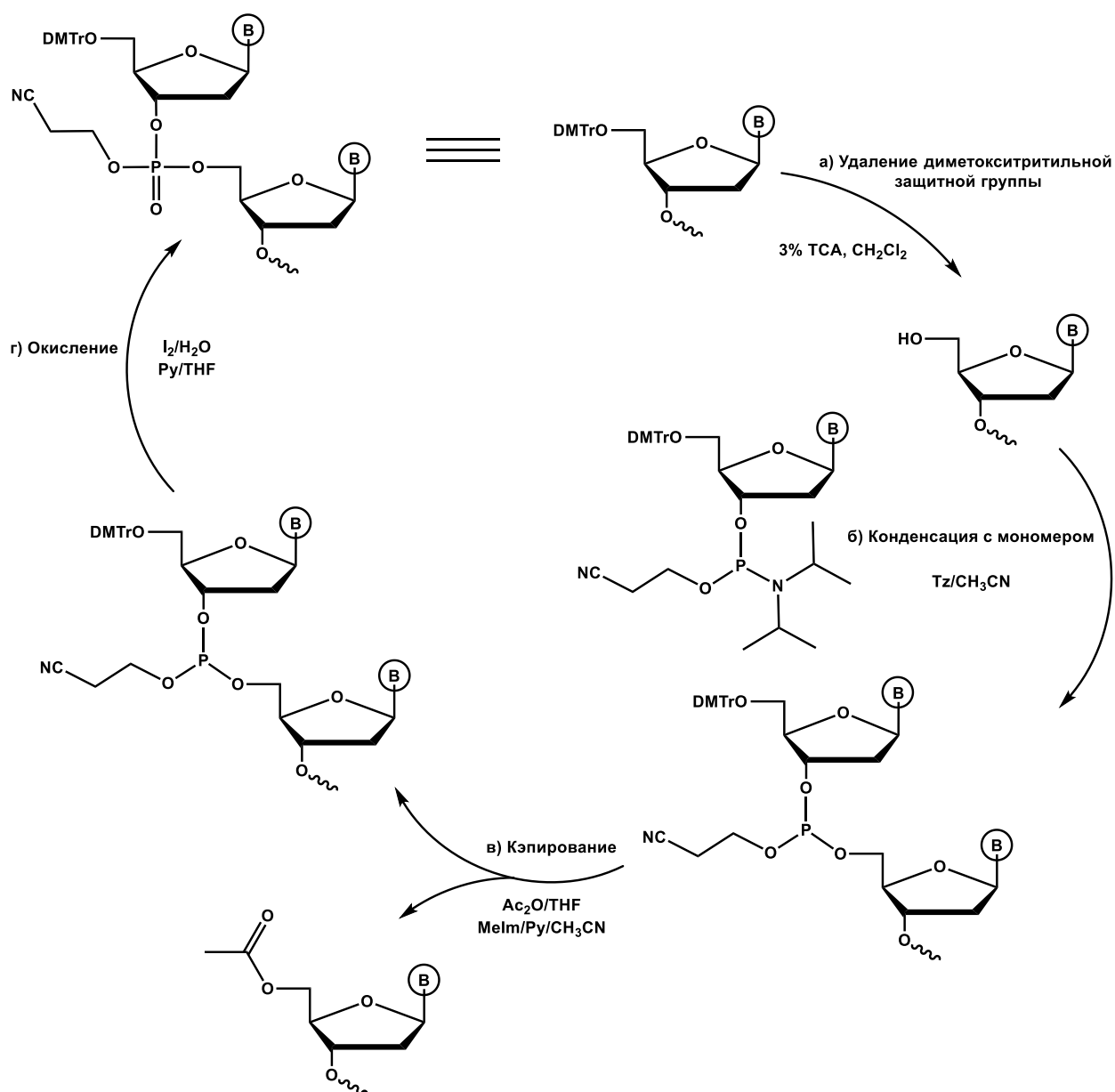


Рис. 1. Общая схема цикла твердофазного амидофосфитного синтеза, состоящего из стадий деблокирования (а), введения мономера (б), «кэпирования» (в) и окисления (г); В – азотистое основание, DMTr – диметокситригильная группа.

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

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

Для введения модификаций в структуру остатка (дезокс)рибозы или фосфатной группы в составе олигонуклеотида применяются определенные подходы. Так, для получения олигонуклеотида с модифицированным (дезокс)рибозным циклом используют соответствующие амидофосфитные мономеры (пример структуры мономера приведен на Рис. 2а). В свою очередь для введения модификаций в состав фосфатных групп олигонуклеотида чаще всего используют метод альтернативного окисления. Для этого на этапе превращения фосфит-триэфирной группы в фосфатную, стандартную смесь $I_2/Py/H_2O$ заменяют на альтернативные окисляющие реагенты с получением различных структур (пример реакции альтернативного окисления приведен на Рис. 2б). Для получения некоторых фосфат-модифицированных олигонуклеотидов, например, метилфосфонатов, также могут быть использованы мономеры с альтернативной фосфитной компонентой, которые при встраивании в растущую олигонуклеотидную цепь окисляют по стандартным протоколам (Рис. 2в).

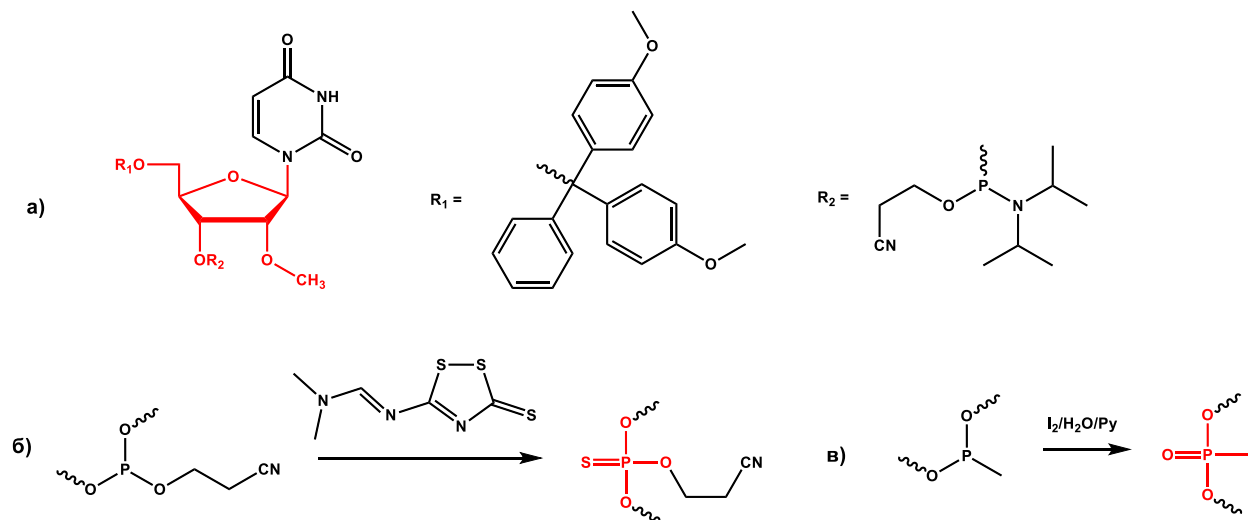


Рис. 2. Строение модифицированного амидофосфитного мономера для введения модификации по (дезокс)рибозному остатку на примере 2'-О-метил-уридинового мономера (а); альтернативное окисление фосфит-триэфирной группы (б) и использование альтернативных мономеров со стандартным окислением (в) для получения фосфат-модифицированных олигонуклеотидов на примере получения тиофосфатной (б) и метилфосфонатной (в) модификации.

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

активная амидофосфитная и защитная DMTr-группы соответственно. Для дополнительного упрощения классификации возможных модификаций, в обзоре будут рассмотрены структуры и схемы получения только модифицированных нуклеозидов. В качестве дополнительного вводимого ограничения к рассматриваемым модифицированным структурам будут относиться только такие нуклеозиды, углеводная часть которых может быть получена из нативного (дезокси)рибозного цикла.

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

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

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

2.2. Подходы к введению модификаций в (дезокси)рибозный цикл в составе нуклеозида

Первой из рассматриваемых групп структур, используемых для введения модификаций в состав олигонуклеотида, являются остатки рибозы/дезоксирибозы. Путем проведения последовательности специфических реакций, в состав углеводного цикла могут быть введены различные функциональные группы.

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

Остаток рибозы в составе нуклеотидного звена также является популярным положением для введения химических модификаций в состав олигонуклеотида. Самой распространенной позицией для введения модификаций в рамках рибозного остова можно назвать 2'-положение – так, например, большинство из одобренных препаратов на основе олигонуклеотидов, содержат некоторые модификации в 2'-положении, например, 2'-фторные и 2'-О-метильные модификации (рис. 3а) [3]. Существует два принципиально отличающихся подхода для введения 2'-модификаций. Первый из них основан на нуклеофильном замещении 2'-гидроксильной группы с ее предварительной активацией (рис. 3б). Таким способом, например, получают 2'-галогенированные производные, в том числе и широко используемую 2'-фтор модификацию [13]. Вторым подходом является электрофильное замещение атома водорода при 2'-гидроксильной группе на различные углеводородные заместители с использованием соответствующих галогеналканов (рис. 3в). С применением указанной схемы могут быть получены, например, 2'-О-метильные [14], 2'-О-(2-метокси)этильные [15] и другие модификации. В случае получения 2'-модифицированных аналогов тимидина/уридина возможна и альтернативная синтетическая схема, которая заключается в образовании циклического 2,2'-О-интермедиата с его последующим раскрытием в присутствии нуклеофилов (рис. 3г). Например, 2'-О-(2-метокси)этильная группа может быть введена в состав тимидинового производного подобным способом с использованием соответствующего спирта, при этом конфигурация 2'-гидроксильной группы меняется на противоположную [16]. Стоит отметить, что при получении различных 2'-модифицированных производных, по остальным гидроксильным группам в составе нуклеозида, а также по аминогруппам азотистых оснований, предварительно вводятся ортогональные защитные группы во избежание протекания побочных реакций.

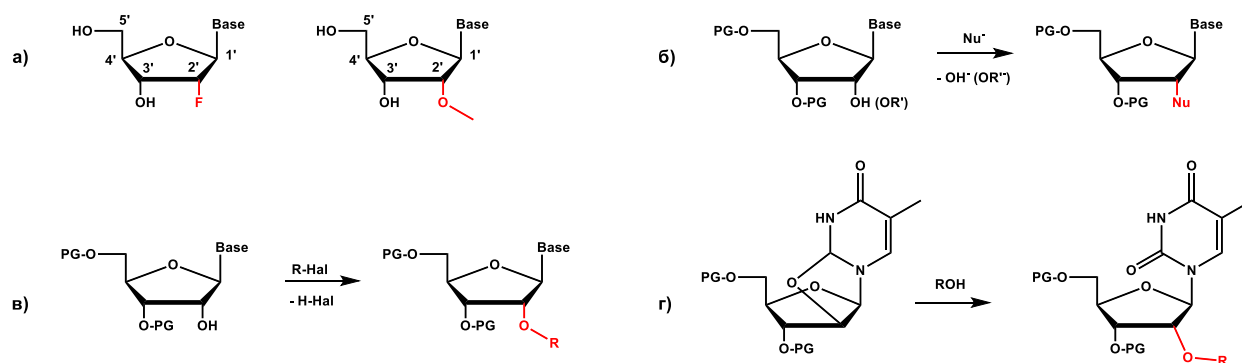


Рис. 3. Структуры нуклеозидов, содержащих фторные и O-метильные модификации по 2'-положению рибозного цикла (а); основные способы введения модификаций по 2'-положению рибозного цикла, основанные на реакции нуклеофильного замещения (б), электрофильного замещения (в), а также на раскрытии цикла тимидинового производного (г). PG – защитная группа, Base – азотистое основание, Nu – нуклеофил, R – функциональный заместитель, OR' – активированная гидроксильная группа, Hal – галоген.

Вследствие специфических биофизических свойств и особенностей строения, 2'-модификации в составе олигонуклеотидов могут улучшать некоторые их свойства, например, эффективность связывания с комплементарной РНК-мишенью, а также ферментативную устойчивость [17]. В частности, повышенное сродство олигонуклеотидов, содержащих 2'-модификации, к РНК-мишеням обусловлено переходом углеводного остова из C_{2'}-эндо в C_{3'}-эндо конформацию, способствующую образованию РНК/РНК дуплексов (рис. 4а). В то же время, возможность некоторых 2'-модификаций, например, аналогов 2'-O-(2-метокси)этильных групп, приобретать положительный заряд и координировать воду обуславливает нуклеазную устойчивость соответствующих модифицированных олигонуклеотидов [17]. В связи с совокупностью вышеуказанных полезных свойств, научным сообществом было предложено множество вариантов структур 2'-модификаций олигонуклеотидов, такие как 2'-галогены [18], 2'-алкоксиалкилы и их аналоги [17, 19, 20] и др. Некоторые примеры структур нуклеозидов, содержащих 2'-модификации, приведены на рис. 4б.

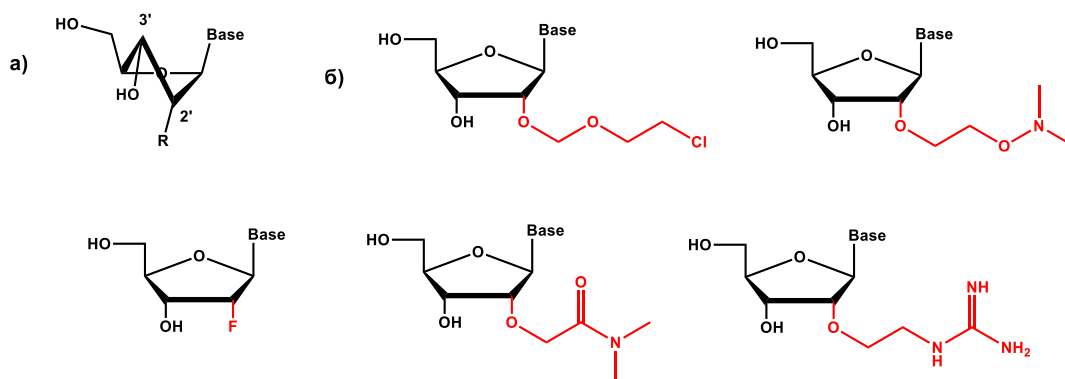


Рис. 4. Изображение C_3' -эндо конформации нуклеозида, содержащего 2'-модификацию (обозначена как R) (а), и некоторые примеры структур 2'-модифицированных нуклеозидов (б); Base – азотистое основание.

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

2.2.2. Аналоги нуклеозидов, содержащие замкнутый или разомкнутый рибозный цикл

Другим подходом к модификации углеводного остова в составе нуклеозида является изменение самой структуры рибозного цикла. В частности, ряд методов для подобного изменения структуры основан на раскрытии рибозного цикла, или на образовании дополнительных связей внутри цикла. Одним из самых распространенных вариантов структуры с разомкнутым рибозным остовом являются так называемые «разомкнутые нуклеиновые кислоты» (unlocked nucleic acid, UNA), в которых отсутствует связь между C2' и C3' атомами. Такие структуры получают путем обработки нуклеозида периодатом натрия с последующим восстановлением альдегидных групп до спиртовых в присутствии боргидрида натрия (рис. 5а) [21]. Свободную 2'-гидроксильную группу в составе UNA-звена возможно дополнительно модифицировать по такому же подходу, как и в случае нативных рибозных звеньев – путем активации и нуклеофильного замещения. В ряде работ была показана возможность получения пиперазин-модифицированных UNA-нуклеозидов и их аналогов, содержащих сложные флуорофорные остатки (рис. 5б) [22–24].

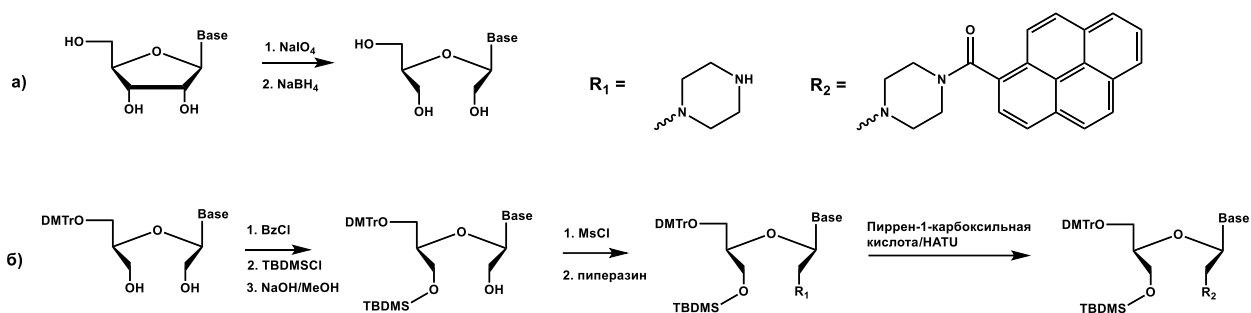


Рис. 5. Схема синтеза нуклеозида «разомкнутых нуклеиновых кислот» (UNA-нуклеозида) (а) и часть схемы синтеза некоторых пиперазин-модифицированных амидофосфитных UNA-мономеров (б); Base – азотистое основание, Bz – бензоил, TBDMS – *tert*-бутилдиметилсилил, Ms – метансульфонил, DMTr – 4,4'-диметокситритил, HATU – гексафторфосфат азабензотриазол тетраметилуриона.

В связи с отсутствием связи в рибозном цикле, UNA обладают гораздо большей конформационной подвижностью по сравнению с немодифицированными аналогами, а также проявляют значительный дестабилизирующий эффект в процессе дуплексообразования. В связи с данным свойством, UNA-звенья в основном вводят в состав олигонуклеотидов, способных образовывать сложные самоорганизованные структуры типа *i*-мотивов или G-квадруплексов с высокой температурой плавления для тонкой регуляции их термодинамических свойств [21]. Данное обстоятельство позволяет использовать UNA-модифицированные олигонуклеотиды в качестве аптамеров со сложной вторичной структурой [22]. Также было продемонстрировано, что олигонуклеотиды, содержащие UNA-звенья, могут быть использованы как в качестве классических антисмысловых олигонуклеотидов, рекрутирующих РНКазу H, так и в качестве siРНК [21].

Классическим примером структуры рибозного остова, содержащего дополнительные связи, являются «замкнутые нуклеиновые кислоты» (locked nucleic acid, LNA), в которых рибозный цикл содержит дополнительную метиленовую группу, соединяющую гидроксильную группу при C2'-атоме, и C4'-положение. Синтез таких производных протекает в большое число стадий, ключевой из которых является замыкание малого цикла с образованием итогового LNA-звена. Изначально получают 4'-гидроксиметильные нуклеозидные производные путем мягкого окисления 5'-гидроксильной группы до альдегидной триацетатом иодоксибензойной кислоты (периодинан Десса-Мертина, DMP) и присоединения остатка формальдегида с последующим восстановлением по Канниццаро; далее 4'-гидроксиметильная группа активируется тозилхлоридом после чего в присутствии гидроксида натрия происходит нуклеофильное замещение тозильной группы на 2'-ОН группу с замыканием цикла и образованием LNA-звена (рис. 6а, [25, 26]). Помимо стандартных LNA-звеньев, содержащих одну оксиметиленовую соединительную группу, существует множество

других вариантов подобных структур, так называемых «мостиковых нуклеиновых кислот» (bridged nucleic acid, BNA). BNA отличаются между собой соединительными элементами C2'- и C4'-атомов; в зависимости от природы малых циклов, разные BNA получают по специфическим методикам, часто отличным от схемы получения LNA-звеньев. Некоторые примеры из множества вариантов структур «мостиковых нуклеиновых кислот» представлены на Рис. 6б [27–30].

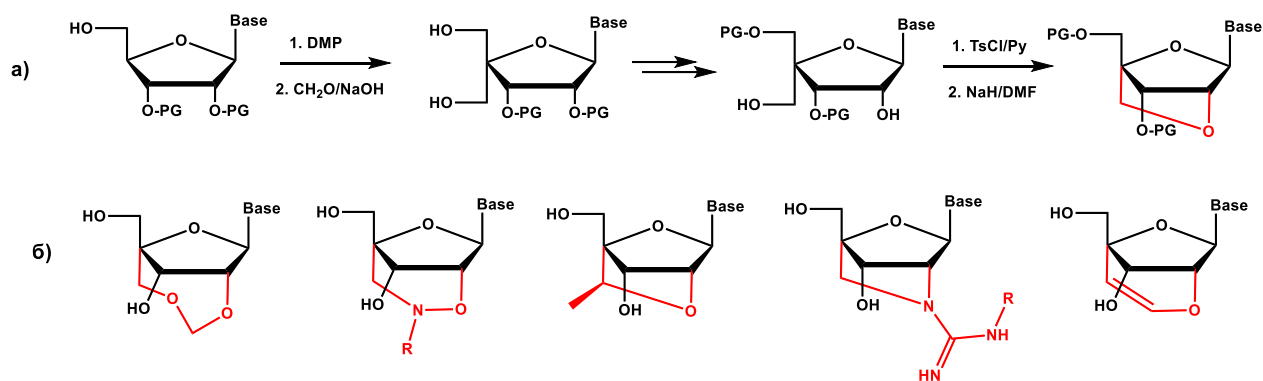


Рис. 6. Ключевая стадия синтеза нуклеозидов «замкнутых нуклеиновых кислот» (LNA-звена) (а) и варианты структур нуклеозидов «мостиковых нуклеиновых кислот» (BNA-звенья) (б); Base – азотистое основание, PG – защитная группы, DMP – периодинан Десса-Мерттина (триацетат иодоксибензойной кислоты), R – алкильный заместитель.

В отличие от UNA-звеньев, различные варианты LNA-нуклеотидов обладают пониженной конформационной подвижностью по сравнению с нативными рибозными звеньями, что обуславливает, соответственно, повышенную термодинамическую стабильность соответствующих дуплексов. В ряде работ было показано, что различные LNA- и BNA-содержащие олигонуклеотиды образуют прочные комплексы как с ДНК, так и с РНК [25, 27, 28]. Кроме того, подобные олигонуклеотиды за счет своих физико-химических свойств обладают высокой избирательностью по отношению к единичным мисматчам [27], вследствие чего их можно использовать для селективного поиска подобных несоответствий. Известны также примеры применения LNA-/BNA-содержащих олигонуклеотидов в качестве антисенс-олигонуклеотидов или siРНК с повышенной эффективностью биологического действия [31, 32].

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

2.2.3. Аналоги нуклеозидов на основе альтернативных циклических структур

В качестве отдельной категории аналогов нуклеозидов стоит выделить структуры, основанные на альтернативных циклах, строение которого отличается от стандартного рибозного кольца. К наиболее популярным и исследуемым вариантам таких структур можно отнести нуклеозиды морфолиновых олигонуклеотидов (РМО, [33]) (рис. 7а). Морфолиновый цикл может быть получен по синтетической схеме, схожей с синтезом UNA-звена – рибозный цикл с защищенной 5'-гидроксильной группой обрабатывают периодатом натрия, и затем восстанавливают альдегидные группы цианборгидридом натрия в присутствии водного раствора аммиака (рис. 7б) [33]. Стоит отметить, что первоначально разработанные методы синтеза РМО не позволяли вводить такие звенья в рамках стандартного твердофазного амидофосфитного синтеза, и для получения РМО требовалось специализированное оборудование [33, 34]. Однако в последнее время были разработаны методы, позволяющие эффективно получать РМО, в том числе и химерные РМО/ДНК структуры, связанными фосфодиэфирными или тиофосфатными группами, с применением стандартных протоколов амидофосфитного синтеза [35]. Стоит отметить, что в отличие от синтеза большинства олигонуклеотидов с измененным рибозным циклом, адаптированный синтез морфолиновых олигонуклеотидов проходит в направлении 5'→3', для чего используются мономеры с 5'-амидофосфитной группой с цианоэтильной защитой и с 3'-триметилсилильной группой (Рис. 7в) [35].

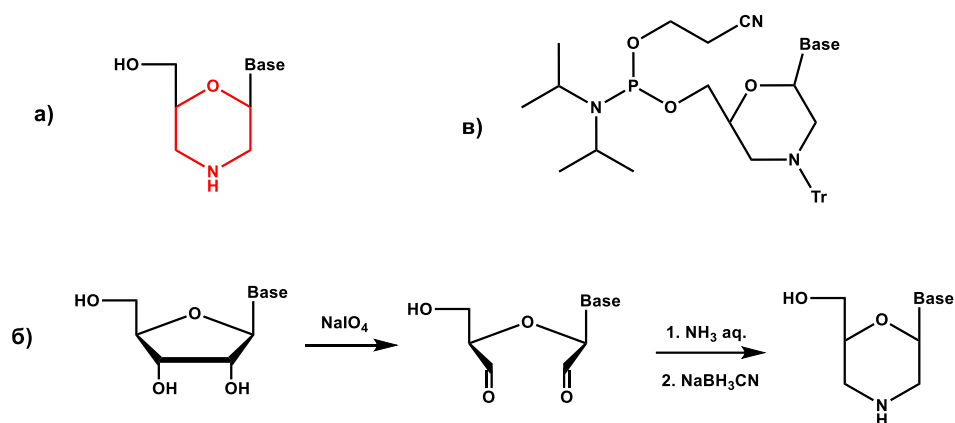


Рис. 7. Структура морфолинового нуклеозида (а), схема синтеза морфолинового цикла из производного рибозы (б) и структура амидофосфитного мономера морфолинового нуклеозида (в); Base – азотистое основание, Tr – триметилсилильная защитная группа.

Классические РМО-олигомеры, содержащие мономеры, связанные диамидофосфатным линкером, широко применяются для создания терапевтических препаратов на основе олигонуклеотидов [3]. Это обусловлено рядом их свойств, таких как низкая токсичность для организма вследствие электронейтрального характера остова и

слабым связыванием с клеточными белками, а также высокая нуклеазная устойчивость в связи с значительным изменением структуры сахаро-фосфатного остова [36]. В то же время для РМО характерна пониженная эффективность связывания с комплементарной последовательностью в связи с большей длиной звена олигонуклеотида и определенной конформацией морфолинового цикла.

К другому типу альтернативных остовов можно отнести группу природных циклических пентафураноз с конформацией гидроксильных групп, отличной от таковой в рибозном кольце. Одним из самых изученных представителей этого типа является арабинозный остов нуклеозида. В арабинозном цикле в составе нуклеозида 2'-гидроксильная группа обладает S-конформацией, в то время как в рибозном цикле эта группа принимает противоположную R-конформацию (Рис. 8а). Помимо возможности создания амидофосфитных мономеров на основе арабинозы и, соответственно, совместимости с твердофазным методом синтеза [37], арабинонуклеиновые кислоты (ANA) обладают рядом полезных свойств. Так, например, дуплекс ANA/RNA расщепляется ферментом РНКазы Н, что позволяет использовать ANA при создании ген-направленных терапевтических олигонуклеотидов [38]. К наиболее популярным модифицированным аналогам ANA можно отнести 2'-F производное (FANA, Рис. 8б). В отличие от стандартной ANA, фторированный аналог обладает гораздо большим сродством к РНК, а также устойчивостью к воздействию нуклеаз [39, 40]. Получение арабинозных нуклеозидов и их производных основано на обращении конфигурации 2'-ОН группы в составе рибозного цикла – активированная гидроксильная группа в составе нуклеозида подвергается нуклеофильному замещению по механизму S_N2 (Рис. 8в) [38].

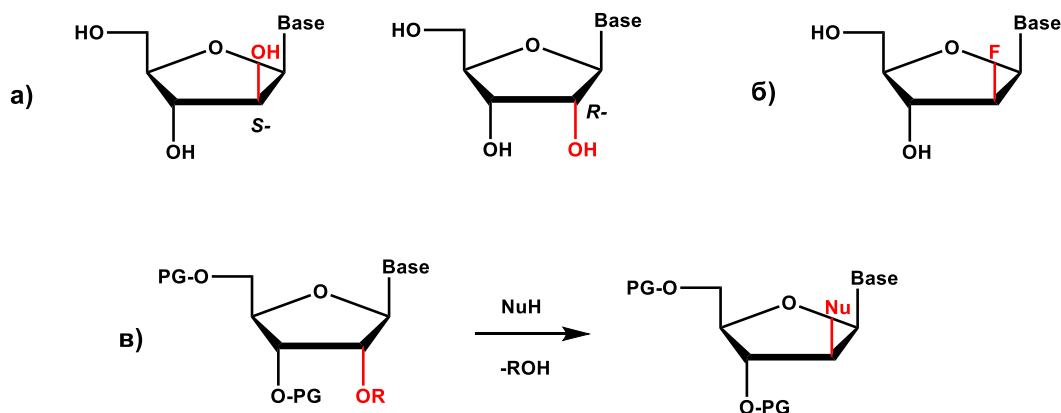


Рис. 8. Конфигурация 2'-гидроксильной группы в составе арабинозного цикла (а); строение 2'-F производного арабинозного нуклеозида (б); общая схема синтеза арабинозных нуклеозидов и их производных (в). Base – азотистое основание, OR – активированная гидроксильная группа, PG – защитная группа, Nu – нуклеофил.

Ключевые этапы синтеза заключаются в изначальном элиминировании 5'-ОН группы с получением алкенового интермедиата, и в дальнейшем одномоментном окислении двойной связи *m*-хлорнадбензойной кислотой (mCPBA) или галогенированными сукцинимидами, например, иод-сукцинимидом (NIS), и нуклеофильном присоединении необходимого заместителя к 4'-атому углерода (Рис. 10б) [47, 48]. Полученные по приведенной схеме 4'-ОМе, 4'-ОМОЕ и 4'-F модифицированные нуклеозиды могут конвертированы в амидофосфитные мономеры, полностью совместимые с твердофазными методом синтеза [48]. Наличие дополнительного заместителя в 4'-положении рибозного цикла обеспечивает переход 4'-модифицированных звеньев в составе соответствующей ДНК в С3'-эндо конформацию, что способствует формированию прочных дуплексов с комплементарной РНК [48, 49]. На основе 4'-ОМе-ДНК были сконструированы siРНК, обладающие значительной устойчивостью к нуклеазному расщеплению, хотя и не проявляющие значительно большей активности в РНК-интерференции по сравнению с немодифицированной системой [50].

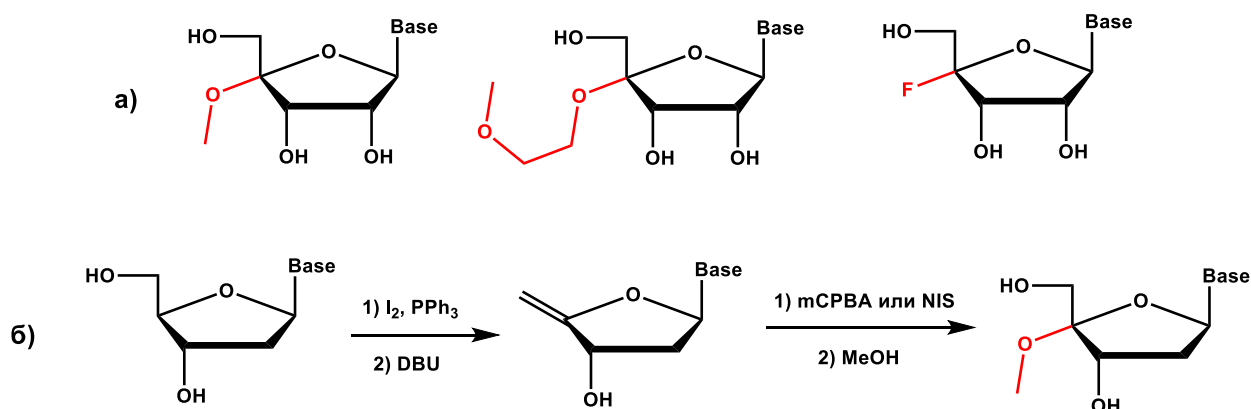


Рис. 10. Структуры 4'-ОМе, 4'-ОМОЕ, 4'-F рибонуклеозидов (а); основные этапы синтеза 4'-модифицированных нуклеозидов на примере 4'-ОМе-2'-дезоксинуклеозида (б). Base – азотистое основание, mCPBA – *m*-хлорнадбензойная кислота; NIS – N-иодсукцинимид.

Еще одной группой нуклеозидов, содержащих дополнительные группы в составе рибозного цикла, являются 5'-модифицированные аналоги. Среди представителей этой группы наиболее известными и изученными являются 5'-Me-нуклеозиды (Рис. 11а). Получение данных структур основано на первоначальном окислении 5'-ОН группы до альдегида с использованием триацетата иодоксибензойной кислоты (DMP) с дальнейшим присоединением метильной группы по реакции Гриньяра с использованием метилмагний бромида (Рис. 11б) [51, 52]. При введении алкильной группы по 5'-атому углерода в нуклеозиде появляется дополнительный оптический центр с образованием (*R*)- и (*S*)-изомеров (Рис. 11а). Исследования конформационной подвижности нуклеотидных звеньев

как в 5'-Me-ДНК, так и в 5'-Me-РНК показали, что оба оптических изомера преимущественно принимают C2'-эндо конформацию, за счет чего использование подобных модификаций уменьшает эффективность дуплексообразования соответствующих НК с РНК [51, 52]. По аналогии с оптическими изомерами тиофосфатных олигонуклеотидов, (*R*)- и (*S*)-изомеры 5'-Me-ДНК проявляют разные свойства. Так, (*R*)-изомер обеспечивает защиту от действия 5'-экзонуклеаз, но при этом значительно дестабилизирует дуплекс, в то время как (*S*)-изомер обеспечивает защиту от 3'-экзонуклеаз [51, 52]. В связи со значительным влиянием модификаций в 5'-положении рибозного цикла на образование комплементарных комплексов, 5'-Me-ДНК не нашли широкого применения в качестве антисмысловых олигонуклеотидов, несмотря на показанную совместимость с системой РНК-интерференции [52].

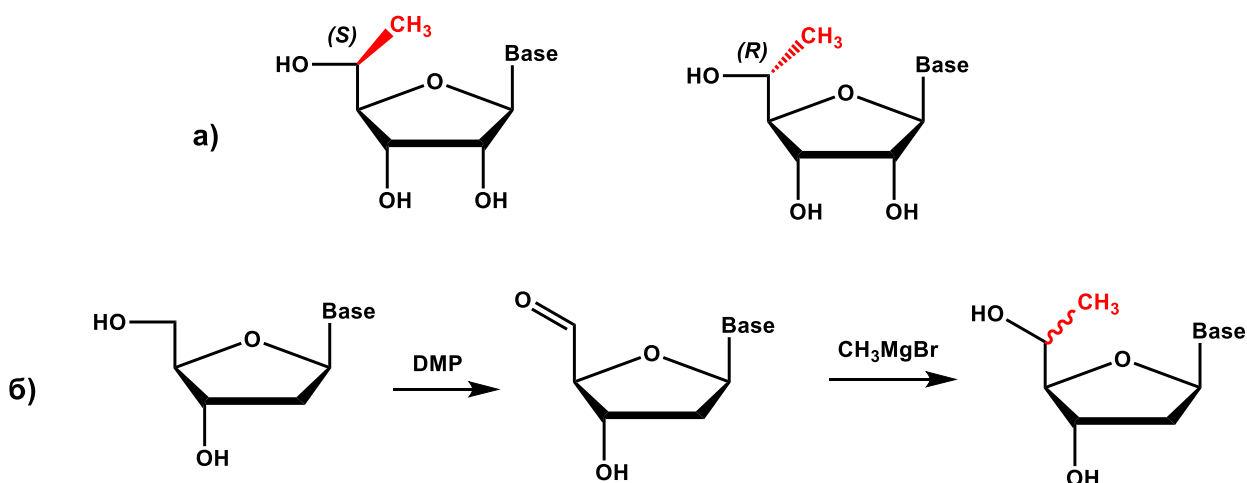


Рис. 11. Структуры (*R*)- и (*S*)-изомеров 5'-Me рибонуклеозидов (а); основные этапы синтеза 5'-модифицированных нуклеозидов на примере 5'-Me-2'-дезоксинуклеозида (б). Base – азотистое основание, DMP – периодинан Десса-Мертин (триацетат иодоксибензойной кислоты).

Специфические и достаточно селективные методики модификации углеводов позволили научному сообществу создать большое количество вариантов модифицированных остатков (дезокс)рибозы. Олигонуклеотиды, построенные на альтернативном сахаро-фосфатном остове с измененной углеводной частью, зачастую обладают совокупностью полезных свойств, что связано в первую очередь с изменением конформации углеводного звена. Возможность комбинации различных остатков сахаров в составе олигонуклеотида позволяет тонко настраивать желаемые свойства получаемой молекулы. Ряд олигонуклеотидов, содержащие модифицированные углеводные звенья, например, 2'-МОЕ нуклеотиды, уже рутинно применяются в качестве терапевтических агентов. Помимо рассмотренных структур, получаемых из (дезокс)рибозы, существует

также огромное множество циклических и ациклических остатков, часто имитирующих природные моносахариды, используемых для создания альтернативных сахаро-фосфатных остовов олигонуклеотидов с уникальными свойствами, например, пептидные нуклеиновые кислоты (PNA). Перечисленные факторы в совокупности с продолжающимися разработками новых типов олигонуклеотидов с альтернативным углеводным остовом указывают на актуальность данной области химии нуклеиновых кислот.

2.3. Методы получения фосфат-модифицированных олигонуклеотидов

Второй рассматриваемой группой структур, в составе которых могут присутствовать модификации, являются межнуклеотидные фосфатные группы. Основным подходом к получению модифицированных фосфатных групп в составе олигонуклеотида можно назвать подход, основанный на альтернативном окислении в ходе твердофазного амидофосфитного синтеза (см. Рис. 1). В рамках указанного подхода существует ряд методов, основанных на использовании различных окислительных агентов, и, в некоторых случаях, специальных мономеров с определенными защитными группами, совместимых со стандартным твердофазным синтезом, для получения соответствующих производных. Далее будут рассмотрены подобные методы получения модифицированных фосфатных групп в составе олигонуклеотида. Кроме того, в связи с нестандартностью используемых методов и неочевидностью протекания реакций с точки зрения амидофосфитного олигонуклеотидного синтеза, дополнительно будут рассмотрены механизмы различных вариантов альтернативного окисления. Для фосфат-модифицированных олигонуклеотидов, полученных с применением альтернативных мономеров при стандартном окислении в рамках амидофосфитного синтеза, будут рассмотрены схемы получения мономеров. При описании тех или иных НК-производных также будут перечислены их основные свойства и области применения.

2.3.1. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-S

2.3.1.1. Получение тиофосфатов

Одним из самых распространенных типов фосфат-модифицированных олигонуклеотидов, получаемых путем альтернативного окисления, являются тиофосфаты (рис. 12а). В структуре тиофосфатов в составе олигонуклеотида один из несвязывающих атомов кислорода заменен на атом серы, на котором сконцентрирован отрицательный заряд группы в связи с ее высокой поляризуемостью [53]. В качестве альтернативных окислителей для получения тиофосфатов используют т. н. сульфорирующие агенты. На ранних этапах развития методов синтеза тиофосфатных олигонуклеотидов, в качестве

сульфирующих агентов применялись такие соединения, как, например, фенилацетилдисульфид (PADS) и 3H-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксид (Beaucage reagent, реагент Бокажа) [54–57] (рис. 12б, 12в). Подобные реагенты позволяли с высокой эффективностью получать тиофосфатные группы в составе олигонуклеотидов различной длины. В частности, была показана возможность синтеза полностью модифицированного 20-звенного олигонуклеотида с выходом целевого продукта более 95% при использовании реагента Бокажа в качестве сульфирующего агента [55]. В настоящее время, в качестве основных сульфирующих агентов используются различные 3H-1,2,4-дителиазол-3-тионы, в частности N,N-диметил-N'-(3-тиооксо-3H-1,2,4-дителиазол-5-ил)метанимидаид (DDTT, в каталогах производителей – «Sulfurizing Reagent II», Рис. 12г) – по сравнению с ранее используемым реагентом Бокажа, данные соединения более эффективны в реакции окисления, в том числе для получения РНК и их модифицированных аналогов, а также более стабильны при хранении в растворе [58].

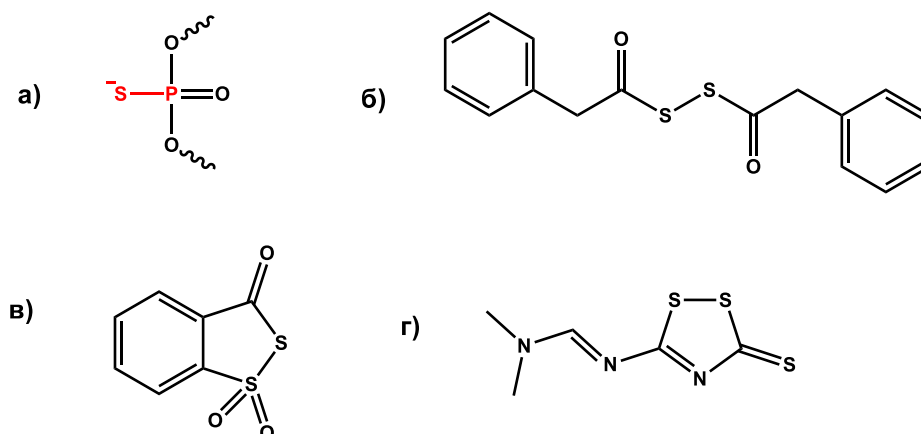


Рис. 12. Строение тиофосфатной группы в составе олигонуклеотида (а) и разных сульфирующих агентов для ее получения – фенилацетилдисульфида (б), 3H-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксида (реагент Бокажа, в), DDTT (Sulfurizing reagent II, г).

Механизм реакции окисления фосфит-триэфира до тиофосфатной группы схож для всех типов сульфирующих агентов. Первоначально происходит нуклеофильная атака неподеленной пары фосфора на атом серы в составе сульфирующего агента с образованием положительно заряженного интермедиата (P⁺-S) (Рис. 13а). Далее для разных сульфирующих агентов происходят специфические перегруппировки, приводящие к итоговой структуре тиофосфата (P=S) [54, 59–61]. Полный механизм сульфирования фосфит-триэфира на примере использования сульфирующего агента DDTT приведен на Рис. 13б [60]. Образование интермедиата в данном случае происходит при атаке неподеленной пары фосфора по атому серы во втором положении цикла. В результате

последующей перегруппировки от интермедиата отщепляется соответствующий тиокарбамоил изотиоцианат, и образуется итоговый тиофосфат.

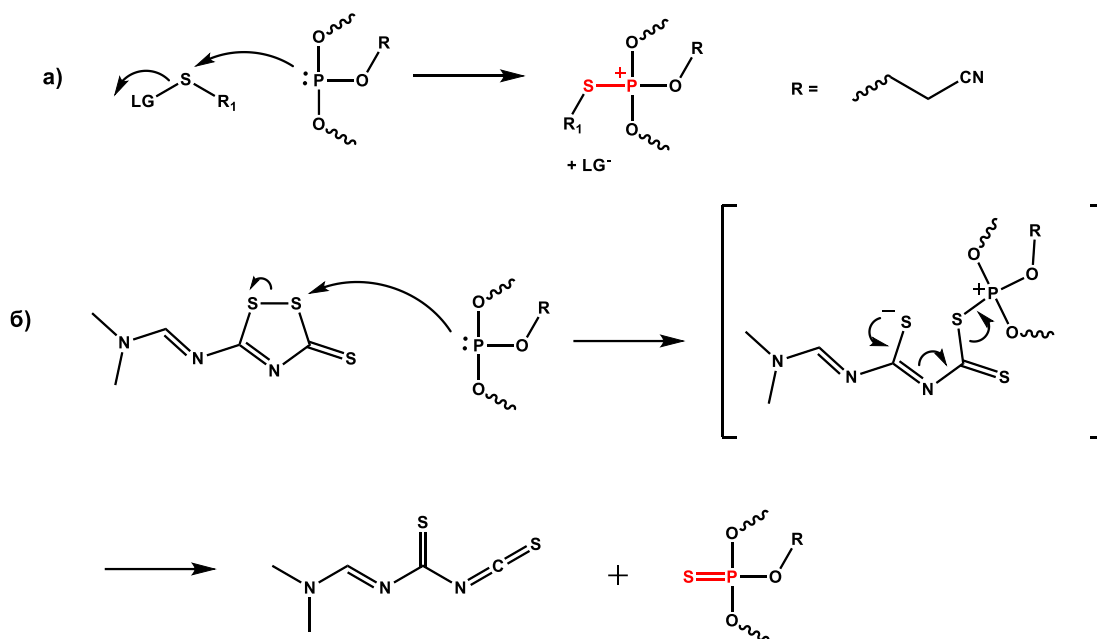


Рис. 13. Общая схема сульфирования фосфит-триэфира олигонуклеотида с образованием положительно заряженного интермедиата (P⁺-S) (а) и полный механизм сульфирования фосфит-триэфира олигонуклеотида реагентом DDTT (Sulfurizing reagent II) с образованием тиофосфатной группы (б). R₁ – заместитель, LG – уходящая группа.

Тиофосфатная группа в составе олигонуклеотидов является хиральным центром и представлена в виде двух стереоизомеров – *Sr* и *Rr* изомеров (Рис. 14а). Известно, что олигонуклеотиды, преимущественно содержащие разные стереоизомеры тиофосфатной группы обладают отличающимися свойствами. Так, например, олигонуклеотиды, содержащие преимущественно *Rr*-изомеры тиофосфатных звеньев, эффективнее связываются с РНК мишенью, а также с большей эффективностью распознаются РНКазой Н, однако сильнее подвержены ферментативному расщеплению. В то же время, олигонуклеотиды с *Sr*-изомерами тиофосфатов обеспечивают значительную нуклеазоустойчивость [62, 63]. Современные методы синтеза позволяют контролируемо получать тиофосфатные олигонуклеотиды с определенной конфигурацией каждой тиофосфатной группы, обладающие уникальными свойствами. Для этого, например, используют специализированные мономеры с оптически чистой амидофосфитной компонентой (Рис. 14б) [64]. Стоит также отметить, что тиофосфатные олигонуклеотиды обладают улучшенным проникновением в клетку и биораспределением по сравнению с немодифицированными аналогами в связи с повышенным взаимодействием с белками клеточной мембраны и плазмы крови соответственно [65, 66]. В то же время, связывание

тиофосфатных олигонуклеотидов с белками носит в целом неспецифический характер, что обуславливает их повышенную токсичность [67].

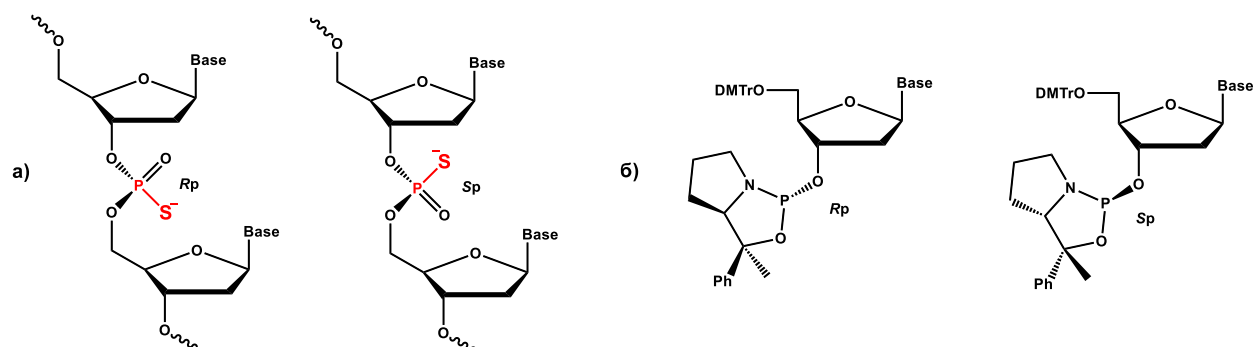


Рис. 14. Структуры стереоизомеров тиофосфатной группы в составе олигонуклеотида (а) и строение стереоспецифичных мономеров для получения оптически чистых тиофосфатных олигонуклеотидов (б).

Base – азотистое основание; DMTr – 4,4'-диметокситригильная группа.

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

2.3.1.2. Получение дитиофосфатов

К другому типу фосфатных модификаций, содержащих связь P-S, можно отнести дитиофосфаты, в которых оба несвязывающих атома кислорода заменены на атомы серы (Рис. 15а). При получении данных производных используются не только сульфлирующие агенты (см. выше) на стадии окисления, но и специфические мономеры в виде тиамидофосфитов на стадии конденсации. Получение тиамидофосфитных мономеров протекает в две ключевые стадии, включающие взаимодействие нуклеозида с бис-пирролидинохлорфосфином и замещение одного из пирролидиновых остатков на (S-бензоил)этилендитиол (Рис. 15б) [68]. Упрощенная схема получения дитиофосфатного звена олигонуклеотида приведена на Рис. 15в. В ходе конденсации тиамидофосфитного мономера с предыдущим звеном олигонуклеотида, образуется тиофосфит-триэфир, который в ходе дальнейшего сульфирования стандартными агентами превращается в дитиофосфат, содержащий защитную β-тиобензоильную группу. При деблокировании олигонуклеотида в щелочной среде, защитная группа с дитиофосфата удаляется с получением итогового дитиофосфатного звена [69].

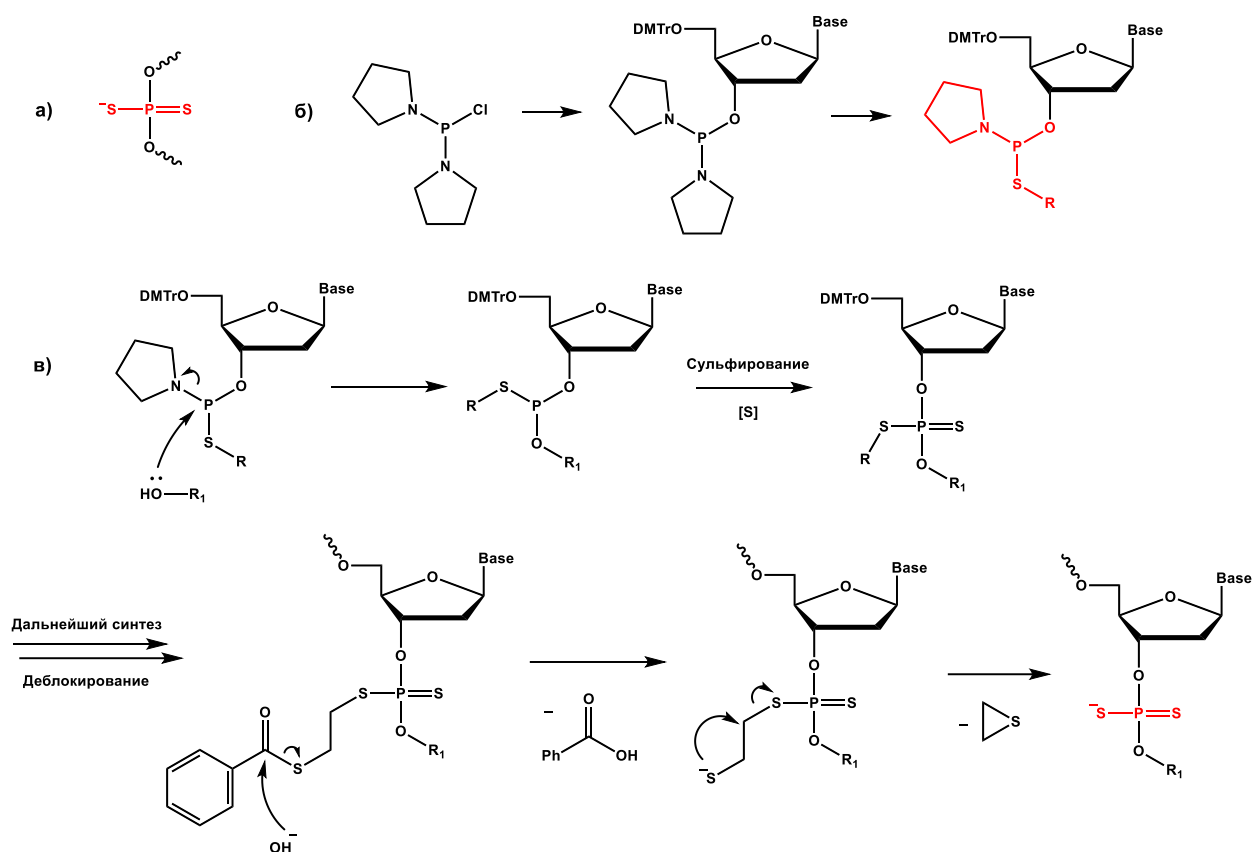


Рис. 15. Структура дитиофосфатной группы (а) и схемы получения тиоамидофосфитного мономера (б) и дитиофосфатной группы в составе олигонуклеотида (в). Base – азотистое основание; R – β -(тиобензоил)этильная группа; R₁OH – олигонуклеотидная цепь со свободным 5'-концом; DMTr – 4,4'-диметокситритильная группа.

Замена второго немостикуемого атома кислорода на атом серы в еще большей степени повышает поляризуемость модифицированной фосфатной группы, что может в значительной мере усиливать взаимодействие соответствующих олигонуклеотидов с белками [70]. В связи с этим, дитиофосфатные олигонуклеотиды нашли применение в качестве аптамеров к различным белковым мишеням, таким как, например, тромбин и обратная транскриптаза ВИЧ [69, 70]. Также было продемонстрировано, что введение всего одного дитиофосфатного нуклеотида в состав siРНК в значительной степени увеличивает эффективность образования комплекса RISC и РНК-интерференции [71]. При использовании дитиофосфатных олигонуклеотидов в качестве антисмысловых конструкций, эффективность рекрутирования РНКазы Н и расщепления РНК мишени падает с увеличением количества дитиофосфатных модификаций, что обусловлено, вероятно, сильным связыванием олигонуклеотидов с РНКазой Н [72].

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

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

2.3.1.3. Получение тиолофосфатов

Помимо (ди)тиофосфатных олигонуклеотидов, содержащих атомы серы вместо несвязывающих атомов кислорода, описаны также тиолофосфатные производные, в составе которых атом серы связывает фосфатную группу и нуклеозид в НК-цепи. В зависимости от расположения атома серы в фосфатной группе, выделяют 5'- и 3'-тиолофосфаты (Рис. 16а) [73, 74]. В отличие от тиофосфатных производных, синтезируемых с применением метода альтернативного окисления, для получения тиолофосфатов используют специальные мономеры. При этом для получения 5'-тиолофосфатной группы используют тритилированные 5'-тиоамидофосфитные нуклеозиды, а для введения 3'-тиолофосфатной группы – 3'-тиоамидофосфитные мономеры (Рис. 16б) [75–77]. Синтез 5'-тиоамидофосфитного мономера протекает в несколько стадий, ключевой из которых является активация 5'-гидроксильной группы путем тозилрования и ее дальнейшее замещение на трифенилметилмеркаптан (Рис. 16в) [76]. Получение 3'-тиоамидофосфитных мономеров основано на проведении последовательности таких принципиальных реакций, как введение защищенного тиола по 3'-положению нуклеозида с обращенной конформацией, деблокирование защитной группы тиола и присоединение к тиольной группе фосфитилирующей компоненты. Пример такой схемы с конкретными соединениями представлен на Рис. 16г [77].

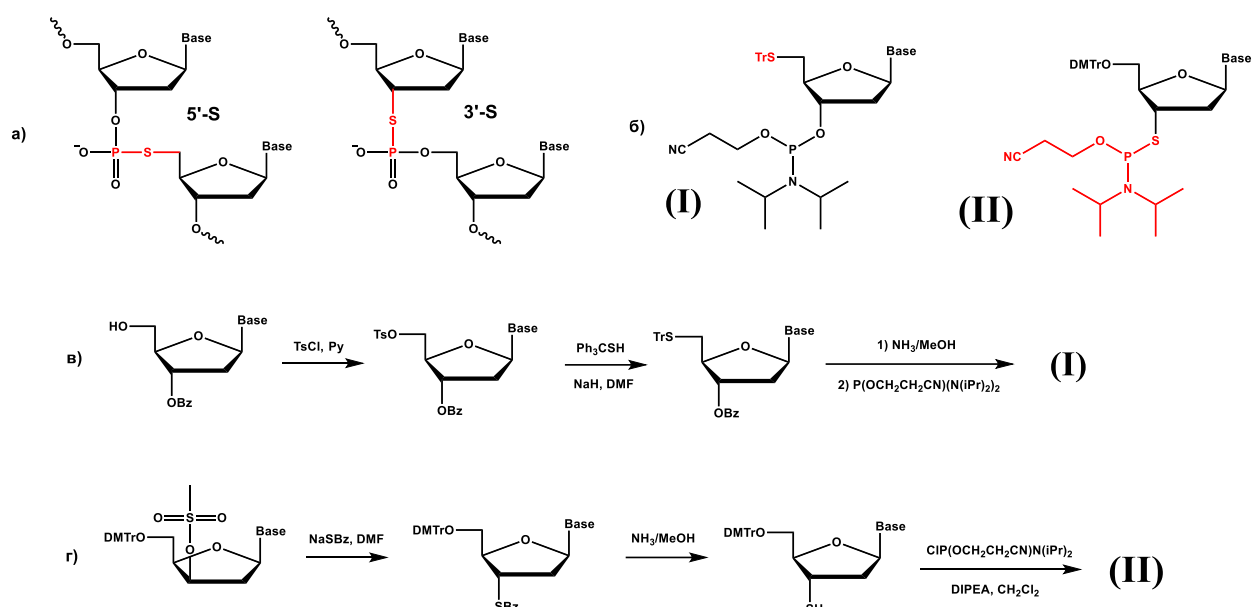


Рис. 16. Структура 5'- и 3'-тиолофосфатной группы (а), тритилированного 5'-тиоамидофосфитного и 3'-тиоамидофосфитного мономеров (б) и схемы получения представленных мономеров соответственно (в, г). Base – азотистое основание; Tr – тритильная группа; DMTr – 4,4'-диметокситритильная группа; Bz – бензоильная группа; Ts – пара-толуолсульфонилхлоридная группа; DIPEA – N,N-диизопропилэтиламин.

5'- и 3'-тиолофосфаты нашли применение в качестве удобных инструментов для детального изучения различных молекулярных механизмов, включающих реакции нуклеазного расщепления [77]. Так, например, при включении 5'-тиолофосфатной группы в субстрат для ДНК-топоизомеразы I после реакции расщепления образуется 5'-тионуклеозид на конце одной из цепей, который препятствует дальнейшему сшиванию цепей [78]. Введение 3'-тиолофосфатной группы в субстрат для рестриктазы *EcoRV* по месту расщепления практически полностью блокирует реакцию рестрикции [79]. Использование подобных «суицидальных» субстратов позволяет кратно замедлить скорость ферментативных реакций и более детально исследовать их механизмы. Стоит также отметить, что с использованием субстратов с 3'-тиолофосфатной группой на основании теории жесткости-мягкости кислот и оснований (ЖМКО) была определена ключевая роль взаимодействия различных ионов металлов с уходящей 3'-группой нуклеозида в реакции нуклеазного расщепления [80].

Тиолофосфатные олигонуклеотиды могут быть использованы и в качестве антисмысловых конструкций [74], однако их низкая стабильность *in vivo* сильно ограничивает их применение в этой области.

2.3.2. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-B

Достаточно изученным с точки зрения синтеза и разнообразия практических приложений можно назвать класс боранофосфатных олигонуклеотидов (Рис. 17а). В связи с электрондефицитным характером бораногруппы, в соответствующих производных она обладает отрицательным зарядом [81]. По аналогии с тиофосфатными производными, для получения боранофосфатной группы в составе олигонуклеотида на стадии окисления фосфит-триэфирной группы используют различные боронирующие агенты. В качестве таких агентов выступают комплексы гидрида бора с различными стабилизирующими молекулами нуклеофильной природы, такими как, например, N,N-диизопропилэтиламин (DIPEA), диметилсульфид (Me₂S), тетрагидрофуран (THF) [81–83]. Реакция боронирования заключается в нуклеофильной атаке неподеленной парой атома фосфора комплекса гидрида бора. В связи с электрондефицитным характером бораногруппы, в результате реакции образуется устойчивый интермедиат четырехкоординационного фосфора. После удаления защитной группы в ходе финального деблокирования олигонуклеотида в основной среде, интермедиат переходит в пятивалентное состояние, приобретая отрицательный заряд (Рис. 17б) [84].

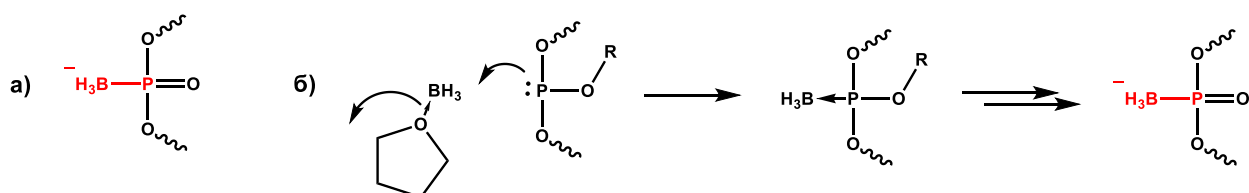


Рис. 17. Структура боранофосфатной группы (а) и механизм боронирования фосфит-триэфира олигонуклеотида на примере использования комплекса $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ (б). R – β -цианоэтильная группа.

Довольно продолжительное время основным препятствием на пути к полностью автоматизированному высокоэффективному синтезу боранофосфатных олигонуклеотидов являлась несовместимость бораногруппы со стандартными реагентами и защитными группами твердофазного амидофосфитного синтеза. В частности, известно, что боранофосфотриэфирный интермедиат способен деблокировать защитные амидные группы в составе азотистых оснований, а также данный интермедиат деградирует при взаимодействии с диметокситритильным катионом [85]. В связи с этим, стандартный амидофосфитный метод был несколько модернизирован, и в настоящее время для автоматического синтеза боранофосфатных олигонуклеотидов используется адаптированная схема со следующими ключевыми изменениями. В качестве защитных группировок экзоциклических групп азотистых оснований используют ди-*трет*-

бутилизобутилсилильные группы, стабильные в ходе синтеза и удаляемые в присутствии ионов фтора (Рис. 18а). При проведении деблокирования диметокситритильной группы к раствору кислоты добавляют триметилфосфит боран в качестве молекулы-«захватчика» диметокситритильных катионов (trityl scavenger, Рис. 18б) [84]. Применение такой адаптированной схемы позволяет получать боранофосфатные олигонуклеотиды с высокой эффективностью без образования побочных продуктов.

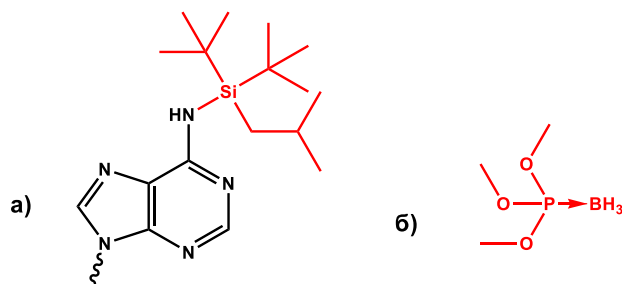


Рис. 18. Строение ключевых элементов при проведении автоматического синтеза боранофосфатных олигонуклеотидов – ди-трет-бутилизобутилсилильной защитной группы в составе одного из азотистых оснований (а) и триметилфосфит борана, «захватчика» тритильных катионов (trityl scavenger) (б).

Интересной особенностью боранофосфатных групп олигонуклеотидов является возможность их дальнейшей функционализации в рамках автоматического синтеза. Так, например, был предложен метод введения в состав боранофосфатной группы остатка пиридина [86]. Для получения подобных производных, боранофосфат обрабатывают смесью пиридина и N-иодсукцинимидом, содержащей активный пиридиний-йодид, который атакуется бораногруппой, в результате чего образуется цвиттер-ионная пиридиний боранофосфатная модификация (Рис. 19). Для пиридиний боранофосфатных олигонуклеотидов была показана высокая эффективность проникновения через клеточные мембраны, а также восстановления ионов металлов [86].

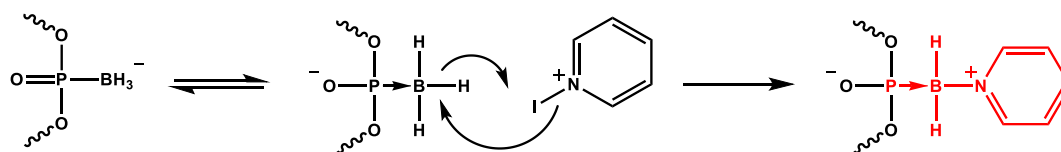


Рис. 19. Схема получения цвиттер-ионной пиридиний-боранофосфатной модификации.

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

тиофосфатных аналогов [87]. Кроме того, боранофосфатные siРНК проявляют эффект подавления генов даже в виде одной антисмысловой цепи с эффективностью на уровне немодифицированной двуцепочечной siРНК. Боранофосфатные олигонуклеотиды стабильны к нуклеазному расщеплению, а также эффективно проникают через клеточные мембраны, что повышает их общую эффективность при использовании в качестве siРНК конструкций [88, 89]. При определенном паттерне боранофосфатных модификаций, соответствующие производные можно использовать, как антисмысловые олигонуклеотиды с высокой эффективностью рекрутирующие РНКазу H [88]. За последнее время также были разработаны методы получения оптически чистых боранофосфатных олигонуклеотидов, при этом в ходе их получения используются такие же стереоспецифические мономеры, как и в случае тиофосфатных производных (см. Рис. 14). Контролирование оптической чистоты позволяет тонко настраивать некоторые свойства получаемых боранофосфатных олигонуклеотидов, например, термическую стабильность их дуплексов с ДНК/РНК [90, 91].

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

2.3.3. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь Р-С

2.3.3.1. Получение метилфосфонатов

С-фосфонаты олигонуклеотидов, наряду с тиофосфатами и боранофосфатами, представляют собой один из первых открытых классов фосфат-модифицированных олигонуклеотидов. Самым изученным представителем С-фосфонатов олигонуклеотидов можно назвать метилфосфонаты (Рис. 20а) [92]. При получении метилфосфонатов в настоящее время используются специальные амидофосфиновые мономеры, которые в ходе присоединения к растущей олигонуклеотидной цепи и дальнейшего стандартного окисления молекулярным иодом превращаются в метилфосфонатные звенья (Рис. 20б) [93–95]. Получение амидофосфиновых мономеров содержит две ключевые стадии, а именно присоединение дихлорметилфосфина к 3'-ОН группе нуклеозида и введение остатка диизопропиламина по фосфитной компоненте (Рис. 20в) [94, 95]. Метилфосфонатные звенья устойчивы в ходе амидофосфитного синтеза, однако при стандартном отщеплении метилфосфонатных олигонуклеотидов от твердофазного носителя концентрированным раствором аммиака может происходить их деградация. В связи с этим, для отщепления метилфосфонатных олигонуклеотидов используют растворы этилендиамина в присутствии

небольшого количества аммиака для деблокирования защитных групп азотистых оснований [96, 97].

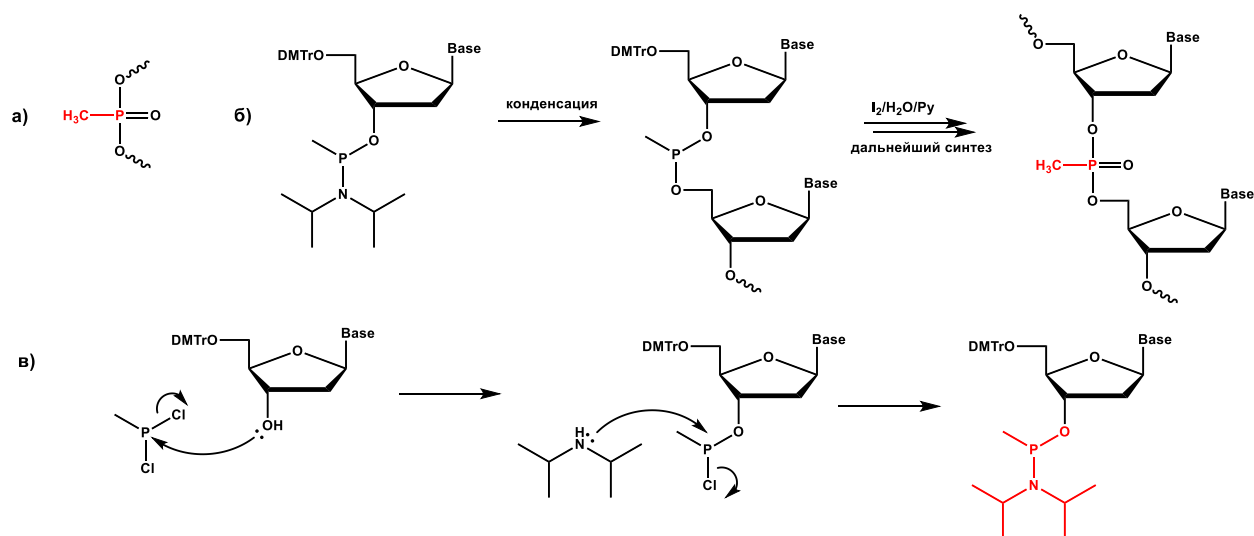


Рис. 20. Структура метилфосфонатного звена (а) и схемы получения метилфосфонатного звена в составе олигонуклеотида (б) и амидофосфинового мономера (в). Base – азотистое основание; DMTr – 4,4'-диметокситритильная группа.

Метилфосфонатные группы в составе олигонуклеотидов не заряжены, а также представлены в виде двух диастереомеров [98], что обуславливает ряд их специфических свойств. Так, например, в сравнении с нативными олигонуклеотидами, метилфосфонатные аналоги образуют более стабильные дуплексы в В-форме с ДНК, однако дуплексы с РНК в А-форме менее стабильны. Кроме того, *Rp*-изомер метилфосфонатной группы в большинстве случаев повышает или не меняет температуру плавления дуплекса, в то время как *Sr*-изомер в значительной мере снижает ее [93, 98, 99]. Наблюдаемые эффекты связаны с совокупностью факторов, а именно с переходом метилфосфонатной группы в наиболее энергетически выгодную конформацию в дуплексе и нивелированием электростатического отталкивания цепей дуплекса за счет нейтрализации заряда фосфатной группы. Вследствие нейтрального заряда метилфосфонатных групп, соответствующие олигонуклеотиды не распознаются нуклеазами и гидролитически стабильны в организме, и в то же время не способны активировать РНКазу Н [92, 95].

Несмотря на ряд полезных свойств, повышающих терапевтический потенциал, а также оптимизированные протоколы синтеза, метилфосфонаты не нашли широкого применения, что связано со значительной вариабельностью свойств *Rp*- и *Sr*-диастереомеров и затруднительностью получения оптически чистых олигонуклеотидов, а также малой растворимостью в воде за счет отсутствия заряда.

2.3.3.2. Получение этинилфосфонатов

Еще одним известным типом С-фосфонатов являются алкинилфосфонаты, содержащие группы с тройной связью углерод-углерод при атоме фосфора, в частности этинильную группу (Рис. 21а) [100]. Для введения таких групп в состав олигонуклеотидов необходимо использовать специальные мономеры, синтез которых протекает в несколько стадий со следующими принципиальными этапами. К исходному соединению в виде бис(N,N-диизопропиламино)хлорфосфина присоединяют этинильную группу по реакции Гриньяра с использованием этинил магний бромид, или при взаимодействии с ацетилинидом натрия [101]. Далее полученный алкин-содержащий амидофосфин присоединяют к 5'-защищенному нуклеозиду с получением финальной структуры мономера (Рис. 21б) [100]. Синтез этинилфосфонатных олигонуклеотидов происходит по стандартным протоколам за исключением стадии деблокирования с полимерного носителя, которую, по аналогии с метилфосфонатами, проводят в растворе этилендиамина в толуоле во избежание деградации фосфонатной группы.

Этинилфосфонатные олигонуклеотиды как индивидуальные соединения практически не используются для различных исследований, но выступают в качестве предшественника для получения других производных. Так, этинилфосфонатная группа олигонуклеотида может быть использована для присоединения различных органических азидов по реакции азид-алкинового циклоприсоединения с получением 1,2,3-триазилилфосфонатов (Рис. 21в). По такой схеме были получены триазилилфосфонаты, содержащие, например, остатки триметилсилана, триметилэтиламмония, различных аминокислот и пептидов, несущих положительный заряд [100, 102].

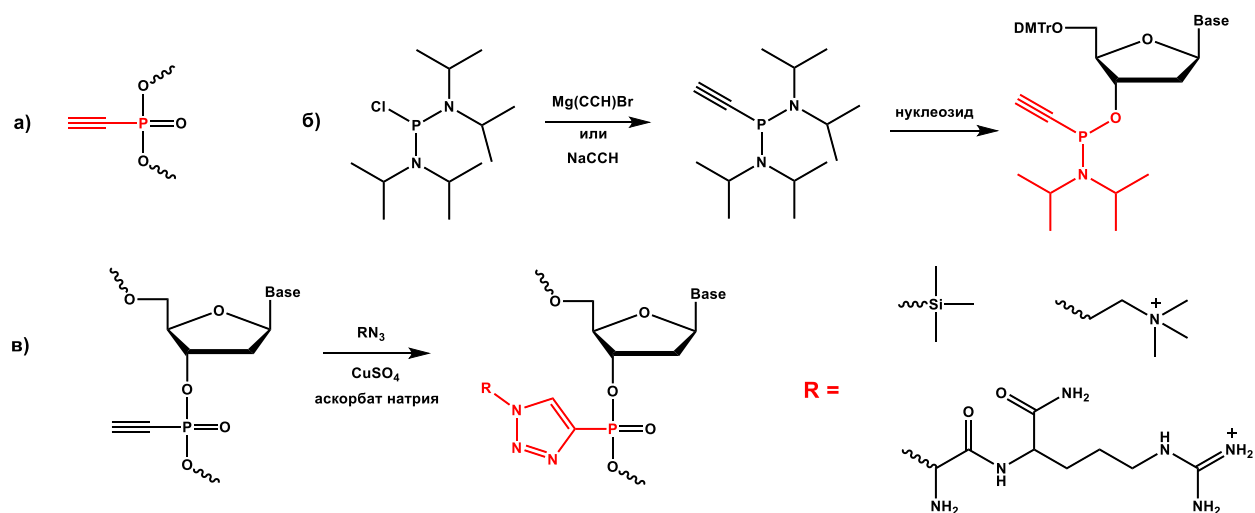


Рис. 21. Структура этинилфосфонатного звена (а), схема получения этиниламидофосфинового мономера (б) и схема получения 1,2,3-триазилилфосфонатного звена олигонуклеотида (в). Base – азотистое основание; DMTro – 4,4'-диметокситритильная группа.

Наличие 1,2,3-триазолилфосфонатной группы в составе олигонуклеотида несколько снижает его аффинность к комплементарной РНК и температуру плавления соответствующего дуплекса, что связано, вероятно, с объемом такой группы и жесткостью триазолового остова. В то же время введение 1,2,3-триазолилфосфонатных групп в район 5'- и 3'-концов олигонуклеотида значительно усиливает его нуклеазоустойчивость, и, кроме того, повышает эффективность проникновения в клетки в отсутствие агентов доставки, что особенно выражено для 1,2,3-триазолилфосфонатов, несущих остатки аргинин- и лизин-богатых пептидов. Также было показано, что 1,2,3-триазолилфосфонаты с положительно заряженными пептидными остатками могут выступать в качестве анти-микроРНК [100, 102].

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

2.3.3.3. Получение отрицательно заряженных С-фосфонатов

Другая группа С-фосфонатов состоит из производных, одновременно содержащих связь Р-С и несущих отрицательный заряд. К таким С-фосфонатам относятся, например, фосфоноацетаты и их серосодержащие аналоги тиофосфоноацетаты (Рис. 22а) [103]. По аналогии с метилфосфонатами, для синтеза (тио)фосфоноацетатных производных необходимо использовать соответствующие амидофосфиновые мономеры. Схема получения таких мономеров содержит большое количество стадий со следующими ключевыми элементами. Ацетатную группу в виде сложного эфира бромацетата присоединяют к фосфорной компоненте в виде *бис*(N,N-диизопропиламино)хлорфосфина по реакции Реформатского в присутствии металлического цинка в качестве катализатора. Далее происходит присоединение получившегося диаминофосфина к 3'-ОН группе нуклеозида с получением итогового мономера (Рис. 22б). Полученные мономеры используют в амидофосфитном синтезе с адаптированными протоколами. В частности, на этапе окисления до фосфоноацетатной группы используют более мягкий окислитель в виде производного камфоры во избежание деградации межнуклеотидного звена; при этом

тиофосфоацетатные группировки получают с использованием в качестве окислителя реагента Бокажа. Кроме того, в составе фосфоацетата присутствует защитная α,α -диметил- β -цианоэтильная группа, селективно удаляемая в безводных условиях в присутствии 1,8-дiazобисцикло[5.4.0]ундец-7-ена (DBU), что предотвращает деградацию фосфоацетата при стандартном деблокировании олигонуклеотида в водном растворе аммиака (Рис. 22в).

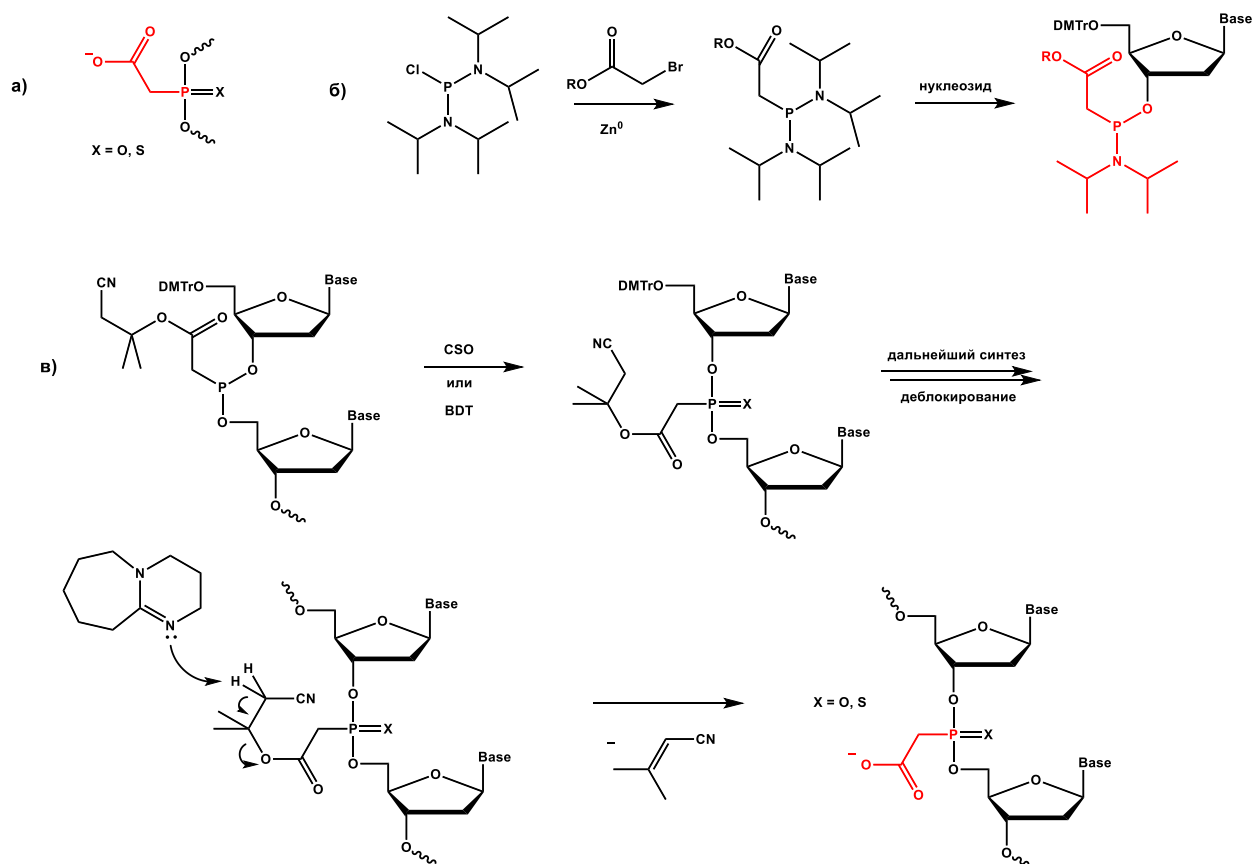


Рис. 22. Структура (тио)фосфоацетатного звена (а) и схемы получения амидоацетилфосфинового мономера (б) и (тио)фосфоацетатного звена в составе олигонуклеотида (в). Base – азотистое основание; DMTг – 4,4'-диметокситригильная группа; R = α,α -диметил- β -цианоэтил; CSO – (1S)-(+)-(10-камфоросульфони)оксазирин; BDT – 3-*H*-1,2-бензодитиол-3-он-1,1-диоксид (реагент Бокажа).

В случае замены диметилцианоэтильной защитной группы в составе амидоацетилфосфинового мономера на другие группы, нерасщепляемые в условиях твердофазного синтеза, возможно создание сложных эфиров фосфоацетатов [104]. Для ряда таких производных, содержащих пивалоильные группы (Рис. 23), была продемонстрирована высокая эффективность проникновения через клеточную мембрану в отсутствие трансфектантов. В экспериментах *in vitro* сложноэфирная группа в составе

модифицированных фосфоацетатов практически количественно расщеплялась эстеразой из печени свиньи (porcine liver esterase, PLE), что указывает на возможность использования таких производных в качестве про-лекарств (pro-drug).

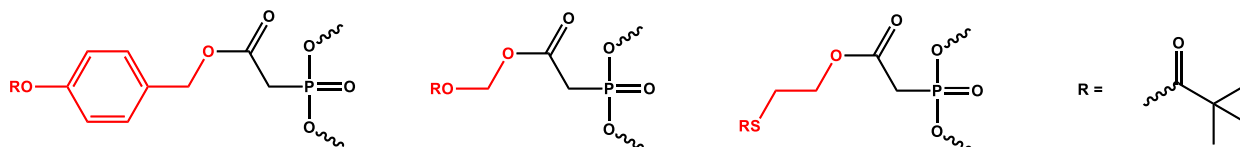


Рис. 23. Примеры структур сложных эфиров фосфоацетатов, содержащих пивалоильные группы.

В связи с сочетанием в структуре фосфоацетатов незаряженной связи P-C и отрицательно заряженной ацетатной группой, данные производные обладают необычной комбинацией свойств. Так, фосфоацетаты стабильны к ферментативному гидролизу различными нуклеазами и в то же время способны эффективно активировать РНКазу H для расщепления последовательности мишени, чему способствует образование прочного дуплекса с РНК в А-форме [105]. Введение нескольких (тио)фосфоацетатных групп в состав различных антисмысловых конструкций повышает эффективность их действия. Например, модифицированные фосфоацетатными группами siРНК показали высокую степень расщепления мишени в двойном люциферазном тесте, а в одноцепочечном состоянии подобные олигонуклеотиды выступали в качестве эффективного ингибитора микроРНК 122 [106]. Тиофосфоацетатные группы в составе соответствующих конструкций способны улучшать действие антисмысловых олигонуклеотидов, блокирующих экспрессию генов, а также sgРНК для редактирования генома с применением системы CRISPR/Cas9 [107, 108].

Другим типом отрицательно заряженных С-фосфонатов являются фосфоформиаты (Рис. 24а) [109]. Как и в случае фосфоацетатов, для синтеза фосфоформиатов необходимо использование специальных мономеров. К основным этапам получения амидоформилфосфиновых мономеров можно отнести восстановление бис(N,N-диизопропиламино)хлорфосфина до соответствующего N-фосфина алюмогидридом лития, присоединение к фосфину сложного эфира хлорформиата в присутствии металлического натрия, и присоединение нуклеозида с получением итоговой структуры мономера (Рис. 24б). Стоит отметить, что фосфоформиатная группа достаточно лабильна в условиях амидофосфитного синтеза и стандартного деблокирования в водных щелочных растворах, в связи с чем в ее состав вводят (дифенилметил)силэтильную группу, селективно удаляемую в присутствии фторид-ионов. Такая неустойчивость фосфоформиатной группы накладывает дополнительные

ограничения и на другие защитные и отщепляемые группы, используемые в амидофосфитном синтезе, вследствие чего для получения фосфоформатных олигонуклеотидов необходимо использовать альтернативные структуры защитных групп азотистых оснований и линкера, связывающего олигонуклеотид с твердофазным носителем.

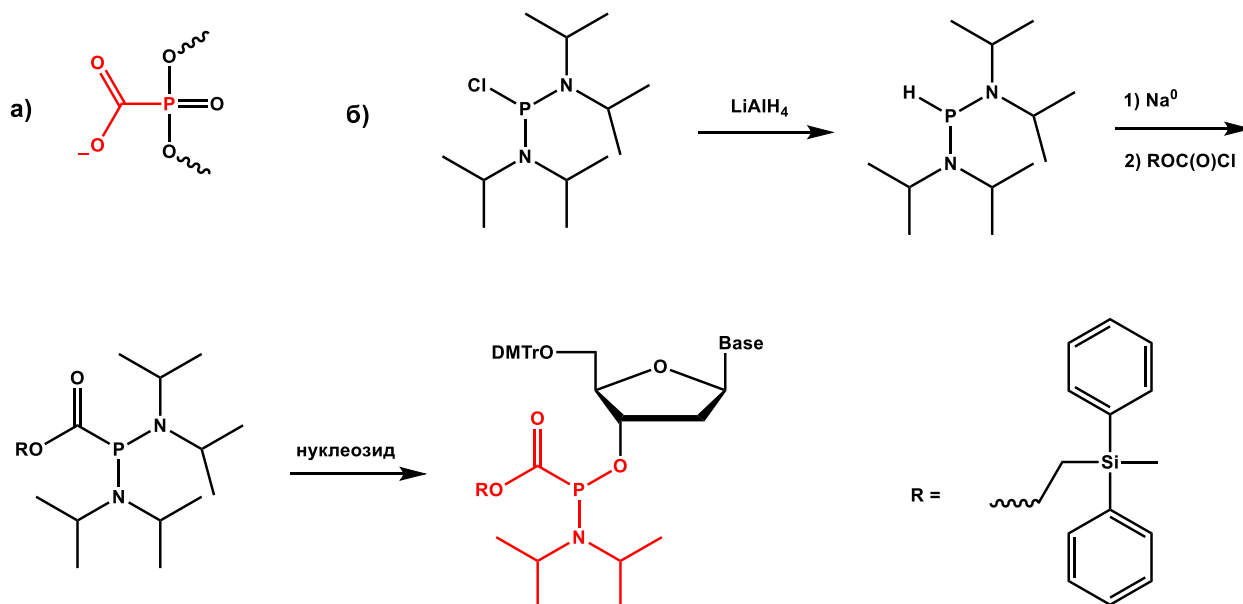


Рис. 24. Структура фосфоформатного звена (а) и схема получения амидоформилфосфинового мономера (б). Base – азотистое основание; DMTro – 4,4'-диметокситритильная группа.

Для фосфоформатных олигонуклеотидов была показана полная стабильность к нуклеазной деградации, что, как и для всех С-фосфонатных производных, связано с отсутствием заряда в связи Р-С. Фосфоформатные производные способны образовывать дуплексы А-формы с комплементарной РНК, при этом введение фосфоформатных групп несколько повышает температуру плавления гибрида. Интересно, что несмотря на наличие отрицательного заряда в фосфоформатной группе, полностью модифицированные фосфоформаты не способны активировать РНКазу Н. В то же время фланкирование немодифицированного ДНК олигонуклеотида фосфоформатными группами в разы повышает эффективность РНКазы Н опосредованной деградации мишени [109].

Фосфоацетатные и фосфоформатные модификации могут наделять олигонуклеотиды уникальной комбинацией свойств, что было продемонстрировано в ряде исследований. Однако необходимость трудоемкого синтеза фосфиновых мономеров и значительного изменения протоколов твердофазного амидофосфитного синтеза затрудняют проведение биологических исследований и сильно ограничивают применение подобных олигонуклеотидов в качестве потенциальных терапевтических агентов.

2.3.4. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-O-R

Олигонуклеотидные производные, содержащие третью связь типа P-O-R в дополнение к двум элементам фосфодиэфирной группы, связывающих нуклеозиды между собой, называют фосфотриэфирными олигонуклеотидами (Рис. 25а). Для получения фосфотриэфирных производных используют амидофосфитные мономеры с алкильным заместителем отличным от остатка β -цианоэтила при атоме кислорода в фосфорной компоненте; получение таких мономеров полностью идентично синтезу стандартных амидофосфитных мономеров (Рис. 25б). Фосфотриэфирные олигонуклеотиды крайне неустойчивы в щелочной среде, поэтому их деблокирование с твердофазного носителя проводят в очень мягких условиях в растворе диизопропиламина в метаноле [110]. В связи с этим необходимо использовать альтернативные *N*-трет-бутилфеноксиацетильные защитные группы для азотистых оснований, так же отщепляемые в этих условиях [111].

В качестве функциональных групп в состав фосфотриэфиров обычно вводят различные гидрофобные и положительно заряженные остатки, такие как, например, *N*-бензилоксикарбонильные группы, диаминогруппы, *S*-ацил-2-тиоэтильные (SATE) остатки (Рис. 25в) [110–112]. Такие группы в составе олигонуклеотидов обеспечивают их пассивную трансфекцию в клетки без использования агентов-доставщиков, а также препятствуют их расщеплению нуклеазами [111]. Известна также стратегия использования фосфотриэфирных олигонуклеотидов, несущих SATE-группы, в качестве про-лекарств – присутствующий в клетках фермент цитоплазматическая тиоэстераза способен расщеплять тиоэфирные связи, после чего происходит перегруппировка с отщеплением молекулы эписульфида и получением нативного фосфодиэфирного олигонуклеотида (Рис. 25г) [110, 113]. Такая стратегия была реализована на примере модельной siРНК, которая показала высокую эффективность РНК-интерференции за счет наличия SATE-групп, обеспечивающих самостоятельное проникновение siРНК в клетки и ее улучшенное связывание с сывороточным альбумином [110].

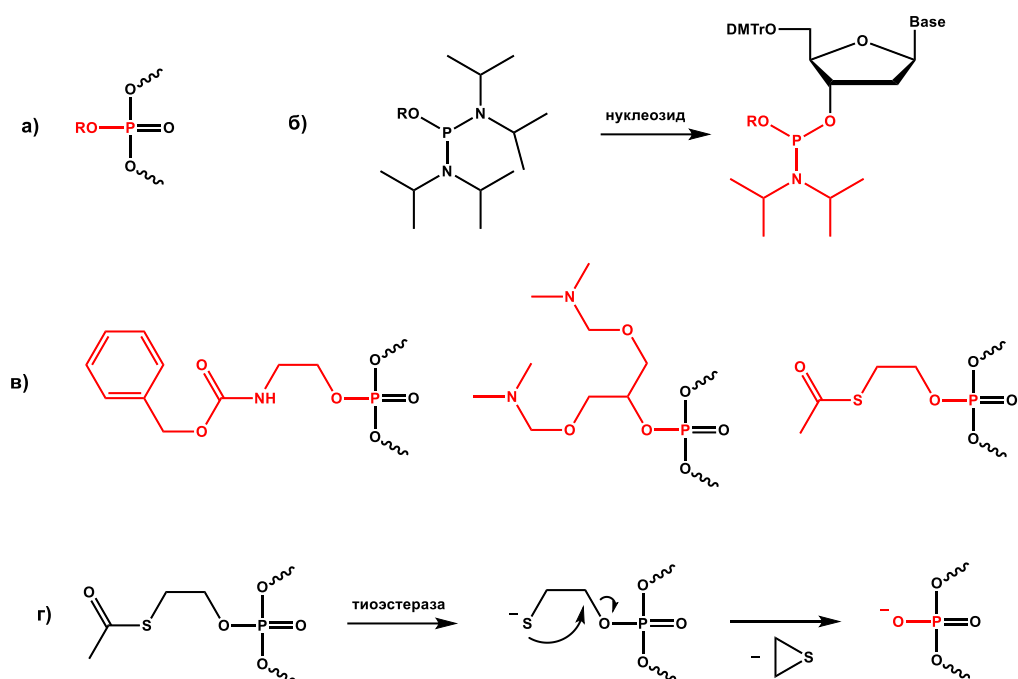


Рис. 25. Структуры фосфотриэфирного звена (а), амидофосфитного мономера с альтернативным алкоксильным заместителем (б), примеров фосфотриэфирных групп в составе олигонуклеотида (в) и схема ферментативного расщепления S-ацил-2-тиоэтильной (SATE) группы (г). Base – азотистое основание; DMTr – 4,4'-диметокситритильная группа; R – функциональный неотщепляемый заместитель.

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

2.3.5. Получение модифицированных олигонуклеотидов, содержащих связь P-N

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

Первый способ заключается в окислении фосфит-триэфира олигонуклеотида иодом в присутствии различных аминов [114–117]. Данный способ по сути является вариацией процесса окисления в амидофосфитном синтезе, в котором в окисляющей смеси в качестве нуклеофила применяют амины вместо стандартно используемой воды. Механизм указанного процесса состоит из нескольких стадий. На первой стадии неподеленная пара атома фосфора в составе фосфит-триэфира атакует молекулу иода с образованием положительно заряженного интермедиата ($\text{P}^+\text{-I}$). Далее происходит замещение атома иода

на остаток амина, протекающее практически одновременно с элиминированием β -цианоэтильной защитной группы, в результате чего образуется искомая амидофосфатная группа (Рис. 26а). Стоит отметить, что интермедиат (P^+-I) крайне неустойчив, однако стабильность промежуточного соединения можно повысить путем его перевода в иодангидридное состояние ($O=P-I$) в ходе предварительного элиминирования защитной группы. Для селективного получения такого интермедиата в олигонуклеотидном синтезе используют амидофосфитные мономеры с более лабильными защитными группами, например, *трет*-бутильными, которые могут быть легко удалены по реакции Арбузова (Рис. 26б) [114].

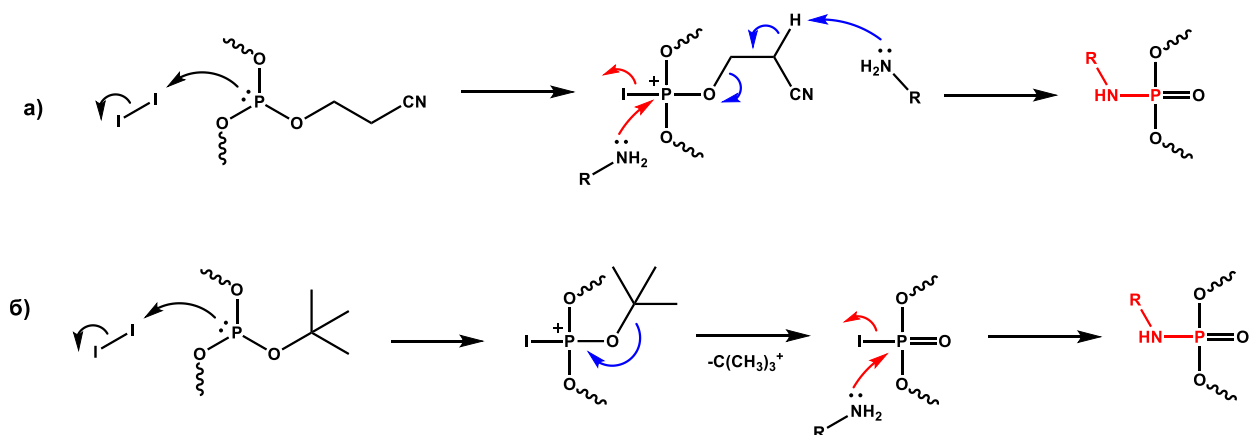


Рис. 26. Механизмы получения амидофосфатных групп при окислении фосфит-триэфиров молекулярным иодом, протекающие через образование положительно заряженного интермедиата типа (P^+-I) (а) и ангидридного интермедиата типа ($O=P-I$) (б). Красными стрелками обозначены реакции замещения амином, синими – реакции удаления защитных групп. R – функциональный заместитель.

Второй способ получения амидофосфатов основан на реакции Штаудингера – окислении фосфит-триэфиров органическими азидами [116–119]. В ходе реакции Штаудингера на первом этапе неподеленная пара атома фосфора атакует терминальный атома азота в составе азида с образованием фосфазида. На следующем этапе происходит циклизация фосфазида с образованием крайне неустойчивого четырехчленного интермедиата, который быстро распадается до фосфазена, содержащего связь $P=N$, с выделением молекулы азота (Рис. 27а) [120]. Фосфазены в значительной степени подвержены гидролизу, в ходе которого происходит образование фосфата и амина [121]. Тем не менее при синтезе олигонуклеотидов возможен селективный перевод лабильного фосфазена в необходимую амидофосфатную группу путем проведения отдельного этапа элиминирования β -цианоэтильной защитной группы обычно в присутствии третичных аминов (Рис. 27б) [119, 122].

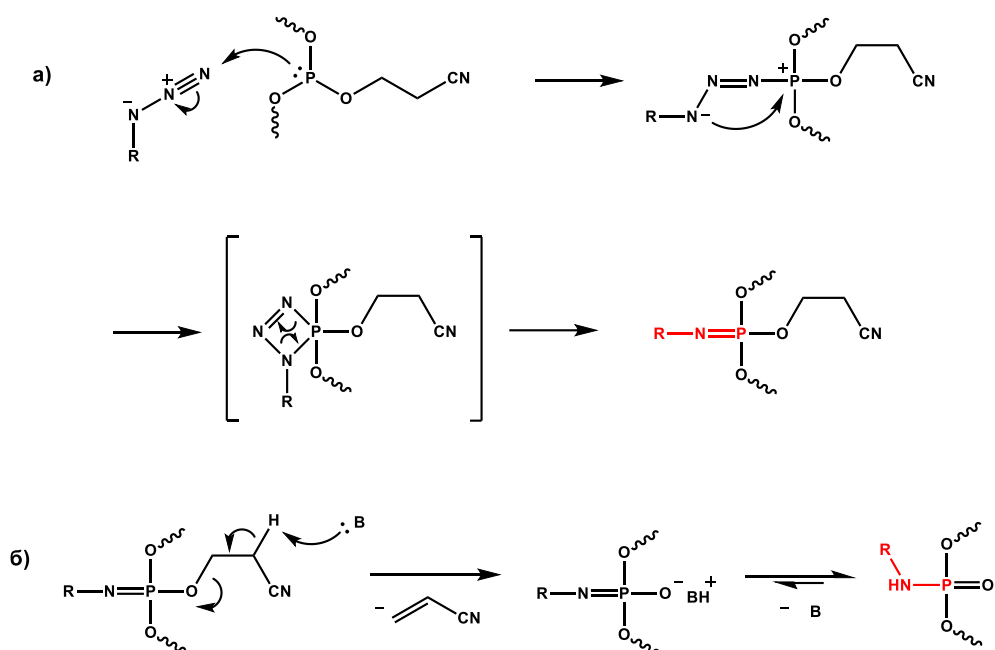


Рис. 27. Механизмы образования фосфазена по реакции Штаудингера (а) и амидофосфата из фосфазена путем элиминирования β -цианоэтильной защитной группы (б). R – функциональный заместитель; B – основание.

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

2.3.5.1. Получение *N*-алкиламидофосфатов

Одним из первых описанных типов амидофосфатных олигонуклеотидов являются *N*-алкиламидофосфаты (Рис. 28а). На начальных этапах развития синтеза модифицированных олигонуклеотидов, алкиламидофосфатные производные в основном получали по реакции Атертона-Тодда, основанной на взаимодействии амина и *N*-фосфоната в присутствии четыреххлористого углерода [123, 124]. Более современные методы получения алкиламидофосфатов могут быть адаптированы под амидофосфитный синтез и основаны на окислительном аминировании фосфит-триэфира в присутствии иода (см. Рис. 26) или взаимодействии фосфит-триэфира с алкилазидами по реакции Штаудингера (см. Рис. 27) [114, 115, 125]. Среди описанных в литературе функциональных групп, вводимых в состав олигонуклеотида с образованием алкиламидофосфатной группы,

можно выделить гидрофобные остатки (додецил, холестерин), алкиламиногруппы, алкилазидогруппы, алкинильные группы, ароматические группы, флуорофорные остатки (пирен); некоторые примеры исходных соединений для модификации приведены на Рис. 28б [114, 115, 125]. Алкиламидофосфатные модификации в основном используются для наделения олигонуклеотида дополнительными свойствами путем избирательного введения функциональных групп. Например, додецил-содержащие алкиламидофосфатные олигонуклеотиды могут быть применены в качестве доставщика нуклеиновых кислот в клетки [126].

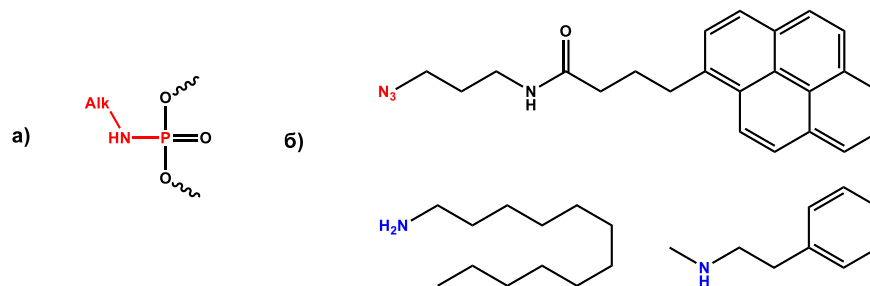


Рис. 28. Строение N-алкиламидофосфатной группы (а) и примеры исходных соединений в виде азидов (обозначены красным) и аминов (обозначены синим) для получения функционализированных N-алкиламидофосфатов (б).

При получении алкиламидофосфатов по методу окислительного аминирования необходимо абсолютизировать растворы во избежание гидролиза лабильных интермедиатов [115]. В случае же введения модификации по реакции Штаудингера необходимо соблюдать достаточно жесткие условия в связи с донорным характером алкилазидов [125]. Кроме того, алкиламидофосфаты в целом и алкиламидофосфатные олигонуклеотиды в частности в значительной мере подвержены кислотному гидролизу [127, 128]. Указанные факторы сильно ограничивают применение N-алкиламилофосфатных олигонуклеотидов, несмотря на существующее разнообразие представителей класса.

2.3.5.2. Получение сульфониламидофосфатов

Сульфониламидофосфатные производные являются одним из новых классов амидофосфатных олигонуклеотидов, открытых сравнительно недавно (Рис. 29а) [129]. Сульфониламидофосфаты получают по реакции Штаудингера (см. Рис. 27) с применением сульфонилазидов. В отличие от алкилазидов, сульфонилазиды являются достаточно сильными акцепторами и обеспечивают быстрое встраивание модификации в состав олигонуклеотида; такая тенденция весьма характерна для реакции Штаудингера [122]. На данный момент лишь для малого количества сульфонилазидов была продемонстрирована возможность введения в состав олигонуклеотида. К таким структурам можно отнести,

например, алкансульфонилазиды, в том числе и простейший представитель метансульфонилазид (мезилазид), фтор- и хлор-содержащие алкансульфонилазиды, сульфамоидазиды, ацилированные аминоэтилсульфонилазиды (Рис. 29б) [118, 129–133]. Тем не менее стоит отметить значительное число коммерчески доступных сульфонилахлоридов, которые могут выступать в качестве предшественников сульфонилазидов для расширения представителей класса сульфоамидофосфатов.

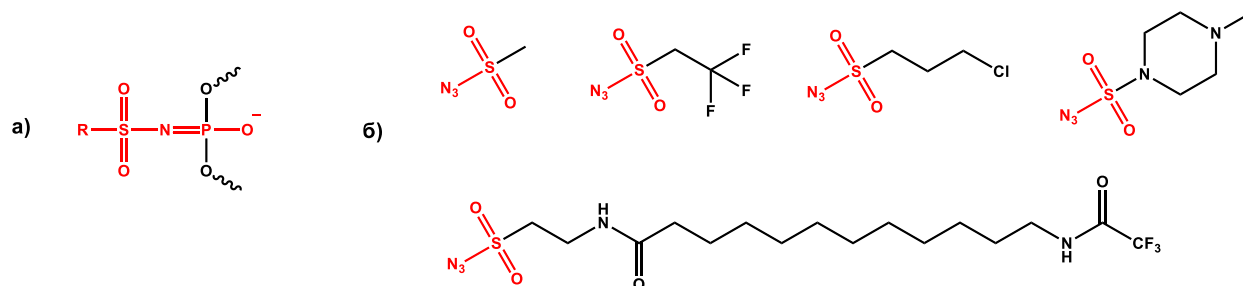


Рис. 29. Строение сульфоамидофосфатной группы (а) и примеры исходных сульфоамидазидов для получения функционализированных сульфоамидофосфатов (б). R – функциональный заместитель.

Одной из ключевых особенностей рассматриваемого класса олигонуклеотидов является наличие отрицательного заряда на сульфоамидофосфатной группе, что обуславливает ряд их свойств. Так, например, для мезильных олигонуклеотидов была показана возможность рекрутирования РНКазы Н для расщепления микроРНК-21 с эффективностью выше, чем у тиофосфатного аналога [134]. Мезильные олигонуклеотиды также практически не обладают цитотоксичностью, что позволяет некоторым научным группам рассматривать их в качестве альтернативы тиофосфатам [135]. Таким образом, потенциальная возможность варьирования вводимых функциональных групп и базовые свойства класса указывают на высокий потенциал сульфоамидофосфатных олигонуклеотидов, в том числе и в области создания терапевтических препаратов.

2.3.5.3. Получение фосфорилгуанидинов

Другим типом новых и уже хорошо изученных амидофосфатов являются фосфорилгуанидины (ФГО) (Рис. 30а) [136, 137]. Метод получения фосфорилгуанидинов первоначально основывался на окислении фосфит-триэфиров различными гуанидинами в присутствии иода [136], однако в настоящее время фосфорилгуанидины получают по реакции Штаудингера с использованием диаминокарбонийазидов (Рис. 30б) [119, 137]. Данные соединения содержат при азидо-группе сильные акцепторы, в связи с чем реакция Штаудингера с их использованием в условиях автоматического синтеза протекает всего за несколько минут [122, 137]. В отличие от большого количества предшественников для синтеза сульфоамидазидов, существует всего один коммерчески доступный вариант

диаминокарбенийазида, а также два варианта диаминокарбенийхлоридов как предшественников. Для расширения класса ФГО была предложена синтетическая схема получения различных диаминокарбенийазидов, состоящая из нескольких ключевых этапов [119]. Исходно при взаимодействии вторичного амина и тиофосгена образуется тиомочевина, которая далее хлорируется с использованием реагента Вильсмайера. В получившемся соединении проводят замещение атома хлора на азидо-группу и замену противоиона на гексафторфосфат, в результате чего образуются искомые диаминокарбенийазиды (Рис. 30в). По данной схеме были получены фосфорилгуанидины, несущие различные гидрофобные остатки [119].

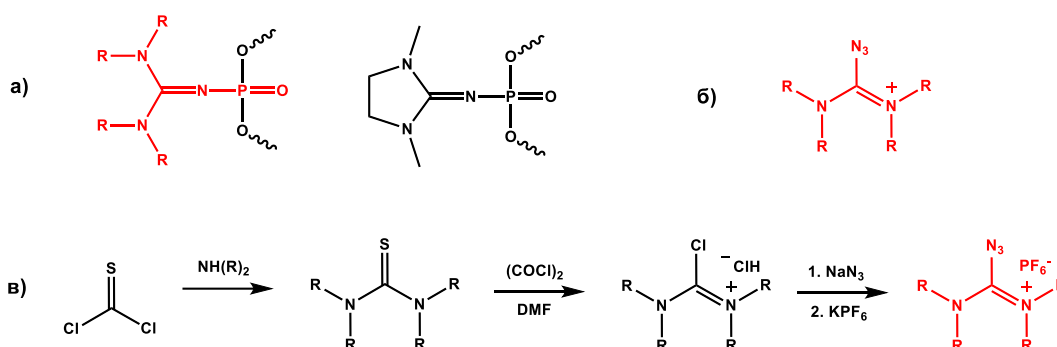


Рис. 30. Строение фосфорилгуанидинового звена и простейшего представителя класса – диметилимидазолидин фосфорилгуанидина (а), общий вид реагента для получения фосфорилгуанидинов – диаминокарбенийазида (б), схема получения диаминокарбенийазидов (в). R – функциональный заместитель.

Простейшим изученным представителем класса ФГО является фосфорилгуанидин, содержащий диметилимидазолидиниевую группу (DMI) (Рис. 30а). С использованием DMI-модифицированных олигонуклеотидов были описаны базовые свойства ФГО. Так, например, наличие фосфорилгуанидиновых групп в составе олигонуклеотидов обеспечивает их высокую стабильность к нуклеазам, в частности к фосфодиэстеразе змеиного яда (SVPDE) [138, 139]. В то же время, нейтрально заряженные полностью модифицированные ФГО эффективно образуют дуплексы как с РНК, так и с ДНК в стандартной А-форме практически независимо от солевых условий лишь с незначительным уменьшением температуры плавления (1,2°C на модификацию) [140, 141]. Полезные свойства и простота получения DMI-модифицированных олигонуклеотидов, в том числе возможность введения модификации в автоматическом режиме в условиях амидофосфитного синтеза, позволили создать ряд ФГО с высоким терапевтическим потенциалом. В частности, была продемонстрирована эффективность применения антисмысловых гапмерных, сплайсинг корректирующих (splice correction), экзон-пропускающих (exon-skipping) ФГО, направленных на лечение мышечной дистрофии Дюшена, а также на подавление генов *C9orf72*, *MDR1*, отвечающих за развитие бокового

амиотрофического склероза и лекарственной устойчивости раковых клеток соответственно, и длинной некодирующей РНК *Malat1*, участвующей в регуляции метастазирования [11, 12, 138]. Стоит отметить, что некоторые ФГО, направленные на перечисленные мишени, уже находится на различных стадиях клинических испытаний (см. <https://wavelifesciences.com/pipeline/research-and-development/>).

2.3.5.4. Получение N3'-P5' амидофосфатов

Еще одним достаточно изученным типом амидофосфатов являются т.н. N3'-P5' амидофосфаты, содержащие атом азота вместо атома кислорода, связывающего фосфатную группу и 3'-положение нуклеозида (Рис. 31а) [142]. В отличие от уже описанных типов амидофосфатных производных, N3'-P5' олигонуклеотиды могут быть получены только с использованием альтернативных мономеров. Первый предложенный способ синтеза основывался на окислительном присоединении (oxidative coupling) 3'-аминонуклеозида к 5'-Н-фосфонату по реакции Аттертона-Тодда [142]. Несмотря на показанную эффективность, данный способ получения N3'-P5' олигонуклеотидов несовместим со стандартным амидофосфитным синтезом. Немного позднее была разработана альтернативная схема получения N3'-P5' амидофосфатов, подразумевающая использование 3'-(4-монометокситритил)амино-5'-(2-цианоэтил)амидофосфитов нуклеозидов в качестве мономеров и синтез в амидофосфитном варианте в направлении 5'→3' (Рис. 31б) [10, 143]. Получение указанных мономеров происходит в большое число стадий, основная часть которых применяется для получения 3'-аминонуклеозида. Упрощенная схема заключается в введении азидо-группы по 3'-положению нуклеозида путем замещения активированной гидроксильной группы со сменой ориентации заместителя с S-конфигурации на R-конфигурацию, восстановлению азидо-группы до аминогруппы водородом на палладиевом катализаторе и введении 4-монометокситритильной защиты по 3'-аминогруппе и 5'-(2-цианоэтил)диизопропилаамидофосфитной группы (Рис. 31в) [143]. Стоит отметить, что схема была также адаптирована для получения мономеров, необходимых для синтеза N3'-P5' амидофосфатных аналогов РНК и 2'-модифицированных вариантов РНК [10, 144].

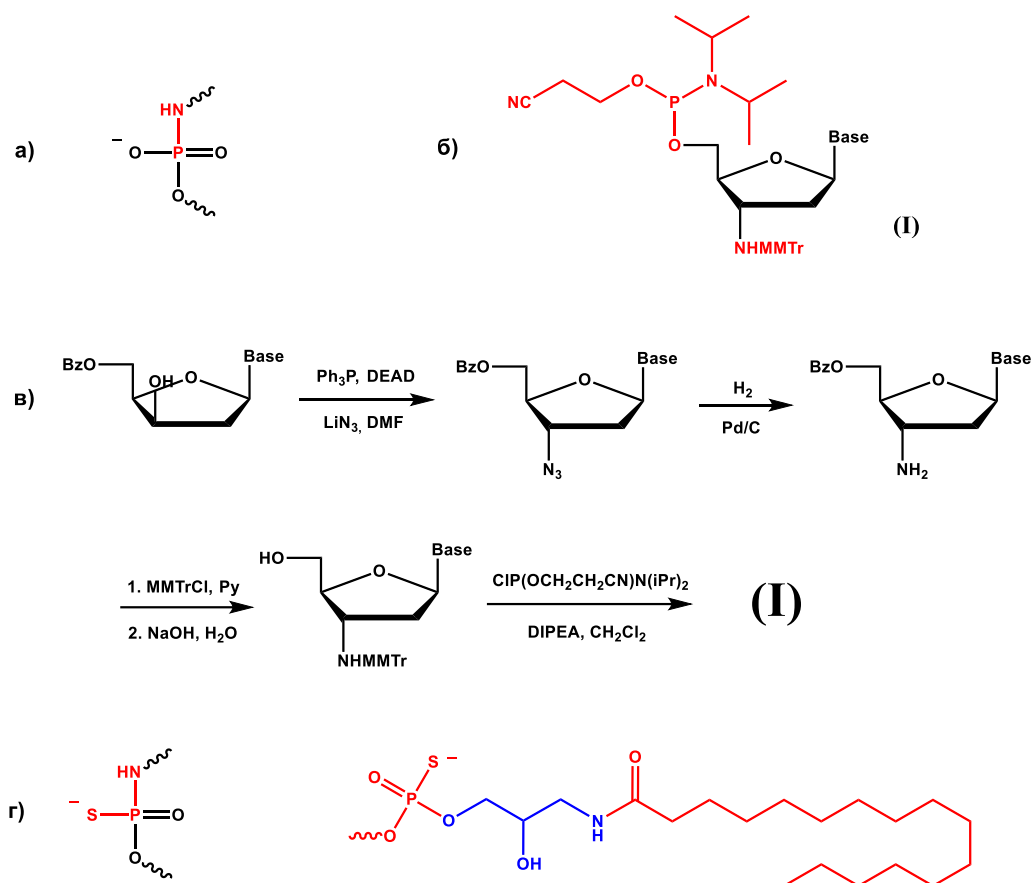


Рис. 31. Структура N3'-P5' амидофосфатного звена (а), структура 3'-(4-монометокситритил)амино-5'-(2-цианоэтил)амидофосфитного мономера для получения N3'-P5' амидофосфатов (б) и схема синтеза таких мономеров (в), структура N3'-P5' тиоамидофосфатного звена и конъюгированного остатка пальмитиновой кислоты в составе ингибитора теломеразы (г). Base – азотистое основание; MMTTr – 4-монометокситритильная группа; Bz – бензоильная группа; DEAD – диэтилазодикарбоксилат; DIPEA – N,N-диизопропилэтиламин.

N3'-P5' амидофосфаты обладают повышенной устойчивостью к ферментативному расщеплению, а также образуют более прочные дуплексы с РНК, по сравнению с нативной ДНК, с повышенной дискриминацией по мисматчам [10], что позволяет использовать их в качестве терапевтических агентов. Так, например, была показана возможность *in vitro* и *in vivo* регуляции экспрессии различных генов, ассоциированных с развитием хронической миелолейкемии с использованием N3'-P5' амидофосфатов в качестве антисмысловых олигонуклеотидов [145, 146]. N3'-P5' амидофосфаты также могут быть использованы в качестве ингибиторов теломераз по механизму блокирования РНК-связывающего домена фермента [147, 148]. Один из вариантов таких ингибиторов на основе тиофосфатного аналога N3'-P5' амидофосфатов, содержащий остаток пальмитиновой кислоты на 5'-конце, конъюгированный через 1-тиофосфато-3-аминоглицериновый линкер (Рис. 31г), показал наибольшую эффективность и уже применяется в качестве противоракового препарата для лечения миелодиспластического синдрома (препарат RYTELO) [147, 149].

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

2.4. Заключение

В соответствии с рассмотренной в обзоре литературы информацией, существует множество подходов к введению химических модификаций в состав сахаро-фосфатного остова олигонуклеотидов. Благодаря большому разнообразию специфических реакций органического синтеза, научным сообществом предложено значительное количество вариантов модифицированных олигонуклеотидов с измененными свойствами. Большая часть разработанных модификаций может быть введена в состав олигонуклеотида в рамках автоматического твердофазного амидофосфитного синтеза, что повышает эффективность их дальнейшего исследования.

Модификации углеводного остова обычно вводят в состав олигонуклеотида во множественном варианте, и используют для тонкой модуляции свойств НК. В качестве подобных модификаций можно выделить морфолиновые, 2'-F, 2'-OMe, 2'-MOE звенья,

введение которых позволяет направленно варьировать гибридационные свойства олигонуклеотидов, их устойчивость к ферментативному расщеплению, связывание с белками и т.п. (см., например, [17, 36]). Стоит отметить, что вышеперечисленные варианты модификаций углеводного остова входят в состав большинства одобренных олигонуклеотидных препаратов [4]. Вместе с тем, однако, для направленного изменения свойств олигонуклеотидов при введении в их состав модифицированных (дезокси)рибозных остатков зачастую необходимо перебирать большое число вариантов паттерна и состава модификаций.

В контексте возможности гибкого варьирования свойств олигонуклеотида особое внимание привлекают модификации межнуклеотидного фосфата. В отличие от модификаций углеводного остова, многие варианты модификаций фосфата могут быть введены в ходе стадии окисления в амидофосфитном синтезе. Такая особенность позволяет вводить модификации в любое положение цепи олигонуклеотида без ресурсозатратного синтеза модифицированных амидофосфитных мономеров. Для реализации такого подхода используют различные окислительные агенты, которые заменяют стандартную окислительную смесь на основе воды и молекулярного иода. К подобным окислительным агентам можно отнести, например, тионирующие, боронирующие соединения, смеси аминов с молекулярным иодом и органические азиды (см., например, [58, 83, 114, 115, 125]). Стоит отметить, что для некоторых типов фосфатных производных олигонуклеотидов уже разработаны схемы, позволяющие введение и варьирование функциональных остатков в рамках структуры модифицированного фосфата. К подобным производным можно отнести фосфорилгуанидиновые и сульфониламидофосфатные олигонуклеотиды, схема получения которых включает реакцию Штаудингера с применением соответствующих функционализированных азидов унифицированного строения вместо стандартной реакции окисления [118, 119]. В то же время, для введения различных функциональных групп в состав указанных НК-производных необходим отдельный синтез для каждого реагента-модификатора, что несколько снижает гибкость описанных методик.

Несмотря на значительное разнообразие химических модификаций нуклеиновых кислот и подходов к их получению, очень немногие из них подразумевают возможность эффективного варьирования функциональных групп в составе олигонуклеотидов. Учитывая активное развитие тематики применения модифицированных олигонуклеотидов в качестве терапевтических соединений и необходимость все более тонкого настраивания их свойств, разработка новых типов модификаций НК и подходов к их введению с возможностью гибкой функционализации представляется особенно актуальной задачей.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Химические реагенты

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

3.2. Азидо-триазины

3.2.1. Методы характеристики и очистки азидо-триазинов

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

Для колоночной адсорбционной хроматографии использовали колонки V = 100 и 200 мл, с рассчитанным количеством сорбента (20 г сорбента на 1 г вещества) Kieselgel 60 (размер частиц 0.060 – 0.200 мм, размер пор 60 Å; Merck, Германия).

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

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

спектрометре Varian 640-IR (Varian, США). Спектры регистрировали в ЦКП при НИОХ СО РАН.

3.2.2. Органический синтез азидо-триазинов

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

К раствору цианурхлорида (3 г, 16.3 ммоль) в 40 мл ацетона добавляли азид натрия (1.06 г, 16 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 2 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 20 мл CH_2Cl_2 , промывали насыщенным раствором NaCl (4×20 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали до получения белого осадка продукта. Очистка проводилась методом колоночной хроматографии в системе 50% CH_2Cl_2 в гексане. Объединенные фракции упаривали, вещество сушили до постоянного веса ($m = 1.016$ г, выход = 33%). $R_f = 0.325$ (система ТСХ = 50% CH_2Cl_2 в гексане). ^{13}C ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , м.д): 171.41, 172.61. ИК (KBr, ω , cm^{-1}): 2190 (N_3).

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

К раствору 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (0.1 г, 0.52 ммоль) в 10 мл CH_2Cl_2 добавляли избыток водного раствора метиламина (0.082 г, 1.04 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 2 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь промывали насыщенным раствором NaCl (3×20 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали до получения белого осадка 2-азидо-4,6-диметиламино-1,3,5-триазина, который высушивали до постоянного веса ($m = 0.035$ г, выход = 37%). $R_f = 0.7$ (система ТСХ = 10% EtOH в толуоле). ^1H ЯМР (80 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 3.05 (d, 6 H, $-\text{NHCH}_3$), 6.57 (br s, 2 H, $-\text{NHCH}_3$). ^{13}C ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д): 27.29, 166.05, 166.40, 168.50, 168.84, 169.40, 169.98. ИК (KBr, ω , cm^{-1}): 2140 (N_3).

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

К раствору 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (0.25 г, 1.3 ммоль) в 20 мл тетрагидрофурана добавляли избыток бутиламина (0.51 мл, 5.2 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 12 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь очищали от бутиламмоний хлорида на стеклянном фильтре. Реакционную смесь упаривали до получения белого осадка 2-азидо-4,6-дибутиламино-1,3,5-триазина, который высушивали до постоянного веса ($m = 0.34$ г, выход = 99%). $R_f = 0.58$ (система ТСХ = 10% EtOH в толуоле). ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 0.92 (m, 6 H, $-\text{CH}_3$), 1.35 (m, 4 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.53 (m, 4 H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$), 3.38 (m, 4 H, $-\text{NHCH}_2-$), 5.69 (m,

2 H, -NH-). ^{13}C ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 13.37, 19.73, 29.48, 39.65, 165.64, 167.89. ИК (KBr, ω , cm^{-1}): 2130 (N_3).

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

К раствору 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (0.1 г, 0.52 ммоль) в 20 мл CH_2Cl_2 добавляли водный раствор аммиака (0.03 г, 0.52 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 2 часов при охлаждении до 0°C . Реакционную смесь промывали насыщенным раствором NaCl (3×20 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали до получения белого осадка 2-азидо-4-амино-6-хлоро-1,3,5-триазина, который высушивали до постоянного веса ($m = 0.036$ г, выход = 40%). $R_f = 0.28$ (система ТСХ = 20% EtOAc в гексане). ^1H ЯМР (500 МГц, ацетон- d_6 , δ , ppm): 7.45 (s, 2 H, -NH $_2$). ^{13}C ЯМР (500 МГц, ацетон- d_6 , δ , ppm): 168.94, 170.87, 171.43. ИК (KBr, ω , cm^{-1}): 2150, 2175 (N_3).

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

К раствору цианурхлорида (5.0 г, 27.1 ммоль) в 30 мл ацетона добавляли водный раствор метиламина (2.1 г, 27.1 ммоль) и диизопропилэтиламина (4.71 мл, 27.1 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 4 часов при охлаждении до 0°C . Реакционную смесь упаривали, растворяли в 30 мл CH_2Cl_2 , промывали насыщенным раствором NaCl (3×30 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали до получения желто-белого осадка 2-метиламино-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина. Очистка проводилась методом колоночной хроматографии в градиенте 0-20% EtOAc в гексане. Объединенные фракции упаривали, вещество сушили до постоянного веса ($m = 3.4$ г, выход = 70%).

К раствору очищенного 2-метиламино-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (3.4 г, 19.0 ммоль) в 25 мл ацетонитрила добавляли азид натрия (1.23 г, 19.0 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение суток при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 30 мл CH_2Cl_2 , промывали насыщенным раствором NaCl (3×30 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением желто-белого осадка 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина, который высушивали до постоянного веса ($m = 2.9$ г, выход по двум стадиям = 60 %). $R_f = 0.5$ (система ТСХ = 20% EtOAc в гексане). ^1H ЯМР (80 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 3.11 (d, 3 H, -NHCH $_3$), 7.23 (m, 1 H, -NH CH_3). ^{13}C ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 28.00, 166.64, 166.77, 169.06, 169.86, 170.25, 171.30. ИК (KBr, ω , cm^{-1}): 2150 (N_3).

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

К раствору цианурхлорида (1.0 г, 5.4 ммоль) в 15 мл ацетонитрила по каплям добавляли раствор бутиламина (0.53 мл, 5.4 ммоль) и диизопропилэтиламина (0.94 мл, 5.4 ммоль) в 10 мл ацетонитрила при 0°C, после чего температуру постепенно поднимали до комнатной. Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 4 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали до получения желтого осадка 2-бутиламино-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина. Очистка проводилась методом флеш-колоночной хроматографии в 10% растворе EtOAc в гексане. Объединенные фракции упаривали, вещество сушили до постоянного веса ($m = 0.98$ г, выход = 82%).

К раствору очищенного 2-бутиламино-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (0.98 г, 4.4 ммоль) в 25 мл ацетона добавляли азид натрия (0.32 г, 4.8 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение суток при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 30 мл CH_2Cl_2 , промывали насыщенным раствором NaCl (3 × 30 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением желтого масла, кристаллизующегося в осадок 2-азидо-4-бутиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина, который высушивали до постоянного веса ($m = 0.49$ г, выход по двум стадиям = 40 %). $R_f = 0.62$ (система ТСХ = 15% EtOAc в гексане). ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 0.94 (t, 3 H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\underline{\text{H}}_3$), 1.37 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_3$), 1.58 (m, 2 H, $-\text{C}\underline{\text{H}}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.47 (m, 2 H, $-\text{NH}\text{C}\underline{\text{H}}_2-$), 6.24 (br s, 1 H, $-\text{N}\underline{\text{H}}\text{CH}_2-$). ^{13}C ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 13.70, 19.85, 31.12, 40.97, 166.14, 166.24, 170.05, 170.16, 170.90, 171.23. ИК (KBr, ω , cm^{-1}): 2145 (N_3).

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

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

К раствору очищенного 2-(N-морфолино)-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (0.7 г, 2.98 ммоль) в 25 мл ацетонитрила добавляли азид натрия (0.21 г, 3.28 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение суток при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 30 мл CH_2Cl_2 , промывали насыщенным раствором NaCl (3 × 30 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением белого осадка 2-азидо-4-(N-морфолино)-6-хлоро-1,3,5-триазина, который

высушивали до постоянного веса ($m = 0.33$ г, выход по двум стадиям = 29 %). $R_f = 0.5$ (система ТСХ = 20% EtOAc в гексане). ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 3.73 (m, 4 H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.86 (m, 4 H, $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$). ^{13}C ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 44.16, 66.40, 164.51, 169.71, 170.91. ИК (KBr, ω , cm^{-1}): 2150 (N_3).

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

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

К раствору очищенного 2-додециламино-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (0.82 г, 2.47 ммоль) в 25 мл ацетона добавляли азид натрия (0.2 г, 3.08 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 5 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 20 мл CH_2Cl_2 , промывали насыщенным раствором NaCl (3×15 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением белого осадка 2-азидо-4-додециламино-6-хлоро-1,3,5-триазина. Очистка проводилась методом колоночной хроматографии в градиенте 0-10% EtOAc в гексане. Объединенные фракции упаривали, вещество сушили до постоянного веса ($m = 0.17$ г, выход по двум стадиям = 14 %). $R_f = 0.45$ (система ТСХ = 10% EtOAc в гексане). ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 0.87 (t, 3 H, $-\text{CH}_3$), 1.20-1.37 (m, 18 H, $-\text{CH}_2-$), 1.59 (m, 2 H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$), 3.45 (m, 2 H, $-\text{NHCH}_2-$), 6.37 (m, 1 H, $-\text{NH}-$). ^{13}C ЯМР (500 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 14.03, 22.64, 26.68, 29.08, 29.17, 29.20, 29.29, 29.47, 29.51, 29.58, 31.87, 41.34, 166.28, 166.39, 169.24, 170.18, 170.25, 171.34. ИК (KBr, ω , cm^{-1}): 2150 (N_3).

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

К раствору цианурхлорида (0.7 г, 3.8 ммоль) в 30 мл CHCl_3 и 10 мл 10% масс водного раствора NaOH добавляли олеиламин (1.02 г, 3.8 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 2 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь промывали насыщенным раствором NaCl (3×15 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением розового масла 2-олеиламино-4,6-дихлоро-триазина. Очистка проводилась методом колоночной хроматографии в градиенте 0-7.5%

EtOAc в гексане. Объединенные фракции упаривали, вещество сушили до постоянного веса ($m = 0.95$ г, выход = 60 %).

К раствору очищенного 2-олеиламино-4,6-дихлоро-триазина (0.88 г, 2.12 ммоль) в 25 мл ацетона добавляли азид натрия (0.17 г, 2.65 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 5 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 20 мл CH_2Cl_2 , промывали насыщенным раствором NaCl (3×15 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением желтого масла 2-азидо-4-олеиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина. Очистка проводилась методом колоночной хроматографии в градиенте 0-10% EtOAc в гексане. Объединенные фракции упаривали, вещество сушили до постоянного веса ($m = 0.48$ г, выход по двум стадиям = 29 %). $R_f = 0.35$ (система ТСХ = 10% EtOAc в гексане). ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 0.87 (t, 3 H, $-\text{CH}_3$), 1.20-1.39 (m, 22 H, $-\text{CH}_2-$), 1.59 (m, 2 H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$), 1.90-2.08 (m, 4 H, $-\text{CH}_2\text{CHCHCH}_2-$), 3.45 (m, 2 H, $-\text{NHCH}_2-$), 5.27-5.42 (m, 2 H, $-\text{CH}_2\text{CHCHCH}_2-$), 6.40 (m, 1 H, $-\text{NH}-$). ^{13}C ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 14.08, 22.66, 26.65, 26.68, 27.14, 27.19, 29.06, 29.15, 29.29, 29.37, 29.50, 29.68, 29.73, 31.88, 32.57, 41.28, 41.32, 129.68, 129.97, 166.19, 166.28, 169.18, 170.11, 170.20, 171.28. ИК (KBr, ω , cm^{-1}): 2145 (N_3).

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

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

К раствору очищенного 2-(N-метил-N-октадецил)амино-4,6-дихлоро-триазина (0.43 г, 0.99 ммоль) в 25 мл ацетона добавляли азид натрия (0.077 г, 1.18 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 5 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 20 мл CH_2Cl_2 , промывали насыщенным раствором NaCl (3×15 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na_2SO_4 , упаривали с получением белого осадка 2-азидо-4-(N-метил-N-октадецил)амино-6-хлоро-1,3,5-триазина. Очистка проводилась методом колоночной хроматографии в градиенте 0-4% EtOAc в гексане. Объединенные фракции упаривали, вещество сушили до постоянного веса ($m = 0.31$ г, выход по двум стадиям = 56 %). $R_f = 0.6$ (система ТСХ = 10% EtOAc в гексане). ^1H ЯМР (300 МГц, CDCl_3 , δ , ppm): 0.87 (t, 3 H, $-\text{CH}_3$), 1.21-1.33 (m, 30 H, $-\text{CH}_2-$), 1.59 (m, 2

H, -N(CH₃)CH₂CH₂-), 3.14 (m, 3 H, -N(CH₃)CH₂-), 3.59 (m, 2 H, -N(CH₃)CH₂-). ¹³C ЯМР (300 МГц, CDCl₃, δ, ppm): 14.09, 22.67, 26.53, 26.62, 26.82, 26.97, 29.26, 29.34, 29.48, 29.68, 31.90, 34.92, 35.10, 49.17, 49.30, 164.94, 165.01, 169.27, 169.36, 170.36, 170.53. ИК (KBr, ω, см⁻¹): 2150 (N₃).

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

К раствору цианурхлорида (0.5 г, 2.7 ммоль) в 25 мл ацетона добавляли иодид калия (2.25 г, 13.6 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение суток при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 20 мл CH₂Cl₂, промывали насыщенным раствором NaCl (3 × 15 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na₂SO₄, упаривали с получением светло-коричневого осадка циануриодида, который сушили до постоянного веса (m = 0.4 г, выход = 32 %).

К раствору очищенного циануриодида (0.4 г, 0.87 ммоль) в 20 мл ацетона добавляли азид натрия (0.06 г, 0.96 ммоль). Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 90 минут при комнатной температуре. Реакционную смесь упаривали, растворяли в 25 мл CH₂Cl₂, промывали насыщенным раствором NaCl (3 × 15 мл). Органическую фазу сушили над безводным Na₂SO₄, упаривали с получением светло-коричневого осадка 2-азидо-4,6-диiodo-1,3,5-триазина, который сушили до постоянного веса (m = 0.27 г, выход по двум стадиям = 26 %). R_f = 0.71 (система ТСХ = 10% EtOAc в гексане). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, δ, ppm): 171.26, 172.46. ИК (KBr, ω, см⁻¹): 2175 (N₃).

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

К раствору гидроксида натрия (0.65 г, 16.2 ммоль) в 15 мл метанола добавляли 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазин (1.54 г, 8.1 ммоль) при 0 °С, после чего температуру постепенно поднимали до комнатной. Реакцию проводили при интенсивном перемешивании в течение 2 часов при комнатной температуре. Реакционную смесь отделяли от осадка NaCl на стеклянном фильтре при промывке ацетонитрилом. Фильтрат упаривали с образованием белого осадка 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина, который сушили до постоянного веса (m = 0.93 г, выход = 63%). R_f = 0.28 (система ТСХ = 10% EtOAc в гексане). ¹H ЯМР (300 МГц, CDCl₃, δ, ppm): 4.02 (d, 6 H, -OCH₃). ¹³C ЯМР (300 МГц, CDCl₃, δ, ppm): 55.30, 55.58, 172.13, 173.15, 173.49. ИК (KBr, ω, см⁻¹): 2150, 2190 (N₃).

3.2.3. Исследование взаимодействия азидо-триазинов с нуклеозидами

Порцию нуклеозидов, иммобилизованных на твердофазном носителе CPG (15 мг) (Glen Research, США), несущих стандартные для твердофазного амидофосфитного синтеза защитные группы, обрабатывали в следующих условиях:

- 0.1M раствор 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, 15 минут, 25°C (нуклеозиды A1, C1, G1, T1);
- 0.5M раствор 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, 1 час, 55°C (нуклеозиды A2, C2, G2, T2).
- 0.1M раствор 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, 1 час, 25°C (нуклеозид G3);
- 0.5M раствор 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, 1 час, 25°C (нуклеозид G4);

После обработки азидо-триазином, проводили деблокирование 4,4'-диметокситритильной защитной группы путем обработки нуклеозидов стандартным деблокирующим раствором твердофазного амидофосфитного синтеза (3% трихлоруксусная кислота в хлористом метиле). Далее нуклеозиды деблокировали с твердофазного носителя в водном растворе аммиака в течение ночи при 55°C.

После проведения деблокирования, растворы нуклеозидов упаривали на установке Savant DNA 120 SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific, США).

ТСХ анализ нуклеозидов проводили в системе вода/изопропанол 15:85 с добавлением 1% насыщенного водного раствора аммиака с использованием пластинок DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 (Merck, Германия).

ОФ ВЭЖХ реакционных смесей нуклеозидов проводили на хроматографе «Милихром А02» с использованием колонки (2 x 75 мм, «ProntoSIL-120-5-C18»; «Эконова», Россия). Разделение продуктов реакции проводили в градиенте ацетонитрила (0-45% за 20 минут) в 0.02 M водном растворе ТЕА*АсОН (рН = 7) (скорость потока 100 мкл/мин, температура термостата 35°C). Детекцию осуществляли на пяти длинах волн: 250, 260, 270, 280, 290 нм.

3.3. Синтез олигонуклеотидов

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

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

Для обработки олигонуклеотидов различными реагентами в ручном варианте переносили твердофазный носитель CPG из реактора в пробирку типа Eppendorf на 1.5 мл, добавляли необходимый раствор и проводили реакцию в соответствующих условиях (представлены ниже). После завершения реакции, раствор отбирали, промывали твердофазный носитель 3 раза безводным ацетонитрилом. После завершения всех реакций, твердофазный носитель переносили обратно в реактор и продолжали олигонуклеотидный синтез.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4-бутиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина в автоматическом режиме проводили в следующих условиях: 0.25M раствор азиды, этап окисления – 2 часа (PШ12);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4-морфолино-6-хлоро-1,3,5-триазина в автоматическом режиме проводили в следующих условиях: 0.25M раствор азиды, этап окисления – 2 часа (PШ13);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина в автоматическом режиме проводили в следующих условиях: 0.25M раствор азиды, этап окисления – 2 часа (PШ14);

Реакцию Штаудингера с применением 2-азидо-4-амино-6-хлоро-1,3,5-триазина в автоматическом режиме проводили в следующих условиях: 0.25M раствор азиды, этап окисления – 2 часа (PШ15);

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

Обработку твердофазного носителя (CPG) с иммобилизованным олигонуклеотидом деионизованной водой проводили в следующих условиях: 12 часов, 55°C (H₂O);

Мягкую обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом пиперидином проводили в следующих условиях: 10% об. раствор вещества в ацетонитриле, 1 час, 25°C (P1);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом (N-метил)бутиламином проводили в следующих условиях: 50% об. раствор вещества в ацетонитриле, 30 минут, 25°C (P2);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом диметиламином с одновременным деблокированием олигонуклеотида с твердофазного носителя проводили в следующих условиях: 40% масс водный раствор вещества, 15 минут, 55°C (P3);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом дигексиламином проводили в следующих условиях: 10% об. раствор вещества в ацетонитриле, 1 час, 25°C (P4);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом додециламином проводили в следующих условиях: 2М раствор вещества в пиридине, 30 минут, 55°C (P5);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом (N-метил-N-октадецил)амином проводили в следующих условиях: 2М раствор вещества в пиридине, 30 минут, 55°C (P6);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом олеиламином проводили в следующих условиях: 2М раствор вещества в пиридине, 30 минут, 55°C (P7);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом 6-аминогексанолом-1 проводили в следующих условиях: 1.5М раствор вещества в ацетонитриле, 1 час, 55°C (P8);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом диэтаноламином проводили в следующих условиях: 10% об. раствор вещества в смеси ацетон/ацетонитрил 1:1, 1 час, 55°C (P9);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом 2-(2-аминоэтокси)этанолом проводили в следующих условиях: 62.5% об. раствор вещества в ацетонитриле, 1 час, 25°C (P10);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом 3-аминопропанолом-1 проводили в следующих условиях: 1.5М раствор вещества в ацетонитриле, 1 час, 55°C (P11);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом 2-(N-метил)аминоэтанолом проводили в следующих условиях: 10% об. раствор вещества в ацетонитриле, 1 час, 25°C (P12);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом 3,3'-иминобис(N,N-диметилпропил)амином проводили в следующих условиях: 10% об. раствор вещества в ацетонитриле, 1 час, 25°C (P13);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом трис-(2-аминоэтил)амином проводили в следующих условиях: 10% об. раствор вещества в ацетонитриле, 1 час, 25°C (P14);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом (N,N-диметиламино)пропиламином проводили в следующих условиях: 10% об. раствор вещества в ацетонитриле, 1 час, 25°C (P15);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом 1,4-диаминобутаном проводили в следующих условиях: 10% об. раствор вещества в ацетонитриле, 1 час, 55°C (P16);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом 1,6-диаминогексаном проводили в следующих условиях: 1.5М раствор вещества в ацетонитриле, 1 час, 55°C (P17);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом пиперазином проводили в следующих условиях: 2М раствор вещества в хлороформе, 2 часа, 25°C (P18);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом анилином проводили в следующих условиях: 10% об. раствор вещества в ацетонитриле, 1 час, 55°C (P19);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом *n*-толуолсульфонилхлоридом проводили в следующих условиях: 2М раствор вещества в ацетонитриле с добавлением 2М раствора DIPEA, 1 часа, 25°C (P20);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом цианурхлоридом проводили в следующих условиях: 1.5М раствор вещества в ацетонитриле с добавлением 1.5М раствора DIPEA, 15 минут, 25°C (P21);

Жесткую обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом бутиламиноном проводили в следующих условиях: 10% об. раствор вещества в ацетонитриле, 1 час, 55°C (P22);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом *O*-метилизомочевинной проводили в следующих условиях: 10 мг вещества в 100 мкл ацетонитрила и 50 мкл 25мМ NaHCO₃, 1 день, 55°C (P23);

Обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом (2-хлоро-1,3-диметил)имидазолидиния гексафторфосфатом проводили в следующих условиях: 10 мг вещества в 200 мкл ацетонитрила и 7 мкл DIPEA, 30 минут, 55°C (P24);

Ацетилирование олигонуклеотида проводили в следующих условиях: обработка CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом кэпирующей смесью по стандартному протоколу олигонуклеотидного синтеза (P25);

Жесткую обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом пиперидином проводили в следующих условиях: 10% об. раствор вещества в ацетонитриле, 1 день, 40°C (P26);

Присоединение дополнительного тимидилатного звена проводили по стандартному протоколу цикла амидофосфитного синтеза (P27);

Мягкую обработку CPG с иммобилизованным олигонуклеотидом бутиламиноном проводили в следующих условиях: 10% об. раствор вещества в ацетонитриле, 30 минут, 40°C (P28);

Обработку СРГ с иммобилизованным олигонуклеотидом (N,N-диизопропил)2-цианэтил-додециламидофосфитом в автоматическом режиме проводили в следующих условиях: 0.1M, 45 минут (P29);

Триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды серии (N)

Последовательности обработок фосфит-триэфира для получения триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов серии (N) (в формате код: реакция 1, реакция 2...) представлены в таблице ниже.

N-1: PШ1 (β)	N-21: PШ1 (β), P9	N-41: PШ1 (β), P11, P27
N-2: PШ2 (β)	N-22: PШ1 (β), P10	N-42: PШ1 (β), P8, P27
N-3: PШ3 (β)	N-23: PШ1 (β), P11	N-43: PШ1 (β), P10, P27 (дважды)
N-4: PШ4 (β)	N-24: PШ1 (β), P12	N-44: PШ8 (β)
N-5: PШ5 (β)	N-25: PШ1 (β), P13	N-45: PШ9 (β)
N-6: PШ6 (β)	N-26: PШ1 (β), P14	N-46: PШ10 (β)
N-7: PШ7 (β)	N-27: PШ1 (β), P15	N-47: PШ8 (β), P15
N-8: PШ1	N-28: PШ1 (β), P16	N-48: PШ11 (β)
N-9: PШ5	N-29: PШ1 (β), P17	N-49: PШ12
N-10: PШ1, H ₂ O	N-30: PШ1 (β), P18	N-50: PШ13
N-11: PШ1 (β), H ₂ O	N-31: PШ1 (β), P19	N-51: PШ14
N-12: PШ1, P25	N-32: PШ1 (β), P18, P20	N-52: PШ14 (две модификации)
N-13: PШ1 (β), P1	N-33: PШ1 (β), P18, P21	N-53: PШ14 (три модификации)
N-14: PШ1 (β), P2	N-34: PШ1 (β), P18, P21, P22	N-54: PШ14 (четыре модификации)
N-15: PШ1 (β), P3	N-35: PШ1 (β), P18, P21, P18, P20	N-55: PШ1 (β)
N-16: PШ1 (β), P4	N-36: PШ1 (β), P14, P23	N-56: PШ1 (β)
N-17: PШ1 (β), P5	N-37: PШ1 (β), P14, P24	N-57: PШ1 (β)
N-18: PШ1 (β), P6	N-38: PШ1 (β), P14, P25	N-58: PШ1 (β)
N-19: PШ1 (β), P7	N-39: PШ1 (β), P17, P20	
N-20: PШ1 (β), P8	N-40: PШ1 (β), P11, P20, P26	

Триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды других серий

Последовательности обработок фосфит-триэфира для получения триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов других серий (в формате код: реакция 1, реакция 2...) представлены в таблице ниже.

М-В: РШ1 (β), P28	М-М4: РШ14 (нужное число раз)	TD1X5: РШ1 (β), P5
М-А1: РШ15 (нужное число раз)	М-М5: РШ14 (нужное число раз)	TD2X: РШ1 (β), P5
М-А2: РШ15 (нужное число раз)	ТВ1: РШ1 (β), P28	TD2Xa: РШ1 (β), P5
М-А3: РШ15 (нужное число раз)	TD1: РШ1 (β), P5	TD2Xb: РШ1 (β), P5
М-А4: РШ15 (нужное число раз)	TD2: РШ1 (β), P5	TD2Y: РШ1 (β), P5
М-А5: РШ15 (нужное число раз)	TD1X: РШ1 (β), P5	TD2M: РШ1 (β), P5
М-М1: РШ14 (нужное число раз)	TD1X2: РШ1 (β), P5	TD2S: РШ1 (β), P5
М-М2: РШ14 (нужное число раз)	TD1X3: РШ1 (β), P5	TOD1: РШ1 (β), P11, P29
М-М3: РШ14 (нужное число раз)	TD1X4: РШ1 (β), P5	T2-Tr: РШ1 (β)

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

Введение бензиламидофосфатной модификации в состав олигонуклеотида Vz осуществляли по ранее опубликованной методике [115]. Фосфит-триэфирную группу, образовавшуюся после протекания очередной конденсации мономера, обрабатывали 2M раствором бензиламина в пиридине в присутствии 15% раствора (об.) (N,O-бистриметилсилил)ацетамида (BSA) с добавлением 0.04M раствора молекулярного иода в сухом пиридине в течение 15 минут при комнатной температуре.

Введение додецильных групп в состав олигонуклеотидов OD1 осуществляли с использованием 5'-додецильного модификатора в виде (N,N-диизопропил)2-цианоэтил-додециламидофосфита (время конденсации – 45 минут, 0.1M раствор, автоматический режим) и коммерчески доступного разветвляющего агента в виде амидофосфитов («doubler

phosphoramidite», Glen Research, США; конденсация проводилась согласно протоколу производителя).

Введение додециламидофосфатной или бутиламидофосфатной модификации в состав олигонуклеотидов ND1 и T2-NH-Alk соответственно осуществляли по ранее опубликованной методике [126]. Фосфит-триэфирную группу, образовавшуюся после протекания очередной конденсации мономера, обрабатывали 2.5М раствором додециламина (ND1) или бутиламина (T2-NH-Alk) в смеси DMF/BSA 7:4 (об.) с добавлением 0.04М раствора молекулярного иода в сухом пиридине в течение 12 минут в автоматическом режиме.

Введение додецильных остатков в состав олигонуклеотида GD1 осуществляли по ранее опубликованной методике [119]. Фосфит-триэфирную группу, образовавшуюся после протекания очередной конденсации мономера, обрабатывали 1М раствором азидоди(N-метил-N-додециламино)карбения гексафторфосфата в течение 6 часов при 50°C.

Введение 1,3-диметилимидазолидиниевых групп в состав олигонуклеотидов TD1X, TD1X2, TD1X3, TD1X4, TD1X5, TD2X, TD2Xa, TD2Xb осуществляли по ранее опубликованной методике [150]. Фосфит-триэфирную группу, образовавшуюся после протекания очередной конденсации мономера, обрабатывали 0.5М раствором 2-азидо-1,3-диметилимидазолидиния гексафторфосфата в сухом ацетонитриле в течение 30 минут в автоматическом режиме.

Введение пирролидиновых фосфорилгуанидиновых групп в состав олигонуклеотида TD2Y осуществляли по реакции Штаудингера. Фосфит-триэфирную группу, образовавшуюся после протекания очередной конденсации мономера, обрабатывали 0.25М раствором азидодипирролидинкарбения гексафторфосфата в течение 1 в автоматическом режиме.

Введение тиофосфатной группы в состав олигонуклеотида TD2S осуществляли с применением сульфорирующего реагента DDTT (Sulfurizing Reagent II, Glen Research, США) согласно протоколу производителя.

Введение метансульфониламидофосфатной группы в состав олигонуклеотидов TD2M, T2-Ms осуществляли по реакции Штаудингера. Фосфит-триэфирную группу, образовавшуюся после протекания очередной конденсации мономера, обрабатывали 0.25М раствором метансульфонилзида в течение 1 часа в автоматическом режиме.

Введение остатка флуоресцеина (FAM) в 3'-конец олигонуклеотидов осуществляли путем проведения амидофосфитного синтеза на FAM-содержащем твердофазном носителе (FAM CPG 500, 6-изомер, Lumiprobe, Россия) согласно протоколу производителя. Введение остатка FAM в 5'-конец олигонуклеотидов осуществляли с применением соответствующего

амидофосфита (FAM фосфорамидит, 6-изомер, Lumiprobe, Россия) (время конденсации – 30 минут, 0.1М раствор в ацетонитриле, автоматический режим).

Синтезированные олигонуклеотиды деблокировали в водном растворе метиламина в течение 30 минут при 55°C. Олигонуклеотиды, содержащие остаток флуоресцеина, деблокировали сначала в водном растворе аммиака в течение 15 минут при 55°C, затем добавляли равный объем метиламина и продолжали деблокирование еще 15 минут при 55°C.

После проведения деблокирования, растворы олигонуклеотидов упаривали на установке Savant DNA 120 SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific, США), растворяли в 100 мкл деионизированной воды и хранили при температуре -20°C.

3.4. Характеризация и очистка олигонуклеотидов

ОФ ВЭЖХ реакционных смесей модифицированных олигонуклеотидов проводили на хроматографе «Милихром А02» с использованием колонки (2 x 75 мм, «ProntoSIL-120-5-C18»; «Эконова», Россия). Разделение продуктов реакции проводили в градиентах ацетонитрила (0-90% или 0-45% за 15 минут) в 0.02 М водном растворе ТЕА*АсОН (рН = 7) (скорость потока 200 мкл/мин, температура термостата 35°C); в отдельных случаях градиент составлял 0-45% ацетонитрила в 0.02 М водном растворе ТЕА*АсОН за 30 минут при скорости потока 100 мкл/мин. Детекцию осуществляли на четырех длинах волн: 260, 280, 300 и 360 нм.

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

Спектры MALDI-TOF реакционных смесей синтеза модифицированных олигонуклеотидов регистрировали на приборе Bruker Reflex III Autoflex Speed (Германия) в варианте положительных ионов с использованием 3-гидроксипиколиновой кислоты в качестве матрицы. Спектры ESI-MS реакционных смесей синтеза модифицированных олигонуклеотидов регистрировали на приборе Agilent G6410A (США) в варианте

отрицательных ионов. Спектры были зарегистрированы сотрудником ОЦКП ЦМСА при ИХБФМ СО РАН Олейник Г.А.

Электрофорез в денатурирующих условиях проводили в 20% или 15% ПААГ с соотношением акриламида к бисакриlamиду 19:1 и 7 М мочевиной в однократном ТВЕ-буфере (ТВЕ × 20: 1 М трис, рН=8.3, 1 М H_3BO_3 , 0.0265 М ЭДТА). Для полимеризации геля добавляли 16 мкл персульфата аммония (10% масс. водный раствор) и 0,3 мкл ТЕМЕД на 1 мл объема. В качестве электродного буфера использовали однократный ТВЕ-буфер.

Регистрацию ^{31}P -ЯМР спектров модифицированных динуклеотидов осуществляли на установке Spinsolve 80 Phosphorus (Magritek, Германия) в течение 12 часов с выкапчиванием сигналов.

3.5. Методы исследования олигонуклеотидов

3.5.1. Формирование ДНК-дуплексов и определение температур их плавления

Для получения ДНК-дуплексов с использованием олигонуклеотидов М-А1, М-А2, М-А3, М-А4, М-А5, М-М1, М-М2, М-М3, М-М4, М-М5 соответствующие олигонуклеотиды и их комплементарные последовательности в концентрации 5 мкМ каждого смешивали в эквимолярном соотношении в какодилатном буфере (1М NaCl, 10мМ $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}$ (какодилат натрия)), смеси постепенно нагревали от 5°C до 95°C. Для получения ДНК-дуплексов с использованием олигонуклеотидов ТВ1, TD1 соответствующие олигонуклеотиды и их комплементарные последовательности в концентрации 2,5 мкМ каждого смешивали в эквимолярном соотношении в PBS буфере, смеси постепенно нагревали от 5°C до 95°C, а затем медленно охлаждали.

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

Термическая денатурация с оптической регистрацией сигнала дуплексов олигонуклеотидов была проведена сотрудниками ЛСТБ ИХБФМ СО РАН, к.ф.-м.н. Гольшевым В.М. и к.ф.-м.н., зав. ЛСТБ Ломзовым А.А.

3.5.2. Исследование олигонуклеотидов методом динамического светорассеяния

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

3.5.3. Исследование химической устойчивости олигонуклеотидов

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

3.5.4. Исследование устойчивости олигонуклеотидов к нуклеазам цельноклеточных экстрактов

Реакционные смеси содержали 1 мг/мл белков клеточного экстракта (T98G или НЕК293Т), 0.1 мкМ ДНК и буферные компоненты: 10 мМ MgCl₂, 50 мМ Трис-НСl (рН = 8.0), 50 мМ NaCl. Реакцию проводили в течение 7.5 и 15 мин для каждого экстракта при 37°C. Реакцию останавливали введением ЭДТА до конечной концентрации 20 мМ. После этого аликвоты анализировали с помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях.

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

3.5.5. Исследование цитотоксичности олигонуклеотидов

Цитотоксичность олигонуклеотидов изучали на клеточных культурах НЕК293Т и T98G в режиме реального времени с помощью прибора xCELLigence (ACEA Biosciences, США) в течение 24–36 ч. Клетки высевали на 16-луночные E-планшеты в плотности 10⁵ кл./лунку в 150 мкл полной среды IMDM и инкубировали в стандартных условиях в течение 7–24 ч для прикрепления клеток ко дну планшета. После этого среду заменяли на 150 мкл среды IMDM, содержащей 10% FBS и 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 50 мкМ олигонуклеотидов.

Клетки инкубировали в течение 24–36 ч в стандартных условиях. Значения клеточных индексов измеряли каждые 30 мин. Дозозависимые кривые выживаемости клеток строили с помощью программного обеспечения MS Excel для временной точки 24 ч после добавления олигонуклеотида к клеткам. Значения IC50 рассчитывали как концентрацию олигонуклеотида, необходимого для снижения клеточного индекса на 50% по сравнению с контрольными клетками, инкубированными в отсутствие олигонуклеотида.

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

3.5.6. Исследование эффективности внутриклеточного проникновения олигонуклеотидов методом проточной цитофлуориметрии

Клетки НЕК293Т с плотностью посадки 75,000–150,000 клеток на лунку высаживали в 24-луночный планшет в среде DMEM (Sigma-Aldrich, США), содержащей 10% FBS (HyClone, США) и 1% антибиотиков (MP Biomedicals, США) (здесь и далее – полная среда). Далее клетки инкубировали в течение 18 часов при 37°C в атмосфере 5% CO₂ (здесь и далее – стандартные условия) для прикрепления клеток. После этого заменяли культурную среду на среду DMEM без сыворотки и антибиотиков, содержащую липофильные олигонуклеотиды в концентрации 5 мкМ. Клетки трансфецировали в течение 4 часов при стандартных условиях. Далее клетки промывали PBS, открепляли от культурального пластика 2%-ным раствором трипсина (MP Biomedicals, США), промывали полной средой DMEM, осаждали, промывали PBS и фиксировали в 2%-ном растворе формальдегида в PBS. Внутриклеточное проникновение олигонуклеотидов оценивали с использованием цитофлуориметр NovoCyte 3000 (ACEA Biosciences, США). Данные проточной цитофлуориметрии анализировали с помощью программы NovoExpress v. 1.1.0 (ACEA Biosciences, США). Эксперименты были проведены в трех повторах для статистического анализа.

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

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

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

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

Одним из удобных положений для введения модификаций в состав олигонуклеотида с точки зрения возможности его гибкой функционализации можно назвать межнуклеотидную фосфатную группу. В отличие от других положений, модификации в составе межнуклеотидной фосфатной группы могут быть введены посредством изменения всего одной стадии стандартного цикла амидофосфитного синтеза – реакции окисления фосфит-триэфирной группы. Таким образом, для изменения вводимых функциональных групп необходимо варьировать лишь окисляющие реагенты без проведения ресурсозатратного синтеза альтернативных мономеров, что в значительной мере обуславливает эффективность такого подхода. Среди всех типов фосфат-модифицированных олигонуклеотидов, наиболее широко представлены амидофосфатные производные различных классов, несущих различные функциональные заместители. Это связано с особенностями подходов к их получению, подразумевающих использование окисляющих реагентов, уже содержащих желаемые функциональные группы или же промежуточные группы с возможностью вариабельного введения функциональных групп. Выделяют два основных подхода к получению амидофосфатных производных – окислительное аминирование и реакцию Штаудингера [114–119]. В ходе проведения окислительного аминирования образуются крайне нестабильные иод-содержащие интермедиаты [115], что препятствует эффективному применению такого подхода. С другой стороны, интермедиаты реакции Штаудингера в виде фосфазенов более устойчивы по сравнению с иод-содержащими интермедиатами, и, кроме того, могут быть селективно переведены в стабильную амидофосфатную форму [119, 122]. Таким образом, в данной работе в качестве типа модифицированных олигонуклеотидов были выбраны амидофосфатные производные, а в качестве основного подхода к их получению – реакция Штаудингера.

В последнее время разрабатывается все больше подходов к модификации нуклеиновых кислот с применением реакции Штаудингера [118, 119, 137]. Подобные подходы основаны на взаимодействии интермедиата олигонуклеотидного синтеза в виде фосфит-триэфира и органического азиды. Среди известных структур азидов для эффективного получения фосфат-модифицированных олигонуклеотидов можно выделить даминокарбенилазиды и сульфонилазиды, используемые при синтезе фосфорилгуанидинов и сульфониламидофосфатов соответственно [118, 119]. Следует отметить, что оба

представленных варианта азидов обладают сильно выраженным акцепторным характером. Выбор азидов акцепторной природы для модификации по реакции Штаудингера не случаен и учитывает кинетические особенности протекания реакции. Известно, что при использовании азидов акцепторного характера, например, диаминокарбенийазидов, реакция Штаудингера может протекать количественно в течение нескольких минут в мягких условиях [122]. В то же время, при использовании донорных азидов, например, алкилазидов, для достижения такой же эффективности модификации реакцию Штаудингера необходимо проводить в течение нескольких часов при нагревании [125].

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

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

В данной работе в качестве реагентов-модификаторов были выбраны различные 2-азидо-1,3,5-триазины (Рис. 32а). Симметричный триазиновый гетероцикл является плоской молекулой с выраженными электрон акцепторными свойствами, что позволяет применять его, например, при синтезе сложных молекулярных каркасов с протяженными π -системами в качестве акцепторной компоненты [151–153]. Структура 1,3,5-триазина подразумевает возможность введения сразу двух функциональных групп в рамках одного межнуклеотидного фосфата. Кроме того, при рациональном дизайне конкретных 2-азидо-1,3,5-триазинов возможно обеспечение варьирования вводимых функциональных групп, что указывает на потенциальную гибкость разрабатываемого подхода. Таким образом, реагенты-модификаторы на основе 2-азидо-1,3,5-триазинов полностью удовлетворяют представленным критериям. Первые пилотные эксперименты с использованием 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, проведенные в лаборатории ранее, показали возможность эффективного введения триазиламидофосфатной группы в состав олигонуклеотида. В данной работе было проведено систематическое изучение класса триазиламидофосфатных олигонуклеотидов с точки зрения их получения с применением различных азидо-триазинов, а также были исследованы некоторые их свойства.

Для функционализации триазиламидофосфатной группы были использованы различные алкиламины. Данный выбор обусловлен коммерческой доступностью широкого круга аминов, что позволяет получать целый набор различных представителей нового класса олигонуклеотидов – триазиламидофосфатных производных. Структура итогового модифицированного звена в составе олигонуклеотида представлена на Рис. 32б. Стоит отметить, что в конечной структуре олигонуклеотида триазиламидофосфатная группа представлена в виде смеси двух оптических *Rp*- и *Sp*-стереоизомеров (Рис. 32в). Появление дополнительного хирального центра характерно для всех НК-производных, несущих модифицированную фосфатную группу с замещенным немостиковым атомом кислорода (см., например, [63, 90, 154]), и в данном случае обусловлено введением триазинового остова модификации. Для удобства восприятия информации, в дальнейшей работе триазиламидофосфатные группы будут изображены аналогично структуре на Рис. 32б, подразумевающей смесь *Rp*- и *Sp*-стереоизомеров, где волнистой линией обозначено место присоединения межнуклеотидного фосфата к гидроксильным группам остатка (дезокси)рибозы.

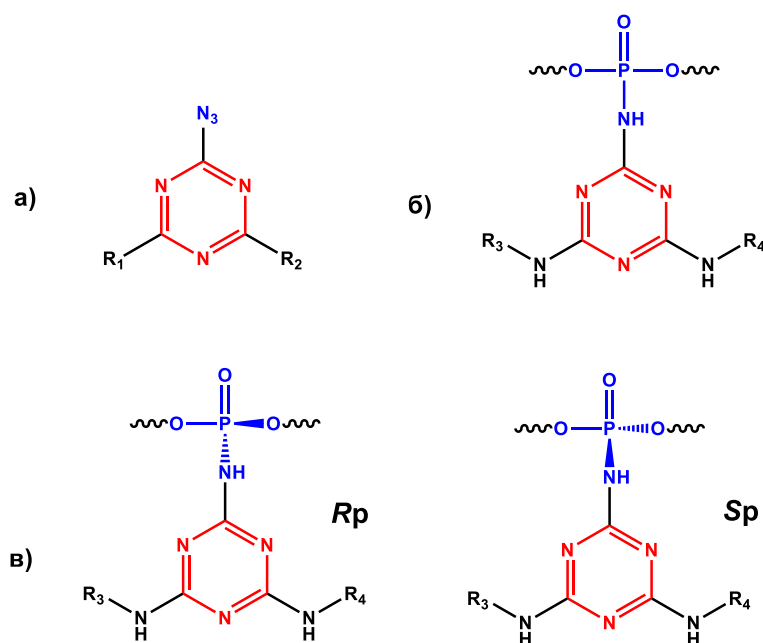


Рис. 32. Общее строение реагентов-модификаторов в виде 2-азидо-1,3,5-триазинов (а) и триазиламидофосфатного звена (б), а также его оптических *Rp*- и *Sp*-стереоизомеров (в) в составе олигонуклеотида. -R₁, -R₂ – промежуточные заместители или -NHR₃, -NHR₄; -R₃, -R₄ – функциональные заместители.

В настоящей работе было предложено и синтезировано несколько новых вариантов структур 4,6-замещенных 2-азидо-1,3,5-триазинов в качестве реагентов-модификаторов. Далее будут детально рассмотрены оптимизированные способы их получения с учетом особенностей нуклеофильного замещения в триазиновом остове. Кроме того, будут

указаны общие предполагаемые схемы получения триазиниламидофосфатных групп в составе олигонуклеотида с применением описанных реагентов.

4.2. Пути получения азидо-триазинов и триазиниламидофосфатных групп

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

В данной работе в качестве исходного соединения для получения всех азидо-триазинов был использован 2,4,6-трихлоро-1,3,5-триазин (цианурхлорид, Рис. 33, 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. 33, путь 1, соединение II). Данный реагент и оптимизированная методика его получения уже были предложены в лаборатории ранее. Несмотря на простоту синтетической схемы, при получении данного реагента необходимо соблюдать строгие условия реакции, что связано с кинетическими закономерностями нуклеофильного замещения в триазиновом остове. Известно, что замещение атомов хлора в цианурхлориде на донорные остатки в виде, например, алкиламинов происходит с разной эффективностью: первое замещение протекает при 0°C, второе – при комнатной температуре, а третье – при сильном нагревании свыше 60°C [155]. В то же время, азидо-группа является лишь незначительно менее акцепторной по сравнению с атомом хлора, в связи с чем при ее введении в состав цианурхлорида высокая реакционная способность получаемого соединения сохраняется. В результате, даже при охлаждении реакционной смеси возможно образование ди- и тризамещенных азидо-триазинов, и, как следствие, необходимо проводить дополнительный этап очистки от побочных продуктов, что приводит к падению выхода целевого продукта. Тем не менее, путем разделения продуктов реакционной смеси методом колоночной градиентной хроматографии, 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазин может быть получен в чистом виде.

Альтернативным вариантом структуры азидо-триазинов, рассмотренным в данной работе, являются различные 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазины (Рис. 33, соединение III). В соответствии с особенностями замещения в триазиновом остове, первоначально был выбран вариант получения таких соединений, основанный на исходном замещении двух атомов хлора в составе цианурхлорида на целевые остатки аминов, и последующем замещении последнего атома хлора на азидо-группу. Однако, при попытке синтеза по предложенной схеме 2-азидо-4,6-дибутиламино-1,3,5-триазина, этап присоединения азидо-группы протекал с низкой эффективностью даже при жестких условиях (данные не приведены). В связи с этим, последовательность реакций была

изменена – изначально был получен 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазин, атомы хлора которого далее были замещены на целевые остатки аминов (Рис. 33, 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. 33, соединение IV). Первоначально для получения подобных реагентов была использована синтетическая схема, схожая с получением 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазинов. Данная схема основана на первичном синтезе 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, и последующем замещении одного атома хлора на остаток целевого амина. Основным недостатком такой последовательности реакций является необходимость очистки 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина от продуктов избыточного замещения атомов хлора в составе цианурхлорида на азидо-группы на первом этапе схемы. В связи с этим, для получения 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов была разработана и успешно реализована альтернативная схема синтеза, обеспечивающая контролируемое введение заместителей без образования побочных продуктов. 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. 33, путь 3). Ранее в лаборатории по предложенной схеме был синтезирован азидо-триазин, несущий липофильный остаток додециламина. В данной работе набор реагентов типа 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов был значительно расширен. Так, дополнительно были синтезированы реагенты-модификаторы, содержащие в своем составе остатки аммиака, метиламина, бутиламина, морфолина, олеиламина и (N-метил-N-октадецил)амина.

Вышеперечисленные варианты структур азидо-триазинов выступали в качестве основных реагентов-модификаторов в данной работе, с применением которых было получено большинство триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов. Комбинаторика заместителей в составе азидо-триазинов именно в виде атомов хлора и алкиламиногрупп основана как на выборе коммерчески доступного цианурхлорида в качестве исходного соединения, так и на необходимости введения остатков аминов в финальную структуру триазиниламидофосфатной группы.

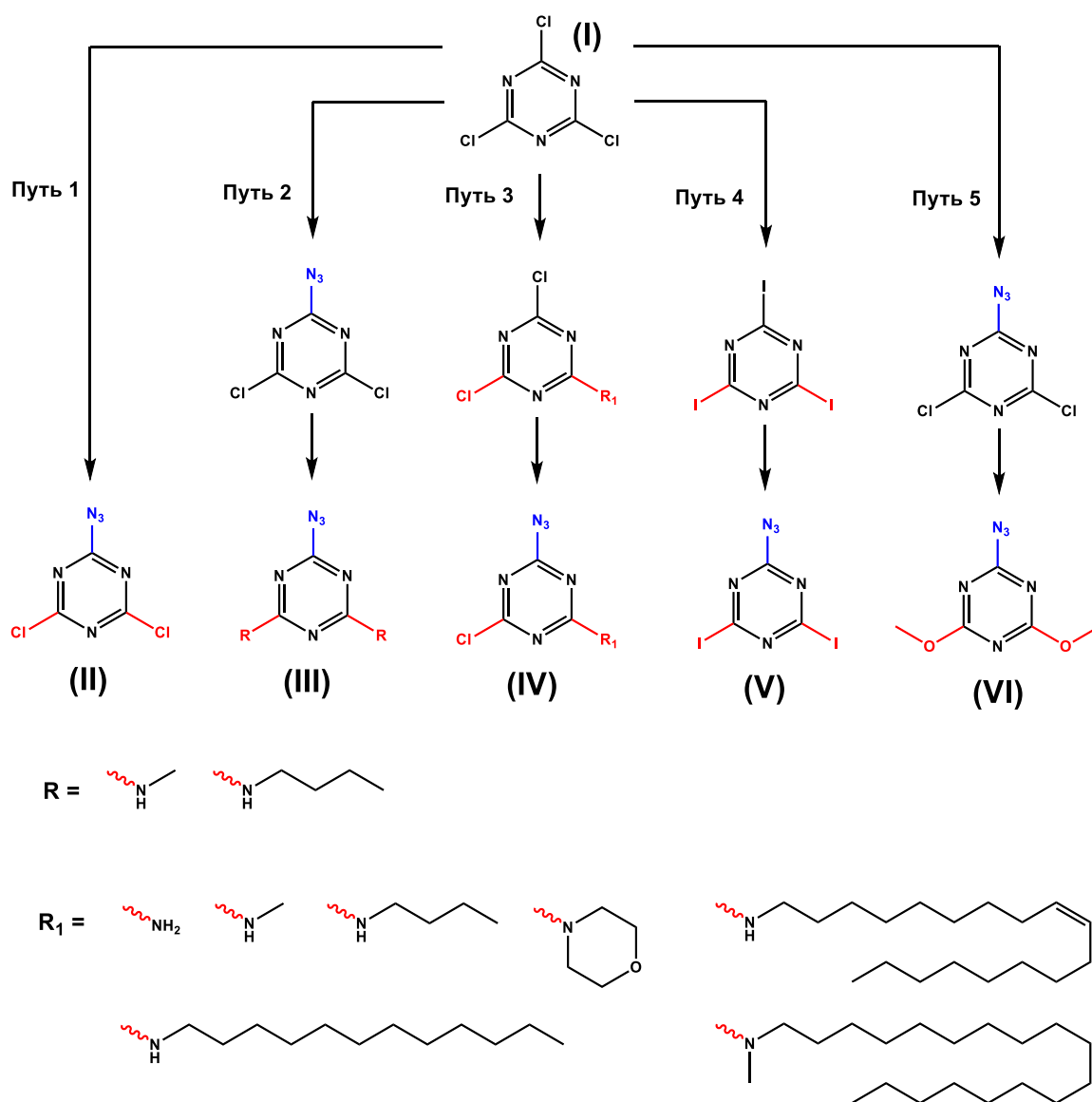


Рис. 33. Структура исходного соединения для получения азидо-триазинов в виде цианурхлорида (I), а также пути получения и структуры реагентов-модификаторов в виде 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (путь 1, соединение II), 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазина (путь 2, соединение III), 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина (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).

В качестве дополнительных вариантов азидо-триазинов с другими типами заместителей были получены 2-азидо-4,6-диiodo-1,3,5-триазин (Рис. 33, соединение V) и 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазин (Рис. 33, соединение VI). Синтез иод-содержащего азидо-триазина был осуществлен в две стадии – первоначально из цианурхлорида при обработке избыточным количеством иодида калия был получен циануриодид, в котором далее один атом иода селективно замещался на азидо-группу (Рис. 33, путь 4). В ароматических соединениях атомы иода являются плохими уходящими группами, однако

могут быть замещены различными нуклеофилами в более жестких условиях по сравнению с атомами хлора, в том числе в составе 1,3,5-триазинов [156]. В связи с этим, одна азидо-группа может быть введена в состав циануриодида селективно. При получении 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина была использована схема, аналогичная синтезу 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. 33, 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 (см. раздел 3.2.2). Стоит отметить, что наибольшие выходы были достигнуты при синтезе азидов типа 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов. Данный факт можно объяснить возможностью строгого температурного контроля всех стадий синтеза, что снижает возможность образования побочных продуктов избыточного замещения в триазиновом остове.

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

Как уже было отмечено выше, итоговая структура триазиниламидофосфатной группы в составе олигонуклеотида содержит два заместителя в виде остатков алкиламинов, присоединенных к триазиновому остову (см. Рис. 32б). При использовании азидо-триазинов разных типов, пути получения такой структуры будут несколько отличаться. Так, например, при получении триазиниламидофосфатной группы с использованием 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина на первом этапе после проведения реакции Штаудингера образуется хлор-содержащий интермедиат, в состав которого далее вводят остатки алкиламинов (Рис. 34, путь 1, X = -Cl). Возможность замещения атомов хлора в составе интермедиата обусловлена их высокой реакционной способностью, что согласуется с литературными данными [155]. Реагенты типа 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазинов уже содержат в своем составе необходимые заместители, поэтому получение триазиниламидофосфатной группы с использованием таких реагентов протекает всего в одну стадию (Рис. 34, путь 2). Введение в состав олигонуклеотида реагентов в виде 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов подразумевает замещение второго атома хлора в триазиновом остове с получением в том числе и несимметрично замещенных триазиниламидофосфатных групп, несущих две разные функциональные группы (Рис. 34, путь 3). Использование 2-азидо-4,6-дииодо-1,3,5-триазина и 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина для получения триазиниламидофосфатов по аналогии с хлор-содержащими

реагентами подразумевает замещение атомов иода и метокси-групп в триазиновом остове на алкиламиногруппы, что также ранее было описано в литературе [156, 157] (Рис. 34, путь 1, X = -I или X = -OMe).

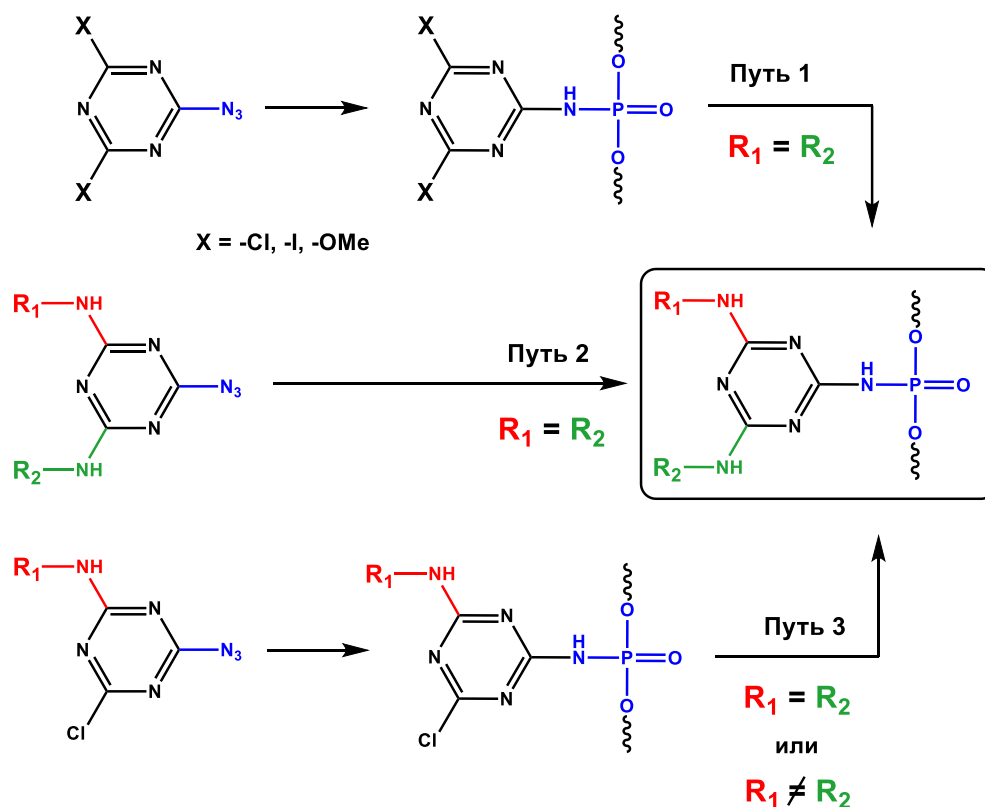


Рис. 34. Пути получения триазиниламидофосфатных групп в составе олигонуклеотидов, несущих два остатка алкиламина, с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, 2-азидо-4,6-диiodo-1,3,5-триазина, и 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина (путь 1, X = -Cl, -I, -OMe соответственно), 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазина (путь 2), 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина (путь 3). R_1 , R_2 – функциональные заместители.

Таким образом, в рамках данной работы были синтезированы и охарактеризованы 12 различных азидо-триазинов пяти структурных типов (см. Рис. 33), и были предложены схемы их введения в состав олигонуклеотидов с получением триазиниламидофосфатных групп (см. Рис. 34). Для валидации предложенных схем далее были проведены модельные эксперименты с получением простейших представителей триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов, что также позволило оценить реакционную способность используемых модификаторов.

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

В качестве модели для оценки реакционной способности азидо-триазинов была выбрана система на основе олиготимидилата, при этом модификация вводилась по ближайшему к 5'-концу межнуклеотидному фосфату. Выбор такой системы обусловлен несколькими факторами. Во-первых, при введении модификации по указанному положению минимизируется возможность какой-либо ее деградации под действием реагентов, используемых в амидофосфитном синтезе. В данном варианте модификация в составе олигонуклеотида претерпевает только обработку трихлоруксусной кислотой на этапе удаления диметокситритильной (DMTr-) защитной группы, и обработку концентрированным водным раствором метиламина на стадии деблокирования с твердофазного носителя. Во-вторых, тимидилатные звенья не содержат экзоциклических аминогрупп, по которым гипотетически может происходить присоединение триазинового остова, что минимизирует количество побочных продуктов. И в-третьих, отщепление олиготимидилатов от твердофазного носителя происходит достаточно быстро (водный раствор метиламина, 55°C, 15 минут), что позволяет ускорить исследование. В качестве модификации в итоговой структуре олигонуклеотида была выбрана простейшая триазиниламидофосфатная группа, содержащая остатки метиламина.

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

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

Методология получения триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов состояла из нескольких этапов. Олиготимидилат синтезировали в автоматическом режиме до места введения модификации. В ходе присоединения последнего тимидилатного звена, синтез останавливали перед проведением стадии окисления для получения фосфит-триэфирного интермедиата (рис. 35, структура 1). Далее твердофазный носитель, содержащий олигонуклеотид с фосфит-триэфирной группой, переносили из реактора синтезатора в пробирку и проводили реакцию Штаудингера с применением соответствующего азидо-триазина вручную. Триазинилфосфазен, первоначально образующийся после протекания реакции Штаудингера (Рис. 35, структура 2), также в ручном режиме отмывали от избытка реагента-модификатора, после чего последовательно обрабатывали растворами (N,N-диизопропил-N-этил)амин (DIPEA) и различных алкиламинов с получением промежуточной триазиниламидофосфатной группы (Рис. 35, структура 3). После каждого

из указанных этапов твердофазный носитель отмывали от избытка амина, затем переносили обратно в реактор и проводили процесс деблокирования DMTr-защитной группы. На финальном этапе олигонуклеотид отщепляли от твердофазного носителя путем обработки водным раствором метиламина с получением целевых триазиламидофосфатов (рис. 35, структура 4).

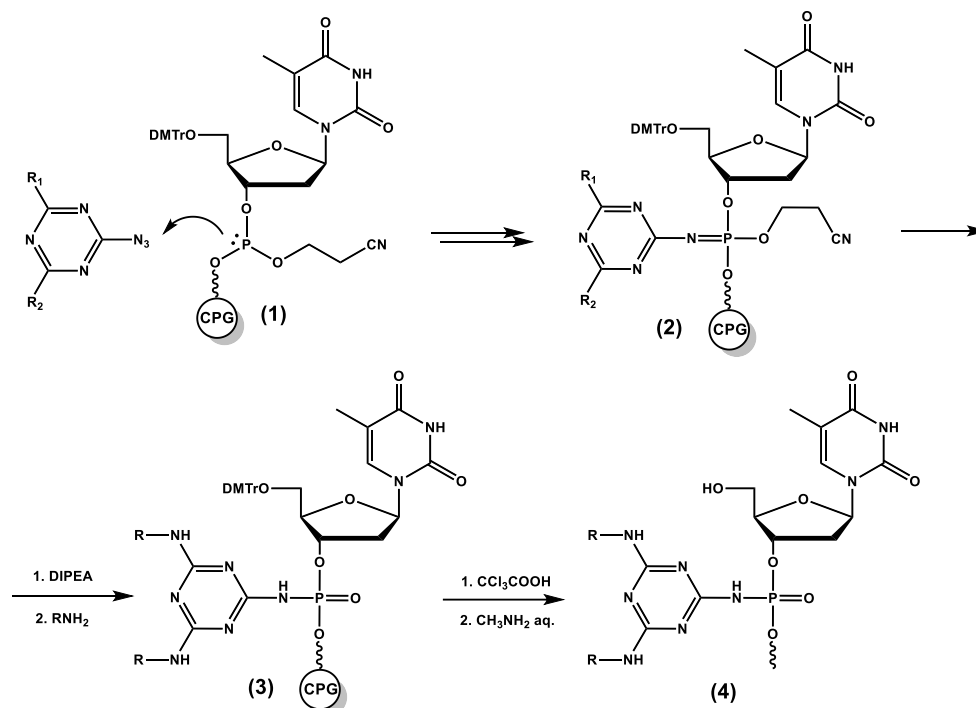


Рис. 35. Схема получения триазиламидофосфатных олиготимидилатов, содержащих модификацию по ближайшему к 5'-концу межнуклеотидному фосфату. R₁, R₂ – промежуточные заместители или алкиламиногруппы; R – функциональные заместители; CPG – твердофазный носитель (controlled pore glass); DMTr – 4,4'-диметокситритильная группа.

Обработка раствором DIPEA проводится для селективного перевода лабильного фосфазенового соединения в более стабильную амидофосфатную форму посредством β-элиминирования цианоэтильной группы, что является популярным приемом при получении модифицированных олигонуклеотидов по реакции Штаудингера [119, 122]. Стоит отметить, что отсутствие стадии β-элиминирования может привести к значительному падению выходов целевых олигонуклеотидов за счет гидролиза фосфазена. Например, при получении модифицированных олигонуклеотидов с применением 2-азидо-4,6-дидиодо-1,3,5-триазина исключение этапа β-элиминирования снижает выход с 85% до 40% (см. Рис. 42б, раздел 4.3.2). По этой причине, данный этап был включен в синтетическую схему во всех случаях при оценке реакционной способности азидо-триазинов для получения наиболее достоверных результатов. Более подробно вопрос гидролитической стабильности фосфазенового звена рассмотрен в разделе 4.3.2.

Первоначально была проверена реакционная способность 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина. Ранее в лаборатории после значительной оптимизации реакции Штаудингера было обнаружено, что данный реагент-модификатор может быть введен в состав олигонуклеотида практически количественно в очень мягких условиях (0.1М концентрация азидо, 15 минут, 25°C). Такая высокая реакционная способность реагента связана с его акцепторным характером за счет наличия атомов хлора в триазиновом остове. В данной работе при оценке эффективности введения модификации с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина были выбраны аналогичные условия реакции Штаудингера. Для этого были синтезированы олигонуклеотид состава 5'-Т*ТТТТ-3', где * – место введения модификации, а также контрольный немодифицированный пентатимидилат 5'-ТТТТТ-3' (олигонуклеотиды N-1, K). В данном случае остатки метиламина были введены в состав триазинового остова модификации в процессе деблокирования с твердофазного носителя водным раствором метиламина. После деблокирования, реакционные смеси олигонуклеотидов были проанализированы методом ОФ ВЭЖХ (Рис. 36). Как можно видеть, на хроматограмме олигонуклеотида N-1 присутствует один основной пик, отличающийся по подвижности от контроля K. С применением MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа было доказано, что основным продуктом реакционной смеси является целевой триазиламидофосфатный олигонуклеотид с двумя остатками метиламина в триазиновом остове (Рис. 36). По результатам проведенных анализов можно сделать вывод, что в выбранных условиях реакции Штаудингера 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазин практически количественно встраивается в состав олигонуклеотида с последующим замещением атомов хлора на метиламиногруппы. Конверсия в целевой продукт превышает 90%, что коррелирует с данными, полученными в лаборатории ранее.

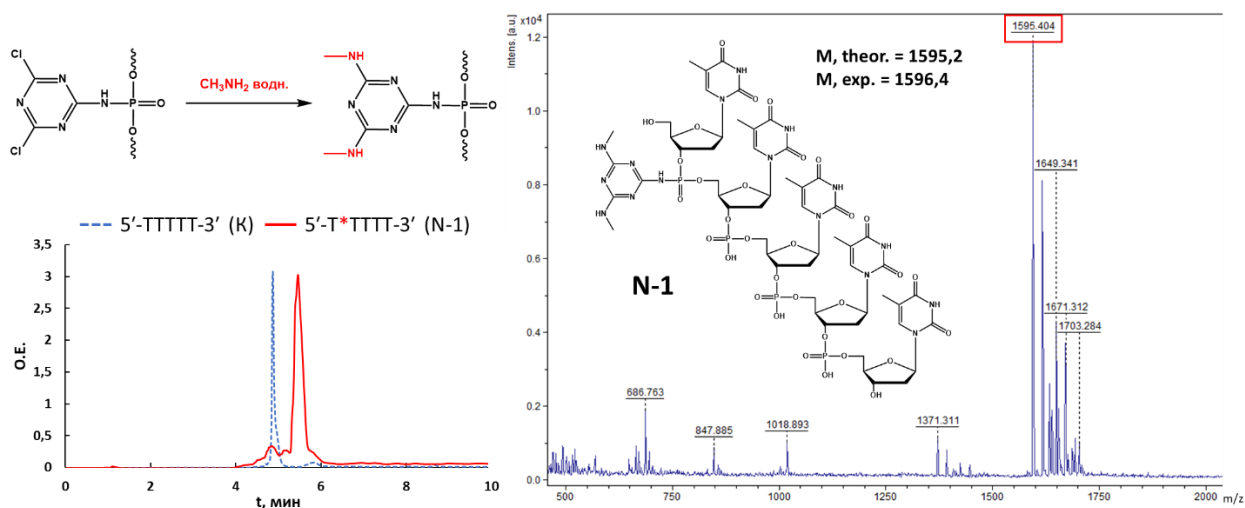


Рис. 36. Профили ОФ ВЭЖХ реакционной смеси пентатимидилата после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином (0.1M, 15 минут, 25°C) и введения остатков метиламина (N-1), и контрольного пентатимидилата (K) (слева) и фрагмент MALDI-TOF масс-спектра олигонуклеотида N-1 (справа). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-90% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02M водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм.

Стоит также отметить характерное для триазиламидофосфатных олигонуклеотидов изменение времени удерживания по сравнению с немодифицированным олигонуклеотидом. Введение модификации приводит к нейтрализации заряда одной из фосфатных групп олигонуклеотида, что повышает его гидрофобность и усиливает эффективность взаимодействия с неподвижной фазой колонки. Как следствие, время удерживания триазиламидофосфатного олигонуклеотида увеличивается и достоверно отличается от времени удерживания контрольного олигонуклеотида, что позволяет оценивать конверсию по профилю ОФ ВЭЖХ.

Реакционная способность реагентов типа 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазина была изучена на примере азида, уже содержащего два остатка метиламина; модификация была введена в октатимидилат последовательности 5'-Т*ТТТТТТТТ-3'. Для прямого сравнения данного реагента с 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином с точки зрения реакционной способности, условия реакции были выбраны идентичными (0.1M, 15 минут, 25°C; олигонуклеотид N-2). Анализ ОФ ВЭЖХ реакционной смеси показал, что в данном случае конверсия в целевой продукт не превышает 15% (Рис. 37, N-2). Такое падение выходов целевого продукта может быть объяснено донорной природой остатков метиламина, входящих в состав азидо-триазина, что в значительной мере замедляет протекание реакции Штаудингера. Для оценки возможности увеличения выхода олигонуклеотида, параметры реакции Штаудингера постепенно повышали. После некоторой оптимизации было обнаружено, что 2-азидо-4,6-диметиламино-1,3,5-триазин

может быть введен в состав олигонуклеотида с высокой эффективностью (90%), но только в достаточно жестких условиях (0.5M, 1 час, 65°C; олигонуклеотид N-3, Рис. 37).

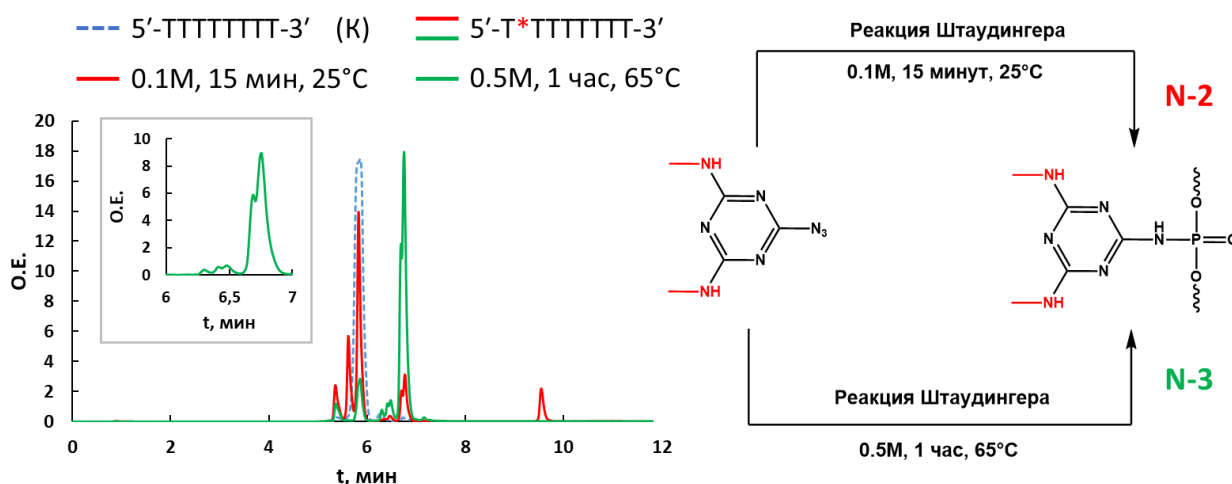


Рис. 37. Профили ОФ ВЭЖХ реакционной смеси октатимидилата после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-диметиламино-1,3,5-триазином в мягких (0.1M, 15 минут, 25°C; олигонуклеотид N-2) и жестких (0.5M, 1 час, 65°C; олигонуклеотид N-3), и контрольного октатимидилата (К). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-45% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02M водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм

На профиле ВЭЖХ олигонуклеотида N-3 также видно раздваивание пика целевого продукта. Данный факт обусловлен наличием в реакционной смеси двух диастереомеров модифицированных олигонуклеотидов, содержащих триазиламидофосфатную группу в *Rp*- или *Sp*-конфигурации, для которых характерно несколько отличающееся время удерживания на колонке при проведении хроматографического анализа [154]. Стоит отметить, что раздваивание пика целевого продукта наблюдается не для всех триазиламидофосфатных олигонуклеотидов, несмотря на наличие диастереомеров во всех случаях. Вероятно, это может быть связано с нуклеотидным окружением модификации, ее положение в цепи, заместителями при триазиновом остове и другими факторами.

Далее была проведена оценка реакционной способности третьего типа реагентов-модификаторов на примере 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина. В данном случае второй остаток метиламина был введен в состав модификации на этапе финального деблокирования; модификация вводилась в октатимидилат. На основании уже имеющихся данных о реакционной способности азидо-триазинов, содержащих донорные и акцепторные группы, было высказано предположение, что 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазин будет обладать промежуточной реакционной способностью по сравнению с уже изученными реагентами. Действительно, при проведении реакции Штаудингера с

указанным реагентом в мягких условиях (0.1M, 15 минут, 25°C; олигонуклеотид N-4), конверсия в целевой продукт составила порядка 50% (Рис. 38).

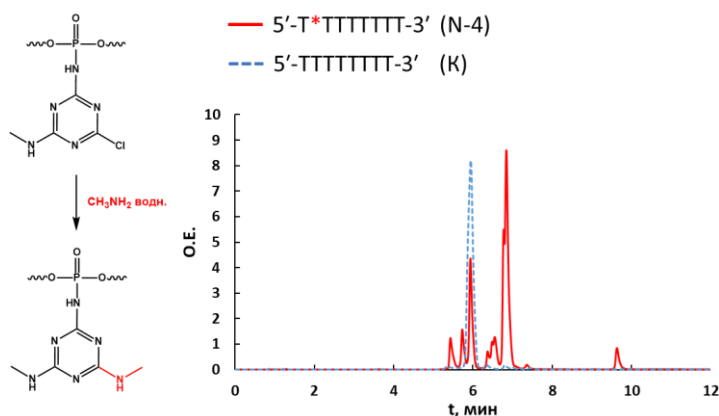


Рис. 38. Профили ОФ ВЭЖХ реакционной смеси октатимидилата после реакции Штаудингера с 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазином (0.1M, 15 минут, 25°C) и введения остатков метиламина (N-4), и контрольного октатимидилата (К). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-45% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02M водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм.

На следующем этапе была оценена реакционная способность 2-азидо-4,6-дииодо-1,3,5-триазина; модификация также вводилась в состав октатимидилата, остатки метиламина, по аналогии с хлор-содержащими реагентами, были введены на этапе финального деблокирования (олигонуклеотид N-5). Атомы иода являются более донорными группами по сравнению с атомами хлора, в связи с чем ожидалось падение выходов целевого олигонуклеотида. Тем не менее, при использовании иод-содержащего реагента в стандартных мягких условиях (0.1M, 15 минут, 25°C) конверсия в целевой продукт снизилась незначительно и составила около 85% (Рис. 39). Замещение атомов иода на метиламиногруппы было подтверждено методом электрофореза в ПААГ (Рис. 39). Основной олигонуклеотид из реакционной смеси N-5 и контрольный олигонуклеотид, полученный с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (К-Tr), обладают одинаковой подвижностью, и при этом достоверно отличаются от немодифицированного октатимидилата ($\mu = 0,85$ для N-5 и К-Tr против $\mu = 0,95$ для К).

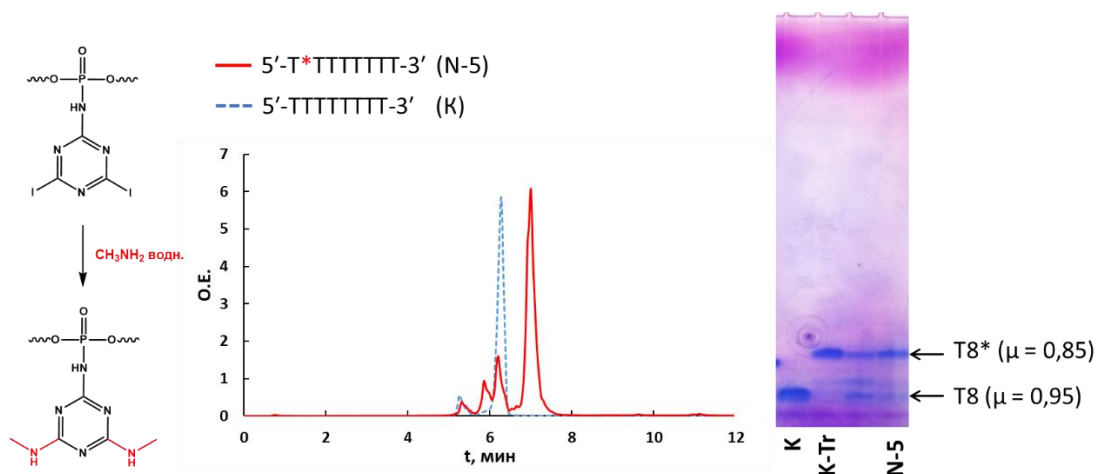


Рис. 39. Профили ОФ ВЭЖХ реакционной смеси октатимидилата после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-дидиодо-1,3,5-триазином (0.1M, 15 минут, 25°C) и введения остатков метиламина (N-5), и контрольного октатимидилата (К) (слева) и фрагмент электрофоретического профиля для олигонуклеотидов К, К-Tr (контроль, полученный с использованием 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина) и N-5 (справа).
Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-45% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02M водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм.

Наконец, была определена реакционная способность 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина. При введении модификации в состав октатимидилата в мягких условиях (0.1M, 15 минут, 25°C), выход модифицированного олигонуклеотида составил 15% (Рис. 40а, олигонуклеотид N-6); при этом в жестких условиях (0.25M, 1 час, 55°C) выход удалось повысить до 60% (Рис. 40а, олигонуклеотид N-7). Полученные данные согласуются с предыдущими – введение донорных остатков метанола в состав азидо-триазина в значительной мере снижает его реакционную способность. При проведении дополнительного анализа по подтверждению замещения метоксигрупп были получены неожиданные результаты. Согласно масс-спектру олигонуклеотида N-7, основным продуктом реакционной смеси является триазиниламидофосфатное производное с остатками метанола (Рис. 40б). Полученные результаты указывают на то, что в условиях деблокирования с твердофазного носителя замещения метоксигрупп в триазиновом остове не происходит, что противоречит литературным данным [157]. Кроме того, было установлено, что основным побочным продуктом в реакционной смеси является семизвенный гептатимидилат, что указывает на специфический характер деградации модифицированного звена в случае использования 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазина в качестве реагента-модификатора (подробнее см. в разделе 4.3.2). В связи с указанными факторами, ограничивающими функционализацию триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов, данный реагент не был использован в дальнейшей работе.

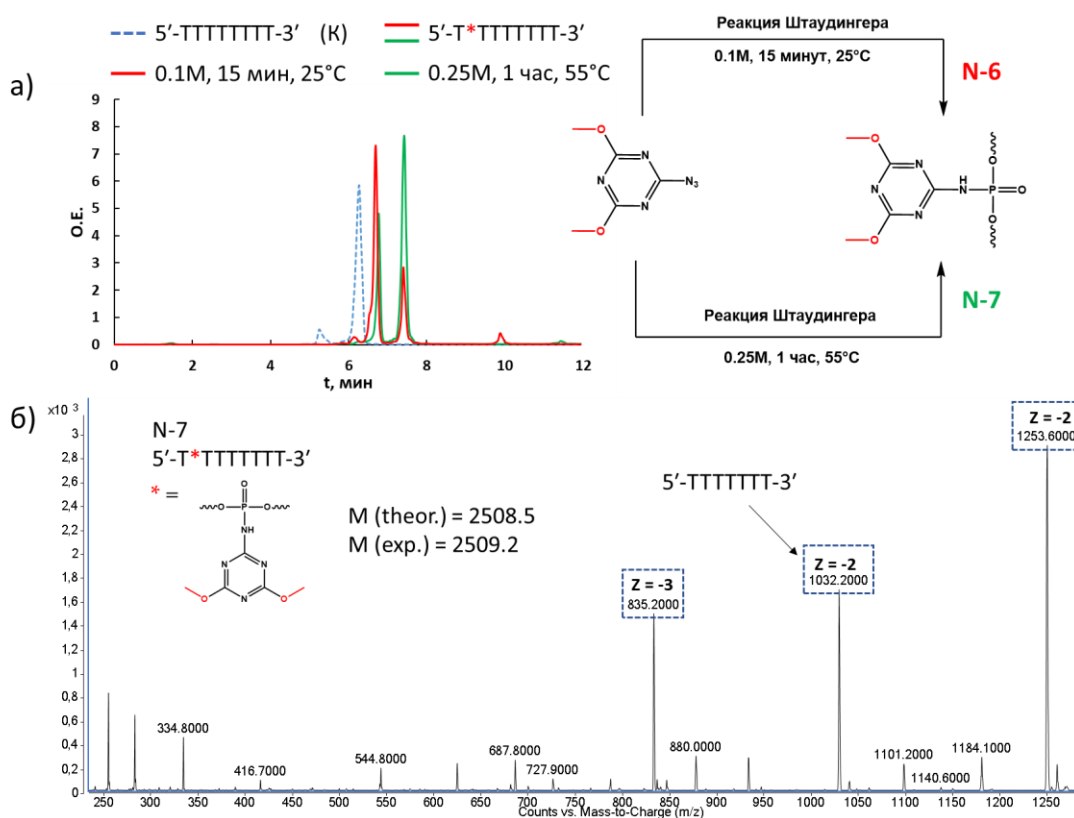


Рис. 40. Профили ОФ ВЭЖХ реакционной смеси октатимидилата после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-диметокси-1,3,5-триазином в мягких (0.1M, 15 минут, 25°C; олигонуклеотид N-6) и жестких (0.25M, 1 час, 55°C; олигонуклеотид N-7) условиях, и контрольного октатимидилата (К) (а) и фрагмент ESI-MS масс-спектра олигонуклеотида N-7 (б). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-45% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02M водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм.

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

4.3.2. Стабильность модифицированного звена олигонуклеотида

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

Как уже было отмечено выше, методология синтеза триазиламидофосфатных олигонуклеотидов включает отдельный этап β -элиминирования защитной цианоэтильной группы в составе триазирилфосфазенового звена с применением раствора DIPEA. В результате данной стадии, лабильный фосфазен, способный гидролизоваться в водных щелочных условиях до фосфатной группы и амина [119, 121, 158], переходит в более стабильную амидофосфатную форму. В случае исключения отдельного этапа β -элиминирования, удаление цианоэтильной защитной группы при модифицированном звене происходит в процессе отщепления олигонуклеотида от твердофазного носителя при обработке водным раствором метиламина, которая также может привести и к гидролизу фосфазена (Рис. 41).

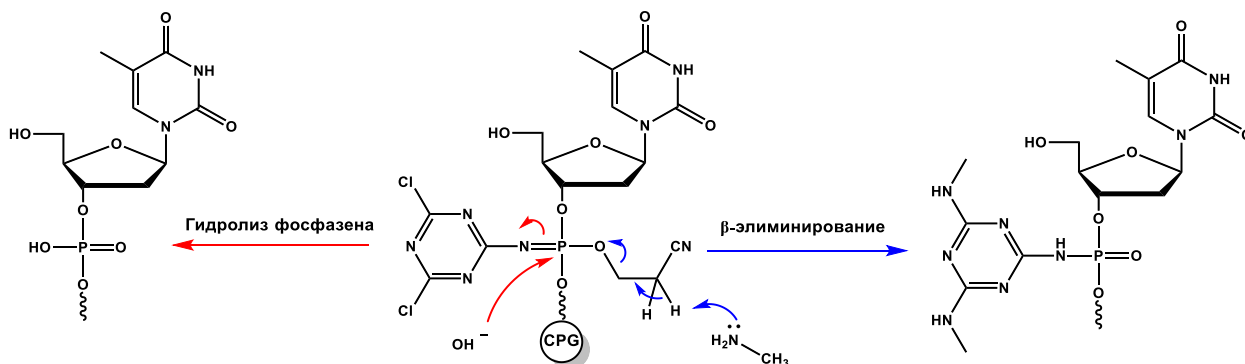


Рис. 41. Пути преобразования фосфазенового звена в ходе отщепления с твердофазного носителя при обработке водным раствором метиламина на примере олиготимидилата, модифицированного 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином по ближайшему к 5'-концу межнуклеотидному фосфату. Красными стрелками показан процесс гидролиза фосфазеновой связи, синими стрелками – процесс β -элиминирования. CPG – твердофазный носитель (controlled pore glass).

Для оценки степени подверженности триазирилфосфазенов к гидролизу был синтезирован ряд олиготимидилатов с использованием 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина и 2-азидо-4,6-диiodo-1,3,5-триазина в качестве наиболее реакционноспособных реагентов-модификаторов. С применением каждого из реагентов было синтезировано два варианта олигонуклеотидов. В первом варианте после получения триазирилфосфазена проводили отдельный этап β -элиминирования, после чего деблокировали олигонуклеотид с CPG водным раствором метиламина. Во втором варианте триазирилфосфазеновый олигонуклеотид деблокировали сразу после получения. По результатам анализа методом ОФ ВЭЖХ можно утверждать, что в случае каждого из реагентов исключение отдельного этапа β -элиминирования приводит к падению выходов целевого продукта (Рис. 42). При

этом, хлор-содержащий триазирилфосфазен гидролизуется с меньшей эффективностью по сравнению с иод-содержащим аналогом – в первом случае наблюдается уменьшение количества целевого олигонуклеотида в реакционной смеси с 90% до 75% (Рис. 42а; олигонуклеотиды N-1, N-8), а во втором – с 85% до 40% (Рис. 42б; олигонуклеотиды N-5, N-9). Такие различия в гидролитической стабильности триазирилфосфазенов могут быть связаны с различным акцепторным характером галогенов в триазиновом остове. Так, при протекании β -элиминирования триазирилфосфазеновая группа, содержащая атомы хлора, является более хорошей уходящей группой в сравнении с иод-содержащим аналогом, в связи с ее большей кислотностью. Как следствие, в ходе обработки хлор-содержащего фосфазена водным раствором метиламина, образование амидофосфата происходит с большей вероятностью, чем гидролиз фосфазена, а в случае иод-содержащего фосфазена – наоборот.

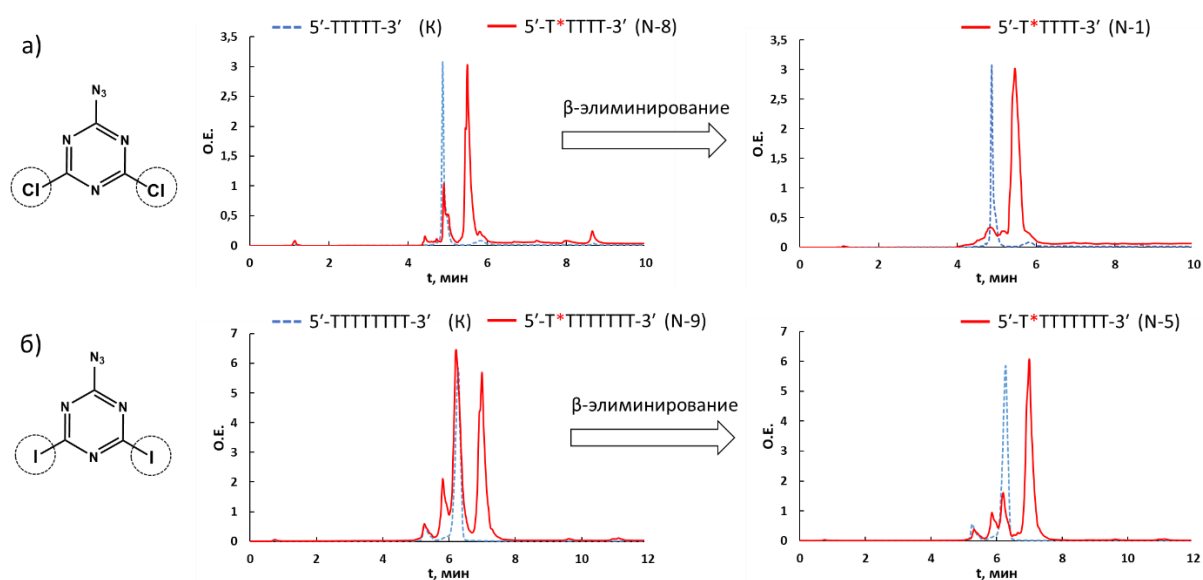


Рис. 42. Влияние этапа β -элиминирования на эффективность получения триазириламидофосфатных олигонуклеотидов с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (а) (олигонуклеотиды N-1 против N-8) и 2-азидо-4,6-диiodo-1,3,5-триазина (б) (олигонуклеотиды N-5 против N-9). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-90% (а) и 0-45% (б) ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм.

Таким образом, по результатам экспериментов была определена значимая роль предварительного элиминирования 2-цианоэтильной группы в повышении выходов триазириламидофосфатных олигонуклеотидов. В дальнейшем все функционализированные олигонуклеотиды, получаемые с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, были синтезированы с включением этапа β -элиминирования в синтетическую схему. При этом, значительная подверженность иод-содержащего триазирилфосфазена к гидролизу послужила дополнительной причиной для исключения 2-азидо-4,6-диiodo-1,3,5-триазина в качестве реагента-модификатора из дальнейшей работы.

4.3.2.2. Варианты деградации триазинилфосфазеновой группы и заместителей в ее составе

Для более детального исследования гидролитической стабильности триазинилфосфазенового звена был проведен ряд дополнительных экспериментов с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина в качестве реагента-модификатора на пентатимидилатной системе. В частности, была показана возможность полного гидролиза фосфазеновой связи при обработке олигонуклеотида водой в жестких условиях (12 часов, 55°C). При анализе электрофоретической подвижности олигонуклеотида было обнаружено, что единственным продуктом в реакционной смеси является немодифицированный пентатимидилат (Рис. 43а, олигонуклеотиды К и N-10, подвижность $\mu = 0,78$). Примечательно, что для полного гидролиза фосфазена, реакцию необходимо проводить достаточно длительное время – при менее жестких условиях (30 минут, 55°C) гидролизуется менее 10% фосфазена (данные не приведены).

Помимо стабильности фосфазеновой связи, дополнительно была оценена стабильность амидофосфатной связи, образуемой после элиминирования 2-цианоэтильной группы, до отщепления олигонуклеотида от твердофазного носителя. Было показано, что при обработке такого интермедиата водой в идентичных жестких условиях (12 часов, 55°C) амидофосфатная связь не подвергается гидролизу, однако атомы хлора в триазиновом остоле замещаются на гидроксильные группы (Рис. 43а, олигонуклеотид N-11), что было подтверждено масс-спектрометрическим анализом (Рис. 43б). Электрофоретический анализ выявил в реакционной смеси наличие одного олигонуклеотидного продукта, обладающего промежуточной подвижностью по сравнению с триазиниламидофосфатным олигонуклеотидом с двумя остатками метиламина и немодифицированным пентатимидилатом, при этом подвижность смещена к последнему (Рис. 57а, олигонуклеотиды К ($\mu = 0,78$), N-1 ($\mu = 0,56$), N-11 ($\mu = 0,72$)). Исходя из полученных данных было предположено, что в буферных условиях электрофореза (буфер TBE $\times 1$, pH = 8,3) олигонуклеотид N-11 обладает отрицательным зарядом в связи с депротонированием одной из гидроксильных групп.

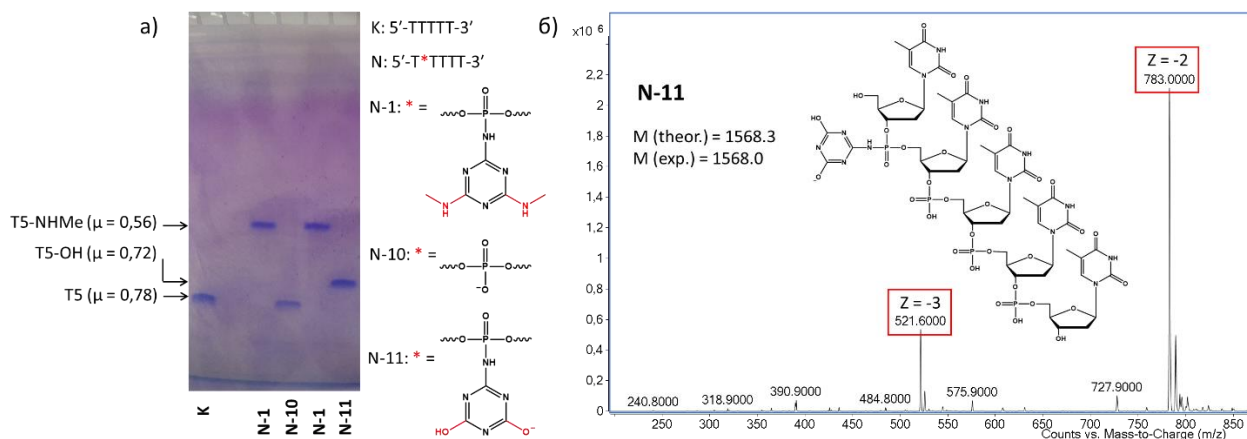
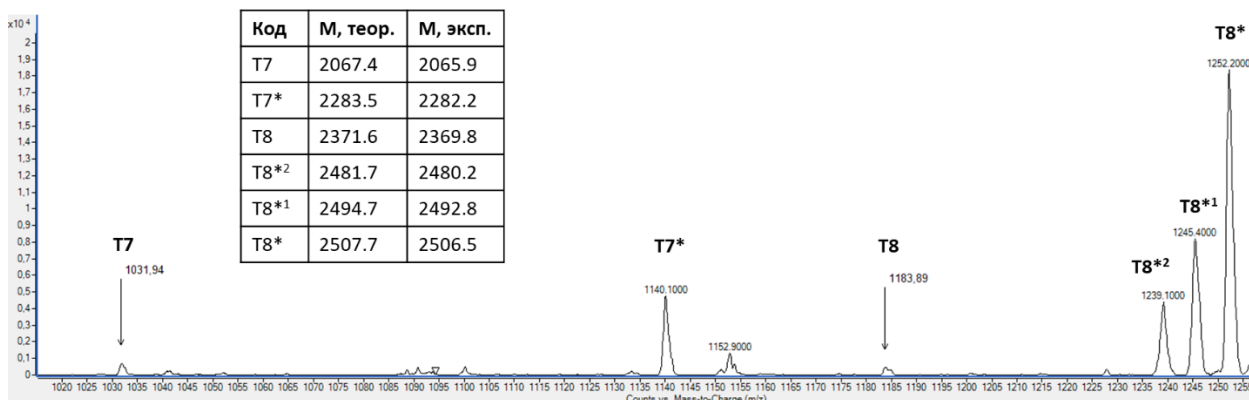


Рис. 43. Электрофоретический профиль олигонуклеотида К (контрольный пентатимидилат) и пентатимидилатов, модифицированных 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином, несущим остатки метиламина (N-1), гидроксильные группы (N-11), а также пентатимидилата, полученного после гидролиза триазирилфосфазена (N-10) (а), и фрагмент ESI-MS масс-спектра олигонуклеотида N-11 (б).

В ходе экспериментов по изучению стабильности фосфазеновой связи было также обнаружено, что все эфирные связи в составе триазирилфосфазеновой группы могут быть подвержены гидролизу. В случае предварительной обработки хлор-содержащего фосфазенового звена в составе октатимидилата кэпирующими растворами амидофосфитного синтеза (раствор «СарА»: 15% пропионовый ангидрид в ТГФ; раствор «СарВ»: 13% пиридин и 13% N-метилимидазол в ТГФ) и его последующим деблокированием с твердофазного носителя образуется широкий набор продуктов (олигонуклеотид N-12). Масс-спектрометрический анализ показал наличие в реакционной смеси целевого олигонуклеотида (T8*), немодифицированного октатимидилата (T8), укороченного гептатимидилата (T7), укороченного гептатимидилата с концевой модифицированной фосфатной группой (T7*), а также триазириламидофосфатных олигонуклеотидов, несущих одну (T8*¹) или две (T8*²) гидроксильных группы в триазиновом остове (Рис. 44а). Образование стандартных продуктов в виде целевого триазириламидофосфата (T8*) и немодифицированного олигонуклеотида (T8) происходит под действием β -элиминирования и гидролиза фосфазеновой связи соответственно (Рис. 44б, путь А и путь Б). В то же время, наблюдение укороченных олигонуклеотидов (T7* и T7) может быть объяснено только разрывом эфирных связей, соединяющих фосфазеновую группу с нуклеозидами (Рис. 44б, путь В). Вероятно, наличие таких продуктов обусловлено взаимодействием нуклеофильных компонентов кэпирующей смеси (пиридин и N-метилимидазол) с электрофильной фосфазеновой группой, что может приводить к гидролизу не только фосфазеновой, но и сложноэфирных связей. В свою очередь, наличие гидроксил-содержащих продуктов (T8*¹, T8*²) в реакционной смеси может быть связано с

характерным для хлор-содержащих триазинов образованием сложного эфира циануровой кислоты и его последующим гидролизом в ходе деблокирования олигонуклеотида с твердофазного носителя [159] (Рис. 44б, путь Г).

А)



б)

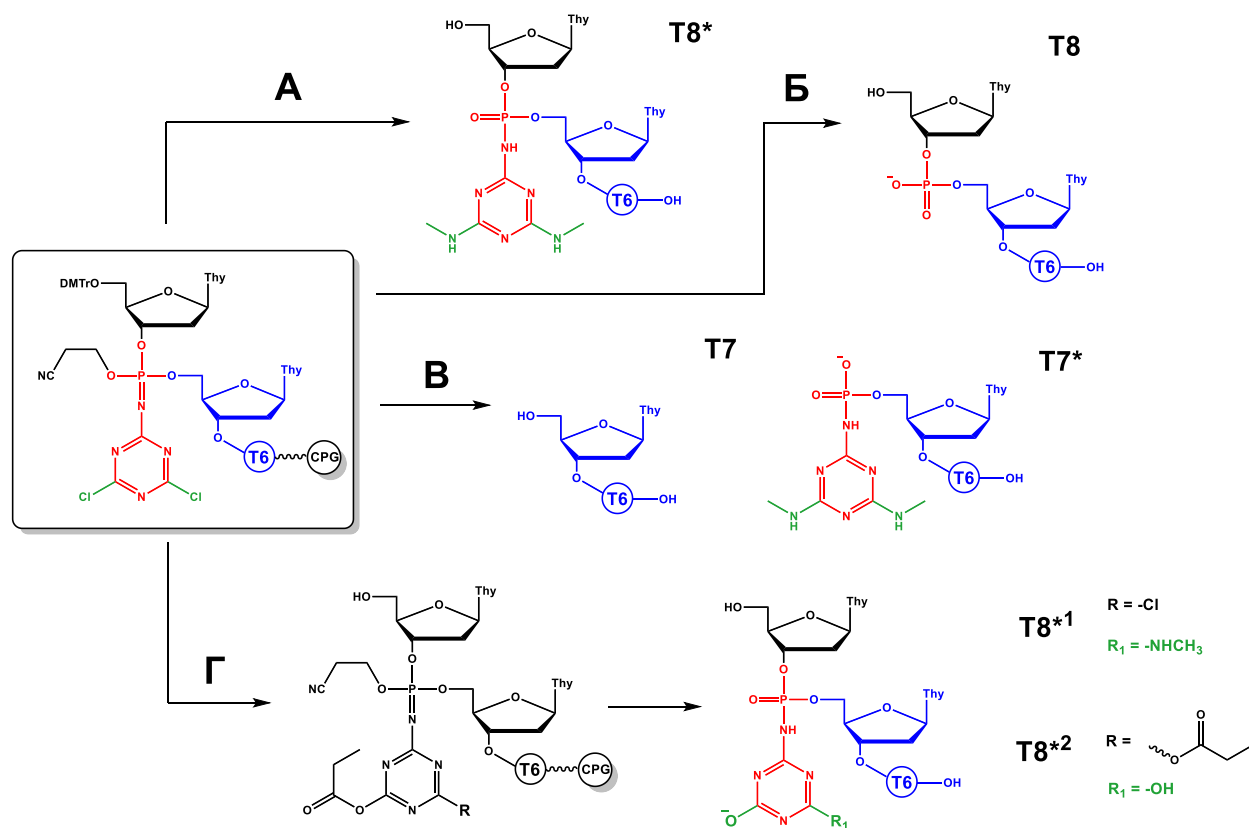


Рис. 44. Фрагмент ESI-MS масс-спектра в виде области двухзарядных ионов для реакционной смеси октатимидилата после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином (0.1M, 15 минут, 25°C) и обработки кэпирующим раствором амидофосфитного синтеза (олигонуклеотид N-12) (а) и предполагаемые пути преобразования триазирилфосфазенового звена (б). T6 – остаток гексатимидилата, Thy – тимидин, DMTr – 4,4'-диметокситритил, CPG – твердофазный носитель.

По результатам проведенных экспериментов можно заключить, что фосфазеновое ядро модификации в значительной степени подвержено гидролизу с различными

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

4.4. Разнообразие функциональных групп в составе триазиламидофосфатных олигонуклеотидов

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

Возможность получения широкого разнообразия представителей класса триазиламидофосфатных олигонуклеотидов с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина основана на использовании так называемой прекурсорной стратегии. После проведения реакции Штаудингера и дальнейшего β -элиминирования образуется промежуточное соединение в форме амидофосфата, содержащее атомы хлора в триазиновом остове. Данный интермедиат является прекурсором для всех триазиламидофосфатных олигонуклеотидов – путем замены раствора амина на последующей стадии замещения атомов хлора возможно гибкое варьирование вводимых функциональных остатков. Упрощенная синтетическая схема варьирования функциональных групп с обозначением прекурсора представлена на Рис. 45.

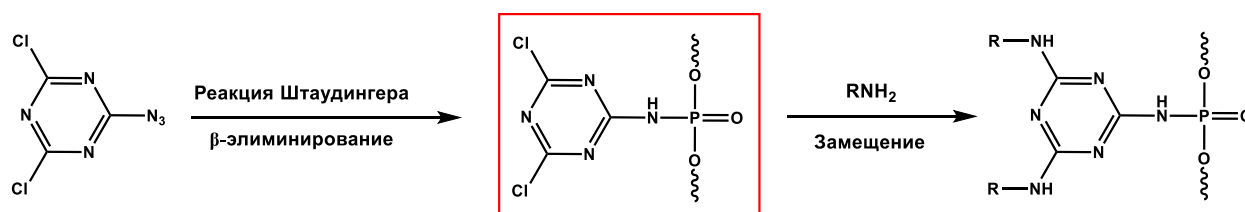


Рис. 59. Упрощенная синтетическая схема получения функционализированных триазиламидофосфатных олигонуклеотидов с использованием 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина.

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

С применением указанной синтетической схемы был получен широкий набор триазиламидофосфатных олигонуклеотидов, несущих функциональные заместители

различной природы. Основной упор в данной работе был сделан на введении гидрофобных и катионных заместителей, поскольку наличие таких групп в составе олигонуклеотида позволяет увеличить эффективность его проникновения в клетки, что является важным аспектом, определяющим терапевтический потенциал НК-производного [8, 160, 161]. Кроме того, с применением предложенной стратегии была исследована возможность введения дополнительных гидроксильных групп, часто используемых в качестве точек ветвления олигонуклеотидов [162, 163].

4.4.1.1. Одностадийное введение заместителей в триазиновый остов

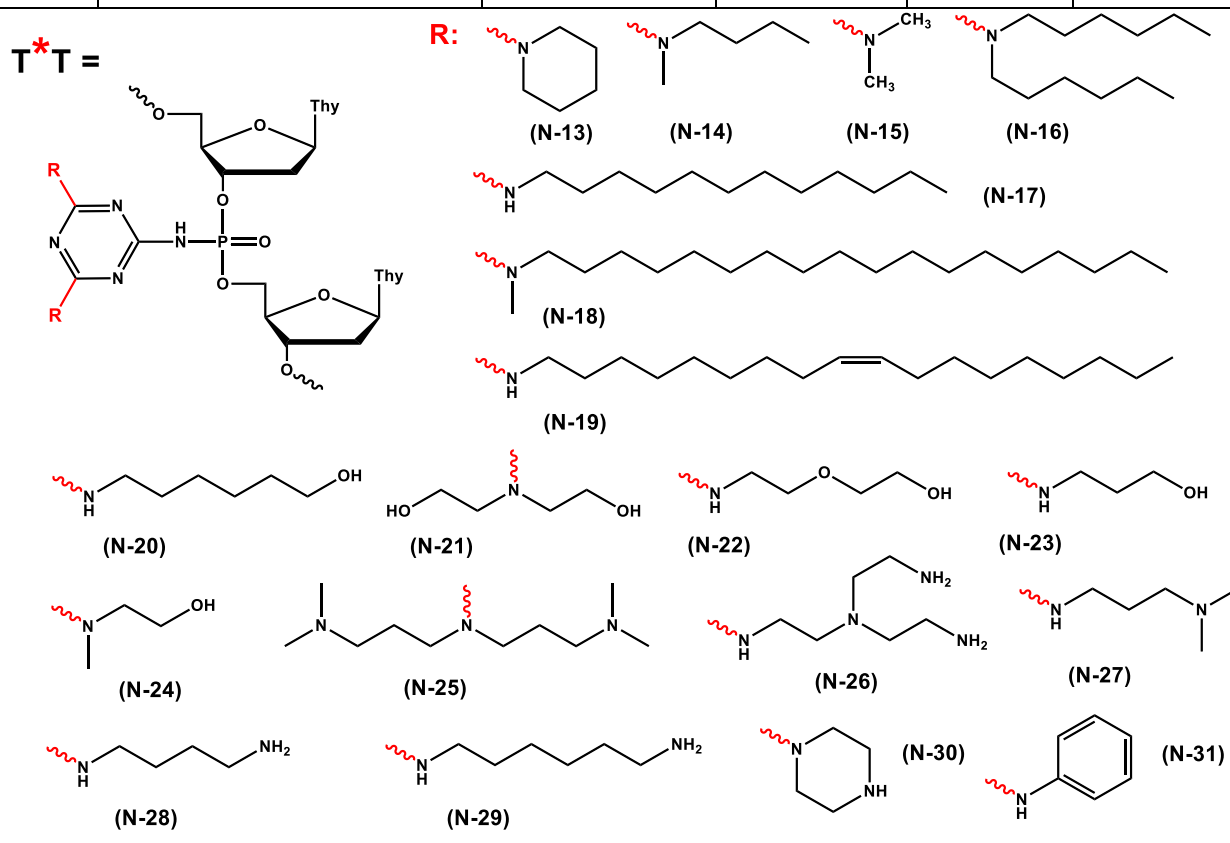
Для оценки эффективности введения различных алкиламиногрупп в состав триазинового остова модификации, были синтезированы модифицированные олиготимидилаты. В самом простом варианте реализации предложенной синтетической схемы было проведено одностадийное введение целевых алкиламиногрупп в состав прекурсора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

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

Код	Последовательность (5'→3')	Условия обработки амином	Конверсия, %	М (теор.)	М (эксп.)
N-13	T*TTTT*T	Условия 1	~80	2250.7	2250.8

Табл. 1, продолжение

N-14	T*TTTT	Условия 2	~50	2010.5	2010.6
N-15	T*TTTT	Условия 3	~40	1926.4	1926.6
N-16	T*TTTT	Условия 1	~70	1902.7	1902.6
N-17	T*TTTT	Условия 4	~90	1903.8	1902.6
N-18	T*TTTT	Условия 4	~90	2098.9	2098.8
N-19	T*TTTT	Условия 4	~80	2066.9	2066.6
N-20	T*TTTTTTTT	Условия 5	>95	3286.7	3287.7
N-21	T*TTTTTTTT	Условия 6	>95	3262.7	3262.8
N-22	T*TTTT	Условия 7	~90	2046.5	2046.4
N-23	T*TTTTTTTT	Условия 5	>95	3202.6	3203.6
N-24	T*TTTT	Условия 1	~90	1986.5	1986.6
N-25	TTTT*T	Условия 1	~90	1906.7	1906.6
N-26	T*TTTTTTTT	Условия 1	~90	3344.8	3345.0
N-27	T*TTTT	Условия 1	>95	2040.5	2040.6
N-28	T*TTTTTTTT	Условия 5	~90	3228.7	3229.6
N-29	T*TTTTTTTT	Условия 5	~90	3284.8	3285.8
N-30	T*TTTTTTTT	Условия 8	>95	3224.7	3225.6
N-31	T*TTTTTT	Условия 5	~70	2630.5	2631.0



При анализе результатов эффективности введения заместителей в триазиновый остов можно заметить, что степень конверсии в целевые олигонуклеотиды практически во всех случаях превышает 70%, что указывает на высокую реакционную способность хлорсодержащего прекурсора. В то же время, в связи со значительно варьируемыми условиями реакции замещения, затруднительно провести надежную корреляцию между эффективностью введения остатка амина и его структурой. Так, например, два остатка протяженного дигексиламина могут быть введены с эффективностью 70% в достаточно мягких условиях (10% об. раствор амина в ацетонитриле, 1 час, 25°C; Табл. 1, олигонуклеотид N-16), в то время как более компактный диметиламин встраивается в триазиновый остов с меньшей эффективностью (40%) в более жестких условиях (40% масс. раствор амина в воде, 15 минут, 55°C; Табл. 1, олигонуклеотид N-15). Тем не менее, для большинства производных были подобраны оптимальные условия введения остатков аминов, в том числе и протяженных алифатических, для обеспечения приемлемых выходов. Стоит отметить, в частности, олигонуклеотид, содержащий в триазиновом остове ароматические остатки анилина (Табл. 1, олигонуклеотид N-31), который был получен с хорошими выходами несмотря на крайне низкую нуклеофильность аминогруппы.

4.4.1.2. Поэтапная сборка заместителей в триазиновом остове

Помимо одностадийного введения алкиламиногрупп в триазиновый остов модификации, была показана возможность получения более сложных структур заместителей. Для этого была реализована стратегия поэтапной сборки на твердофазном носителе – после введения в триазиновый остов остатков алкиламинов, несущих определенные функциональные группы, иммобилизованный олигонуклеотид последовательно обрабатывали различными растворами с постепенным наращиванием цепи заместителя. Подобная стратегия модификации олигонуклеотидов применяется достаточно широко в связи с высокой эффективностью реакций, протекающих на твердофазном носителе [164–166]. В данной работе была показана возможность поэтапной сборки на примере наращивания цепи заместителей, содержащих первичные или вторичные аминогруппы, и гидроксильные группы; некоторые характерные примеры сборки приведены на Рис. 46. Так, например, к остаткам пиперазина в составе триазиниламидофосфатной группы, (Рис. 46, соединение I) были присоединены *п*-толуолсульфонильная (тозильная) группа через соответствующий сульфонилхлорид (N-32), а также остаток цианурхлорида с дальнейшим замещением атомов хлора на остатки метиламина или бутиламина (N-33, N-34). Первичные аминогруппы в составе остатков

трис-(2-аминоэтил)амин, присоединенных к триазиновому остову (Рис. 46, соединение II) были модифицированы О-метилизомочевинной с получением гуанидиновых групп (N-36), а также уксусным ангидридом с получением ацетамида (N-38). К спиртовым гидроксильным группам 3-аминопропанола-1 (Рис. 46, соединение III) были присоединены тимидилатные звенья после проведения одного цикла автоматического синтеза (N-41). Кроме того, гидроксильная группа в составе 3-аминопропанола-1 была конвертирована в остаток алкиламина по механизму нуклеофильного замещения типа S_N2 путем последовательной активации гидроксильной группы тозилхлоридом и обработки промежуточного соединения пиперидином (N-40).

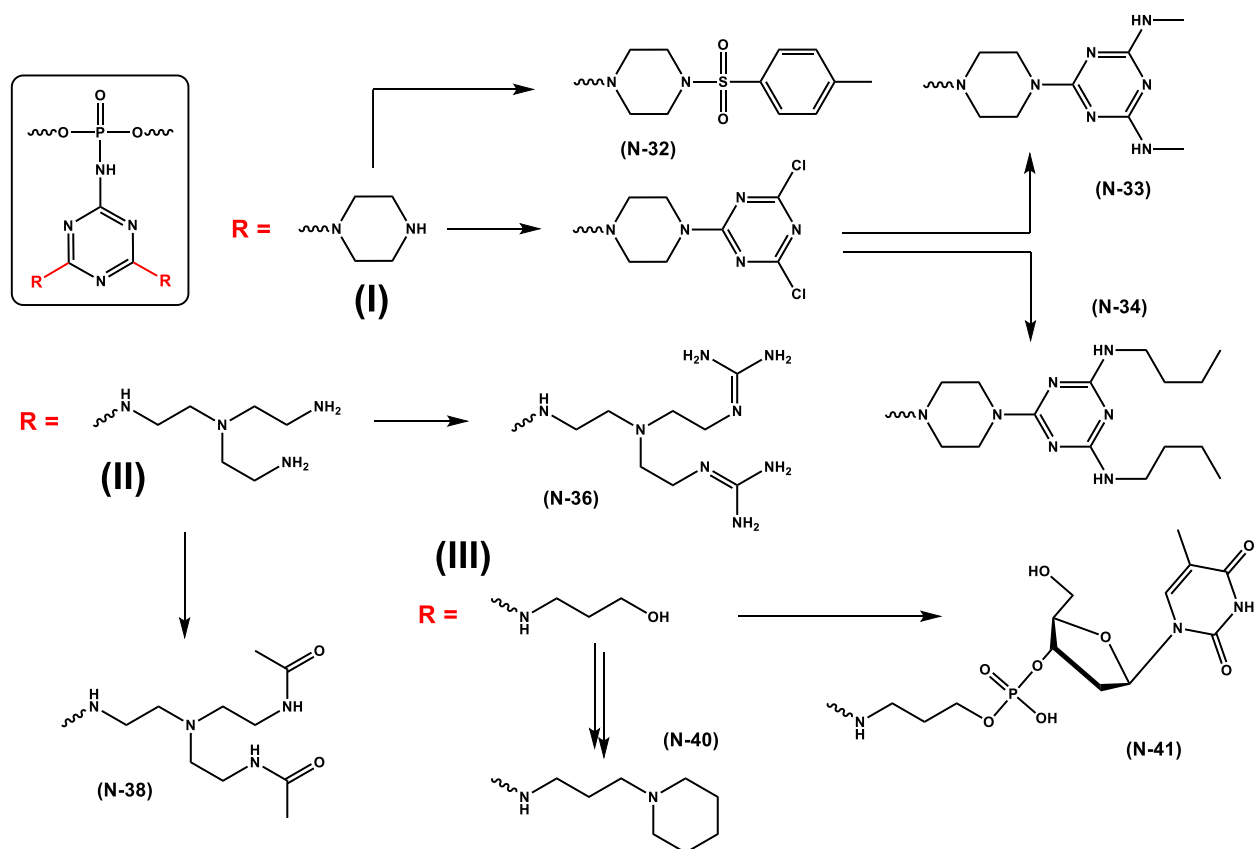


Рис. 46. Примеры поэтапной сборки сложных заместителей в составе триазинового остова из исходных остатков пиперазина (структура I), трис-(2-аминоэтил)амин (структура II) и 3-аминопропанола-1 (структура III).

Представленные схемы являются лишь некоторыми примерами поэтапной сборки. Полный список олигонуклеотидов с указанием последовательности обработок триазиламилофосфатного прекурсора представлен в Табл. 2. Во всех случаях реакционные смеси были проанализированы методом ESI-MS масс-спектрометрии, по данным которой было показано наличие структур с целевыми массами, что указывает на принципиальную возможность использования такого подхода. Однако, в некоторых случаях при получении подобных производных образуется множество побочных продуктов

неполного протекания реакций при сборке заместителей. При этом, количество побочных продуктов кратно увеличивается при увеличении стадий сборки даже на один этап. Например, эффективность модификации остатка пиперазина тозилхлоридом (производное N-32) составляет порядка 90%, в то время как при введении в остаток пиперазина остатка цианурхлорида с последующим замещением атомов хлора на остатки алкиламинов (производные N-33, N-34) – около 50% (данные не приведены).

Табл. 2. Список триазириламидофосфатных олигонуклеотидов, содержащих сложные заместители и этапы сборки заместителей. TsCl – *n*-толуолсульфонилхлорид, MeNH₂ – метиламин, BuNH₂ – бутиламин, трис-амин – трис-(2-аминоэтил)амин, DMI-Cl – (2-хлоро-1,3-диметил)имидазолидин гексафторфосфат, CAP – кэпирующая смесь амидофосфитного синтеза (15% уксусного ангидрида в ТГФ), тимидилат – цикл присоединения тимидилатного звена, дитимидилат – два цикла присоединения тимидилатного звена. Условия обработки приведены в разделе 3.3.

Код	Последовательность	Этапы обработки	М (теор.)	М (эксп.)
N-32	5'-Т*ТТТТТТТТТТ-3'	Пиперазин, TsCl	3532.7	3533.4
N-33	5'-Т*ТТТТТТТТТТ-3'	Пиперазин, цианурхлорид, MeNH ₂	3498.8	3498.9
N-34	5'-Т*ТТТТТТТТТТ-3'	Пиперазин, цианурхлорид, BuNH ₂	3667.0	3667.8
N-35	5'-Т*ТТТТТТТТТТ-3'	Пиперазин, цианурхлорид, пиперазин, TsCl	4335.0	4335.9
N-36	5'-Т*ТТТТТТ-3'	Трис-амин, О- метилизомочевина	2297.9	2297.6
N-37	5'-Т*Т-3'	Трис-амин, DMI-Cl	1296.7	1296.0
N-38	5'-Т*ТТТТТТ-3'	Трис-амин, CAP	1992.6	1992.4
N-39	5'-Т*ТТТТТТТТТТ-3'	1,6-диаминогексан, TsCl	3592.8	3593.4
N-40	5'-Т*Т-3'	3-аминопропанол-1, TsCl, пиперидин	904.4	905.4
N-41	5'-ТТ(Т) ₂ *ТТТТТТТТ-3'	3-аминопропанол-1, тимидилат	3202.6	3203.6
N-42	5'-ТТ(Т) ₂ *ТТТТТТТТ-3'	6-аминогексанол-1, тимидилат	3286.7	3287.6
N-43	5'-ТТТ(Т) ₂ *ТТТТТТТТ-3'	2-(2-аминоэтокси)этанол, дитимидилат	3870.8	3871.2

Стоит отметить, что с учетом возможности широкого варьирования условий реакции обработки иммобилизованного олигонуклеотида, сборка сложных заместителей в каждом случае может быть оптимизирована. Необходимость проведения такой оптимизации с целью повышения выходов целевых продуктов может быть обусловлена, например, уникальными физико-химическими и/или биологическими свойствами подобных триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов.

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

Алкиламинозамещенные триазины, в частности 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазины, также позволяют получать функционализированные олигонуклеотиды, причем атом хлора в триазиновом кольце может быть замещен на произвольный остаток алкиламина, что позволяет получать, в частности, несимметрично замещенные триазиниламидофосфатные производные (Рис. 47а). Стоит отметить, что при использовании азидо-триазинов, содержащих в своем составе одну функциональную группу, возможно последующее введение в состав прекурсора другой функциональной группы (Рис. 47а). Данное обстоятельство является главным преимуществом указанного подхода к функционализации, позволяющим еще более тонко настраивать свойства олигонуклеотидов.

На примере серии 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов, содержащих гидрофобные остатки додециламина, олеиламина и (N-метил-N-октадецил)амина, были получены монофункционализированные триазиниламидофосфатные пентатимидилаты; остатки метиламина были введены в триазиновый остов в процессе финального деблокирования олигонуклеотида. В соответствии с обнаруженными закономерностями по реакционной способности азидо-триазинов, для проведения реакции Штаудингера с указанными реагентами были выбраны несколько более жесткие условия по сравнению с таковыми для 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (0.1M концентрация азиды, 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 олигонуклеотидов с остатками олеиламина и (N-метил-N-октадецил)амина (N-45, N-46) (Рис. 47б). Такая разница в выходах при переходе к более протяженным алифатическим остаткам может быть объяснена как усилением донорного характера соответствующих азидо-триазинов, так и стерическими затруднениями. Оба этих фактора снижают эффективность реакции Штаудингера, что согласуется с литературными данными [119].

Как следствие, при работе с азидо-триазидами, содержащими объемные заместители, целесообразно повышать параметры реакции модификации.

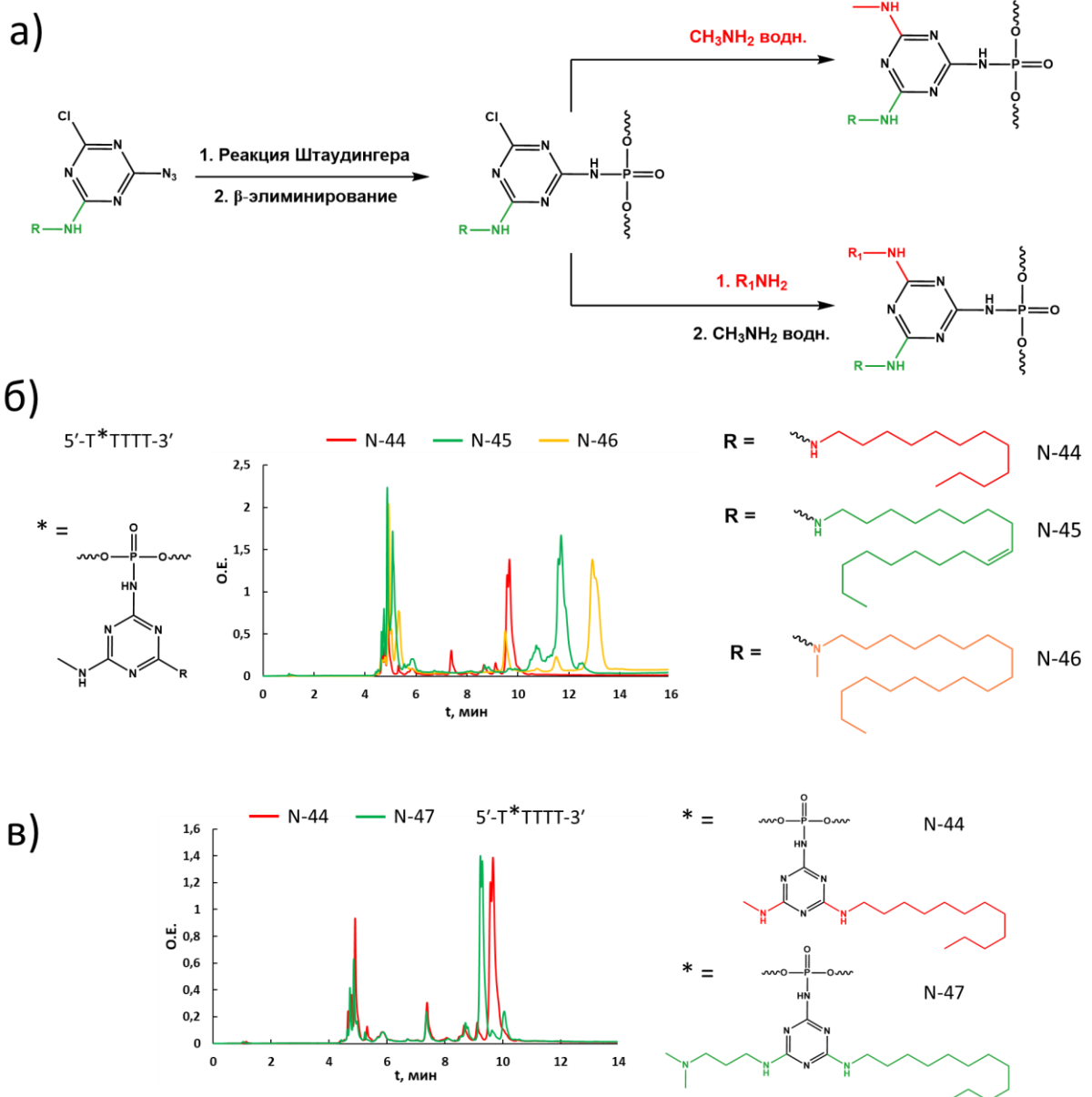


Рис. 47. Общая схема получения несимметрично замещенных триазириламидофосфатных олигонуклеотидов с применением 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов (а) и профили ОФ ВЭЖХ реакционных смесей триазириламидофосфатных пентатимидилатов, содержащими при триазиновом остове остатки додециламина и метиламина (N-44), олеиламина и метиламина (N-45), (N-метил-N-октадецил)амина и метиламина (N-46), додециламина и (N,N-диметиламинопропил)амина (N-47) (б, в). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-90% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм.

Эффективность предложенного подхода для получения несимметрично замещенных триазириламидофосфатных производных была показана на примере получения олигонуклеотида, содержащего в одном триазиновом остове остатки гидрофобного додециламина и положительно заряженного (N,N-диметиламинопропил)амина (DMAPA)

(N-47). По результатам ОФ ВЭЖХ реакционной смеси можно оценить эффективность встраивания остатка ДМАРА в триазиновый остов додецил-содержащего прекурсора (Рис. 47в). В выбранных условиях ВЭЖХ введение положительно заряженного остатка ДМАРА уменьшает время удерживания додецил-содержащего олигонуклеотида (N-44) примерно на полминуты, что достоверно отличает оба производных по хроматографической подвижности. На профиле ВЭЖХ реакционной смеси олигонуклеотида N-47 практически отсутствует пик, соответствующий производному N-44, что свидетельствует о количественном встраивании остатка ДМАРА в триазиновый остов модификации.

С применением азидо-триазинов типа 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазинов также возможно введение различных функциональных групп в состав олигонуклеотида. Такой подход гораздо менее предпочтителен в связи с необходимостью синтеза отдельного модификатора для каждой функциональной группы, а также низкой эффективностью реакции Штаудингера в данном варианте. Тем не менее в рамках данного подхода был синтезирован один модификатор, несущий в своем составе остатки бутиламина, который далее был введен в состав пентатимидилата (олигонуклеотид N-48). По результатам ВЭЖХ анализа видно, что конверсия в целевой продукт не превышает 15% при очень жестких условиях реакции Штаудингера (0.5М раствор, 1 час, 65°C) (Рис. 48). При этом, как было показано выше (разд. 4.3.1), олигонуклеотид, содержащий в триазиновом остове менее протяженные остатки метиламина, в тех же условиях может быть получен с эффективностью более 90% (олигонуклеотид N-3, Рис. 48). Исходя из полученных результатов можно предположить, что при усложнении структуры заместителей, входящих в состав подобных реагентов-модификаторов, реакция Штаудингера будет протекать с еще более низкой эффективностью. Данное обстоятельство значительно ограничивает возможность широкого варьирования функциональных групп с применением указанного подхода.

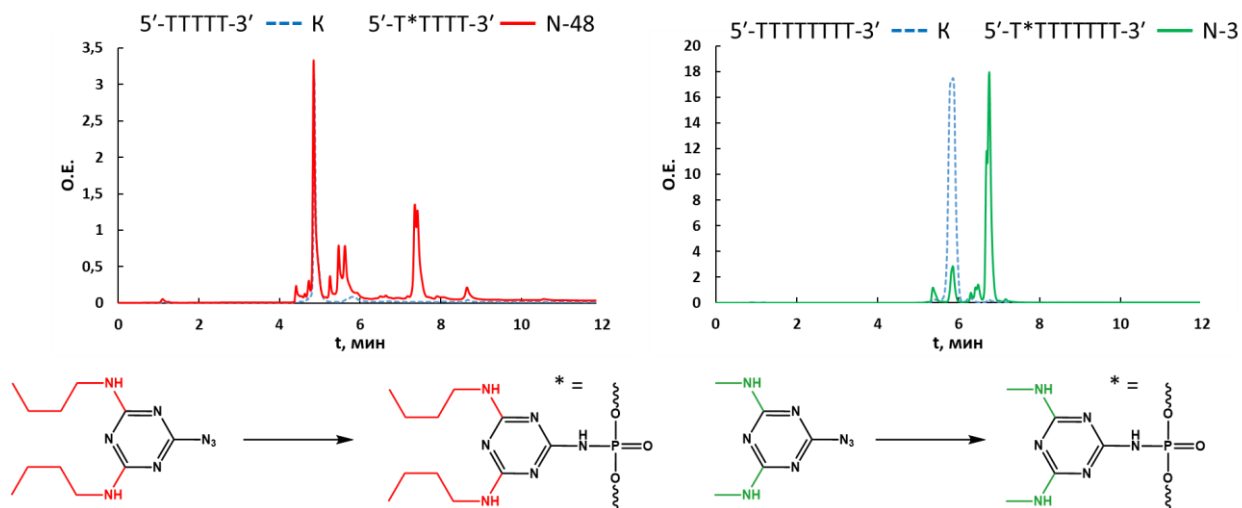


Рис. 48. Профили ОФ ВЭЖХ реакционных смесей пентатимидилата после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-дибутиламино-1,3,5-триазином и контрольного пентатимидилата (К и N-48, слева), и октатимидилата после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-диметиламино-1,3,5-триазином и контрольного октатимидилата (К и N-3, справа). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-90% (для К и N-48) или 0-45% (для К и N-3) ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм.

В рамках данного исследования с применением трех типов реагентов, содержащих в триазиновом остове различные комбинации атомов хлора и остатков алкиламинов, был получен широкий набор функционализированных триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов. Первый подход, основанный на применении 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, позволяет введение функциональных заместителей в состав активного амидофосфатного прекурсора, что во многом определяет его эффективность. Также с применением данного подхода была реализована стратегия поэтапной сборки заместителей на твердофазном носителе с возможностью оптимизации реакций, что позволяет создавать НК-конструкции со сложными функциональными группами. Основным ограничением данного подхода можно назвать невозможность введения двух различных функциональных групп в один триазиновый остов, что несколько снижает его гибкость. С другой стороны, при использовании подходящих 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов в рамках второго подхода возможно создание производных с несимметрично замещенным триазиновым остовом, несущим желаемую комбинацию функциональных групп. Наиболее прямолинейным, т.е. позволяющим введение двух функциональных групп в состав олигонуклеотида после проведения только реакции Штаудингера, можно назвать третий подход, основанный на использовании 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазинов. Данный подход, однако, в значительной мере ограничен в применении в связи с низкой реакционной способностью реагентов, падающей с усложнением структур заместителей.

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

4.5. Границы применимости подхода к получению триазириламинофосфатных олигонуклеотидов

В данной работе при оценке реакционной способности азидо-триазинов и получении библиотеки триазириламинофосфатных олигонуклеотидов в качестве модельных систем были выбраны олиготимидилаты. Такой выбор обусловлен рядом факторов, таких как простота и скорость получения олиготимидилатов, а также отсутствие гипотетических побочных реакций хлор-содержащих производных 1,3,5-триазина по экзоциклическим аминогруппам азотистых оснований (см. раздел 4.3). Кроме того, во всех случаях модификации были введены в ручном режиме во избежание образования возможных побочных продуктов при обработке триазирил-фосфазеновой группы различными реагентами амидофосфитного синтеза (см. раздел 4.3.2.2).

В рамках более детального исследования границ применимости разработанного подхода был проведен ряд дополнительных экспериментов. Так, например, была рассмотрена возможность использования гетероолигонуклеотидов и 2'-замещенных олигорибонуклеотидов в качестве альтернативных олигонуклеотидных систем для получения триазириламинофосфатов. В отличие от олиготимидилатов, подобные системы приближены к практически используемым терапевтическим и диагностическим НК-конструкциям [3]. Также была исследована возможность синтеза триазириламинофосфатных олигонуклеотидов по различным адаптированным методам в полностью автоматическом режиме.

4.5.1. Автоматизированное получение триазириламинофосфатных олигонуклеотидов

Для оценки возможности получения триазириламинофосфатных олигонуклеотидов в автоматическом режиме целесообразно использование азидо-триазинов, способных эффективно встраиваться в олигонуклеотид при комнатной температуре в связи с невозможностью термостатирования ДНК-синтезатора. Данное ограничение не позволяет использовать 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазины для введения модификации в связи с их малой реакционной способностью в мягких условиях (см. разд. 4.3.1). В то же время при попытках введения модификации с использованием наиболее реакционноспособного 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина были получены такие же результаты, как и в случае

обработки триазирилфосфазенового звена кэпирующей смесью и дальнейшего деблокирования (олигонуклеотид N-12, раздел 4.3.2.2). В данном случае происходит множество побочных реакций деградации модифицированного звена. Кроме того, в ходе окисления фосфит-триэфира данным азидо-триазином в насосах синтезатора образуется нерастворимый белый осадок. В совокупности данные факторы исключают возможность использования и 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина для автоматизированного введения модификации.

Возможность эффективного автоматического синтеза триазириламидофосфатных олигонуклеотидов была продемонстрирована только после перехода к реагентам-модификаторам промежуточной реакционной способности в виде 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазинов, несущих компактные остатки алкиламинов. Более донорный характер триазинового остова в подобных реагентах понижает вероятность замещения атома хлора в ходе твердофазного синтеза на различные нуклеофильные компоненты, в то время как компактные остатки алкиламинов нивелируют возможные стерические затруднения при протекании реакции Штаудингера. В качестве реагентов-модификаторов для автоматического встраивания в олигонуклеотид были выбраны азидо-триазины, несущие остатки бутиламина, морфолина и метиламина. Модификации были введены в октатимидилат по ближайшему к 3'-концу межнуклеотидному фосфату (5'-TTTTTTT*Т-3') в выбранных условиях реакции Штаудингера (0.25М раствор азиды, этап окисления – 2 часа; общая схема введения модификации приведена на Рис. 49). Такое расположение модификации позволит оценить не только эффективность ее введения, но и стабильность триазинового остова, несущего один атом хлора, в условиях автоматического синтеза. Анализ ОФ ВЭЖХ олигонуклеотидов, модифицированных соответствующими азидо-триазинами (N-49, N-50, N-51), ожидаемо показал прямую зависимость конверсии в целевой продукт от размера заместителей (данные суммированы в таблице при Рис. 49).

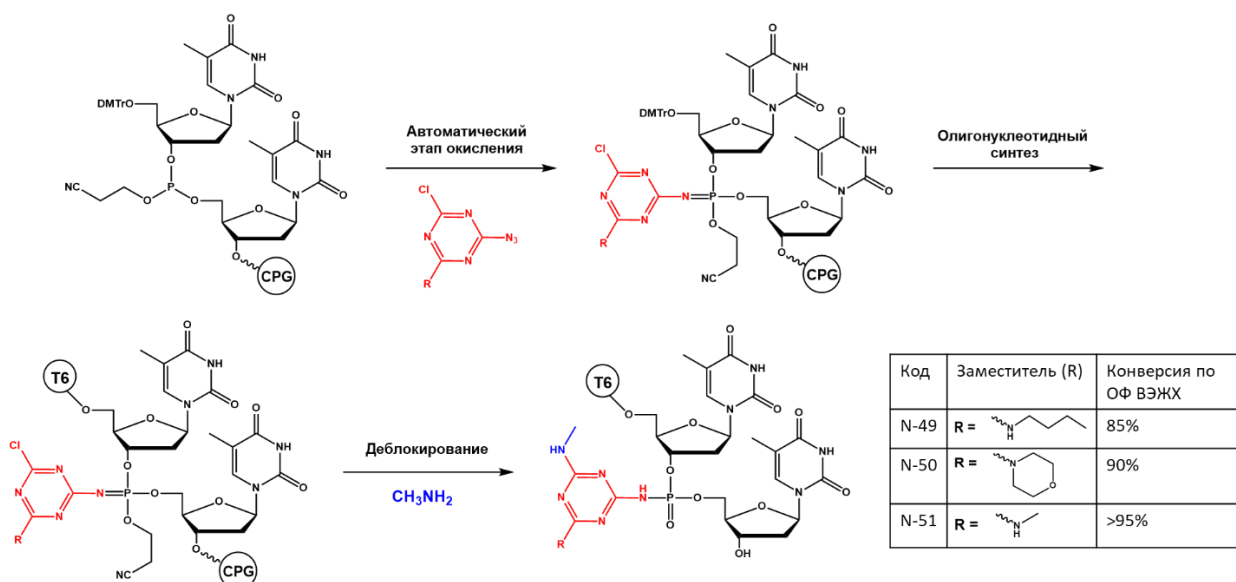


Рис. 49. Общая схема введения триазиламидофосфатных модификаций в состав олигонуклеотидов 5'-TTTTTTT*T-3' в автоматическом режиме с использованием азидо-триазинов, содержащих остатки бутиламина, морфолина и метиламина (олигонуклеотиды N-49, N-50, N-51 соответственно), и оценка эффективности введения модификаций по конверсии в целевой продукт, определенной по ОФ ВЭЖХ.

Наиболее удовлетворительных результатов удалось достичь при использовании 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина в качестве реагента-модификатора – в выбранных условиях введения модификации конверсия в целевой продукт по результатам ВЭЖХ составила более 95% (олигонуклеотид N-51, Рис. 50). С использованием данного реагента-модификатора также была показана возможность множественного введения триазиламидофосфатных модификаций в автоматическом режиме в состав олигонуклеотидов. Так, были получены октатимидилаты, содержащие от 2 до 4 последовательно введенных модификаций со стороны 3'-конца (олигонуклеотиды N-52, N-53, N-54). Анализ ВЭЖХ реакционных смесей показал, что введение двух модификаций подряд протекает практически количественно, однако с последующим увеличением количества модификаций выходы целевых продуктов падают до 80% для трех, и до 60% для четырех модификаций соответственно (Рис. 50, N-53, N-54). Вероятно, такое падение выходов связано со стерическими эффектами объемных триазиновых групп, препятствующих протеканию последующих реакций модификации.

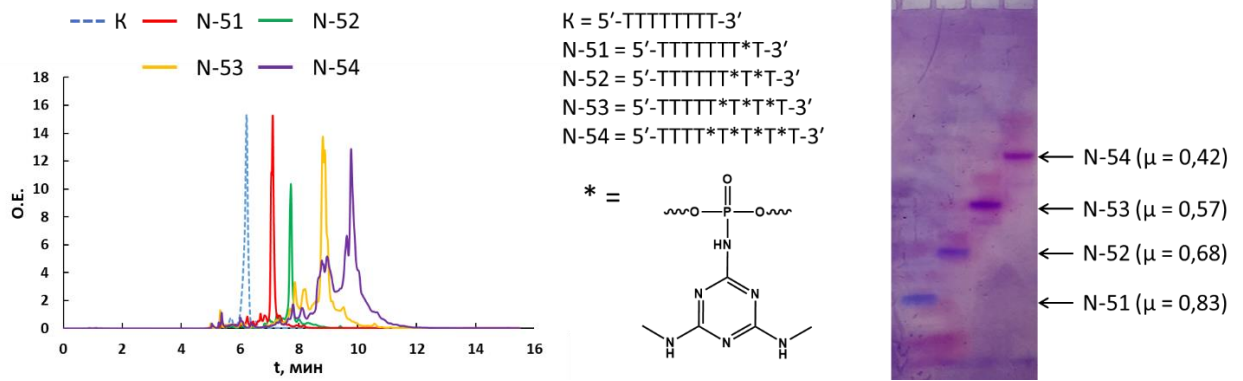


Рис. 50. Профили ОФ ВЭЖХ реакционных смесей контрольного олигонуклеотида К (немодифицированный октатимидилат) и октатимидилатов, содержащих одну (N-51), две (N-52), три (N-53), и четыре (N-54) модификации, введенные в автоматическом режиме с использованием 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина (слева) и электрофоретический профиль выделенных олигонуклеотидов N-51 – N-54 (справа). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-45% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм.

Электрофоретический анализ очищенных олигонуклеотидов N-51 – N-54 показал характерное уменьшение подвижности производных равными интервалами при увеличении числа электронейтральных модификаций [140], что дополнительно подтверждает получение целевых продуктов (Рис. 50). Интересно отметить, что окраска олигонуклеотидов красителем StainsAll ослабевает при увеличении числа модификаций, что связано с уменьшением электростатических взаимодействий между отрицательно заряженными фосфатными группами и положительно заряженным красителем.

4.5.2. Получение триазиламидофосфатных НК-производных различного нуклеотидного состава

Первоначально была оценена возможность введения модификации в состав гетероолигонуклеотидов. По стандартной методике с применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина (0.1М концентрация азида, 15 минут, 25°C с последующим β -элиминированием) было получено два олигонуклеотида последовательностей 5'-Т*АСГТ-3' (N-55) и 5'-Г*СГССАААСАТ-3' (N-56), содержащих простейшую триазиламилофосфатную группу по ближайшему к 5'-концу межнуклеотидному фосфату. По результату ОФ ВЭЖХ (Рис. 51) и масс-спектрометрического анализа реакционных смесей олигонуклеотидов (Приложение 1) было установлено, что при выбранных условиях реакции Штаудингера в реакционной смеси отсутствуют какие-либо специфические побочные продукты в значимом количестве; дополнительные пики на

профиле ВЭЖХ соответствуют продуктам стандартной частичной деградации фосфит-триэфирного звена.

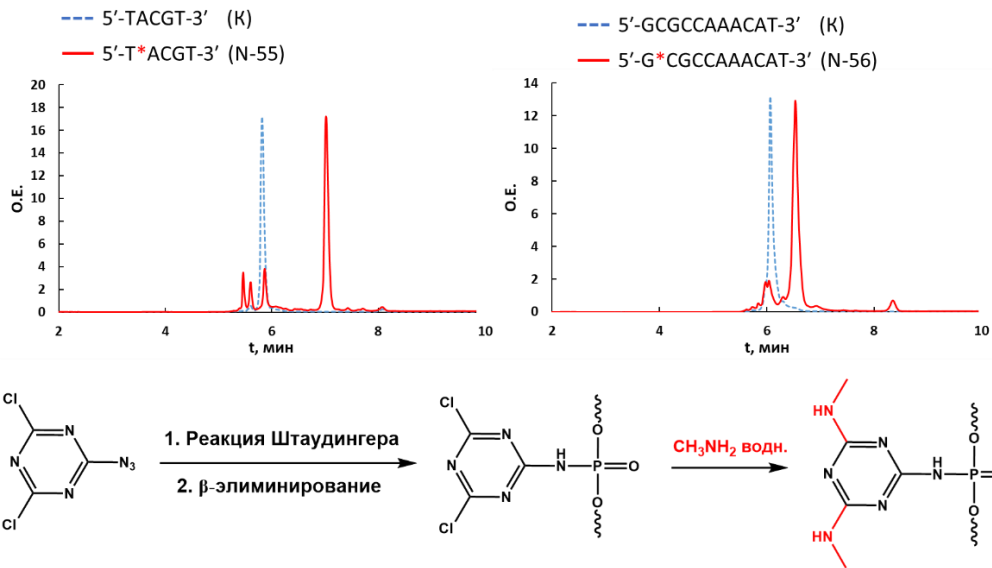


Рис. 51. Профили ОФ ВЭЖХ реакционных смесей гетероолигонуклеотидов последовательностей 5'-Т*АСГТ-3' (N-55) и 5'-G*CGCCAAACAT-3' (N-56) после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином. Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-45% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм.

Для оценки принципиальной возможности протекания побочных реакций при модификации гетероолигонуклеотидов 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином, была проведена дополнительная серия экспериментов. Нуклеозиды (аденозин, цитидин, гуанозин, тимидин), иммобилизованные на твердофазном носителе и содержащие стандартные для амидофосфитного синтеза защитные группы (Рис. 52а), были обработаны 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином в мягких (0.1М раствор, 15 минут, 25°C) и в жестких (0.5М раствор, 1 час, 55°C) условиях. Далее проводили стандартные операции олигонуклеотидного синтеза – деблокирование диметокситритильной защитной группы и отщепление нуклеозидов от твердофазного носителя с одновременным деблокированием защитных групп азотистых оснований. По результатам ТСХ анализа полученных реакционных смесей видно, что все нуклеозиды практически интактны к обработке указанным азидо-триазином в мягких условиях (Рис. 52б, реакционные смеси А, А1, С, С1, G, G1, Т, Т1). Обработка пуриновых нуклеозидов 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином в жестких условиях приводит к их полной деструкции (Рис. 52б, реакционные смеси А, А2, G, G2), в то время как количество пиримидиновых нуклеозидов меняется незначительно (Рис. 52б, реакционные смеси Т, Т2, С, С2). Вероятно, в этих условиях, за счет частичного гидролиза 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина, происходит кислотный гидролиз N-гликозидной связи, характерный для N6/N2-ацилированного аденозина/гуанозина, и в

меньшей мере для N4-ацилированного цитидина. [167, 168]. На примере реакционных смесей гуанозина методом ОФ ВЭЖХ было подтверждено уменьшение количества пуриновых нуклеозидов при постепенном повышении параметров реакции без образования побочных продуктов (Рис. 52в; условия обработки приведены в таблице при Рис. 52). Также стоит отметить, что в ходе данного эксперимента было показано, что в мягких условиях обработки 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином (условия С1) цитидин остается интактным (трансформация цитидин→дезоксигуанидин по реакции дезаминирования). Спектральные соотношения (по данным ВЭЖХ: 250/260 (0.857), 270/260 (1.222), 280/260 (0.994), 290/260 (0.344)), а также максимум и минимум спектра поглощения ($\lambda_{\max} = 270$ нм, $\lambda_{\min} = 250$ нм) соответствуют литературным данным (Рис. 52г).

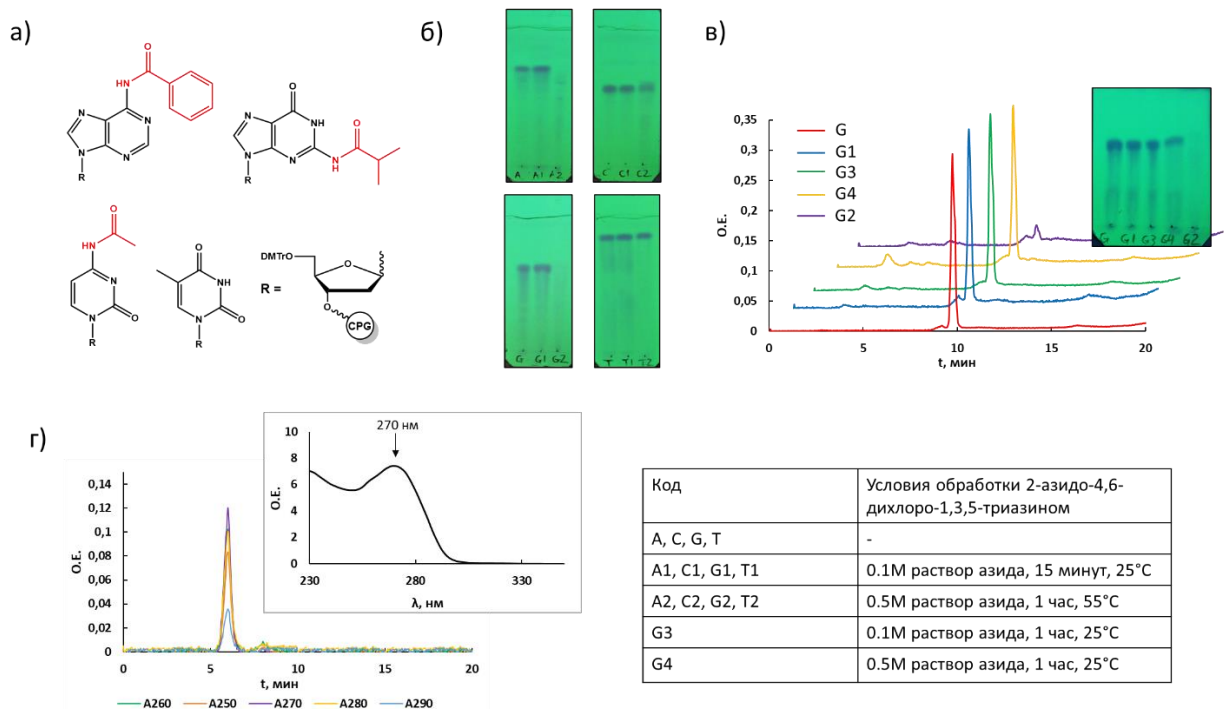


Рис. 52. Структуры нуклеозидов, иммобилизованных на твердофазном носителе, содержащих защитные группы (а), профили ТСХ контрольных нуклеозидов и нуклеозидов, обработанных 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином в различных условиях (б), профиль ОФ ВЭЖХ и оптический спектр цитидина, обработанного 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином в мягких условиях (в), и профили ОФ ВЭЖХ и ТСХ гуанозина, обработанного 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином в различных условиях (г). DMTr – 4,4'-диметокситритильная защитная группа, CPG – твердофазный носитель. Система ТСХ: вода/изопропанол 15:85 + 1% насыщенного раствора аммиака. Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-45% ацетонитрила (20 минут, поток 100 мкл/мин) в 0,02M водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм (г) и $\lambda = 250, 260, 270, 280$ и 290 нм (в).

Аналоги РНК, содержащие модификации в 2'-положении рибозного остова, активно используются при создании новых НК-препаратов, в частности в виде siРНК и аптамеров (см, например, [7]). Введение других модификаций в состав таких НК-конструкций

позволило бы дополнительно модулировать их свойства, в связи с чем подобные исследования представляются актуальными.

В качестве модельной системы при оценке возможности введения триазиламидофосфатной модификации в состав 2'-модифицированных олигорибонуклеотидов были выбраны гексауридилаты, содержащие 2'-О-метильные (2'-ОМе) или 2'-О-(2-метокси)этильные (2'-МОЕ) группы. С применением 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина в по стандартному протоколу в 5'-концевой межнуклеотидный фосфат были введены простейшие триазиламидофосфатные группы (5'-U_X*U_XU_XU_XU_XU_X-3', где X обозначает наличие в рибозном цикле 2'-ОМе (олигонуклеотид N-57) или 2'-МОЕ (олигонуклеотид N-58), * – положение модификации). После проведения ОФ ВЭЖХ анализа полученных олигонуклеотидов было обнаружено, что в обоих случаях происходит количественное встраивание триазиламидофосфатной модификации без образования значимого количества побочных продуктов (Рис. 53). Примечательно, что в обоих случаях олигонуклеотиды преимущественно находятся в форме одного из диастереомеров, о чем свидетельствует неравномерное соотношение их пиков на профиле ВЭЖХ. Вероятно, это может быть связано со стерическими факторами, затрудняющими реализацию одного из вариантов взаимного расположения триазинового остова модификации и 2'-ОМе или 2'-МОЕ групп.

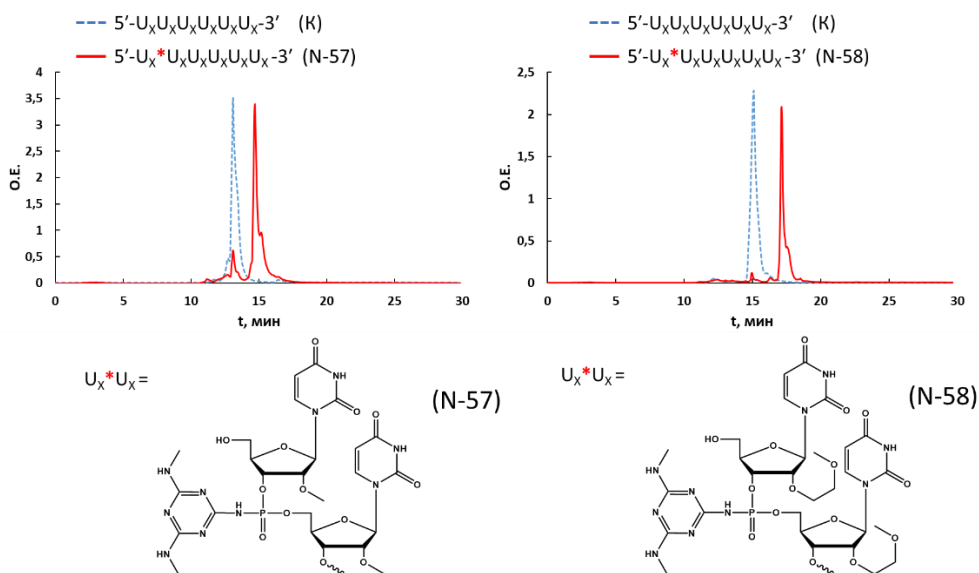


Рис. 53. Профили ОФ ВЭЖХ реакционных смесей олигоуридилатных последовательностей 5'-U^X*U^XU^XU^XU^XU^X-3' после реакции Штаудингера с 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазином (U^X = 2'-ОМе U для N-57; U^X = 2'-МОЕ U для N-58). Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-45% ацетонитрила (30 минут, поток 100 мкл/мин) в 0,02М водном растворе ТЕА*АсОН, λ = 260 нм.

Стоит отдельно отметить, что осуществимость получения РНК, содержащих триазиламидофосфатные группы, не рассматривалась в связи с известными

литературными данными о деградации НК-цепи при введении амидофосфатных модификаций, в частности фосфорилгуанидиновых [169].

По результатам проведенных экспериментов можно заключить, что наиболее реакционноспособный 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазин может быть использован для эффективного получения триазиниламидофосфатных гетероолигонуклеотидов и 2'-модифицированных олигорибонуклеотидов, в то время как 2-азидо-4-алкиламино-6-хлоро-1,3,5-триазины, несущие компактные заместители, могут быть применены для автоматического синтеза триазиниламидофосфатов. Таким образом, разработанный подход обладает высокой степенью универсальности с точки зрения эффективного введения модификаций в олигонуклеотиды различной природы, и может быть использован при создании сложных НК-конструкций для диагностического или терапевтического применения.

4.6. Некоторые фундаментальные свойства класса триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов

В предыдущей части работы была продемонстрирована гибкость разработанного подхода к получению триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов на примерах синтеза большого количества представителей класса, возможности адаптации подхода под автоматизированный синтез, а также его применимости для введения модификаций в состав различных олигонуклеотидных систем. На следующем этапе работы на примере некоторых представителей исследуемого класса НК-производных был изучен ряд базовых свойств триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов для более детальной оценки их прикладного потенциала.

Способность нуклеиновых кислот образовывать комплементарные комплексы (дуплексы) является основополагающим свойством для их применения в качестве специфических диагностических инструментов и терапевтических препаратов. В подавляющем большинстве случаев химические модификации в составе олигонуклеотидов тем или иным образом влияют на термодинамические параметры образования таких комплексов (см., например, [21, 25, 140]), что определяет область их прикладного использования. В данной работе на примере модельных гетеронуклеотидных последовательностей было определено влияние триазиниламидофосфатной модификации в составе олигонуклеотида на эффективность его дуплексообразования, в том числе в зависимости от положения введенных модификаций, их количества, а также заместителей в составе триазинового остова. Дополнительно в качестве одного из базовых свойств

исследуемых НК-производных была изучена химическая стабильность триазиниламидофосфатной группы.

4.6.1. Гибридизационные свойства триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов

Влияние триазинового остова модификации на эффективность образования дуплекса было исследовано на системе 11-звенного гетероолигонуклеотида последовательности 5'-GCGCCAAACAT-3'. В качестве модификаций были выбраны триазиниламидофосфаты, содержащие в триазиновом остове максимально компактные заместители в виде остатков аммиака или метиламина, введенные в состав олигонуклеотидов с применением 2-азидо-4-амино-6-хлоро-1,3,5-триазина и 2-азидо-4-метиламино-6-хлоро-1,3,5-триазина соответственно. Дополнительно на примере триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов вида 5'-[FAM]-CTGACSTATGAAGTATT-3' было оценено влияние структуры заместителей при триазиновом остове на эффективность дуплексообразования. В данном случае в состав триазинового остова модификации входили по два остатка бутиламина или додециламина. Для полученного набора модифицированных олигонуклеотидов, содержащих разное количество модификаций в разных положениях НК-цепи, были определены температуры плавления дуплексов (T_m), а также разница между T_m дуплекса модифицированного олигонуклеотида и T_m немодифицированного комплементарного комплекса (ΔT_m); полученные данные суммированы в Табл. 3.

Табл. 3. Значения температур плавления (T_m) и разницы температур плавления по сравнению с немодифицированным комплексом (ΔT_m) для дуплексов модифицированных олигонуклеотидов состава 5'-GCGCCAAACAT-3' (комплементарная цепь – 5'-ATGTTTGCGC-3') и 5'-[FAM]-CTGACSTATGAAGTAT*Т-3' (комплементарная цепь – 5'-AАТАСТТСАТАGTCAG-3'; [FAM] – остаток 6-карбоксихлорофлуоресцеина) ^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
М-А2	5'-GCGCCA* ¹ ААСА* ¹ Т-3'	63,2	-2,8
М-М2	5'-GCGCCA* ² ААСА* ² Т-3'	63,1	-2,9
М-А3	5'-G* ¹ CGCCA* ¹ ААСАТ-3'	58,1	-7,9
М-М3	5'-G* ² CGCCA* ² ААСАТ-3'	59,0	-7,0

Табл. 3, продолжение

M-A4	5'-G* ¹ CGCCAAACA* ¹ T-3'	63,1	-2,9
M-M4	5'-G* ² CGCCAAACA* ² T-3'	62,8	-3,2
M-A5	5'-G* ¹ C* ¹ GCCAAAC* ¹ A* ¹ T-3'	58,7	-7,3
M-M5	5'-G* ² C* ² GCCAAAC* ² A* ² T-3'	57,2	-8,8
Код	Олигонуклеотид	T _m , °C ^b	ΔT _m , °C ^b
К	5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTATT-3'	50,0	0,0
TB1	5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTAT* ³ T-3'	49,6	-0,4
TD1	5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTAT* ⁴ T-3'	49,2	-0,8

*1 = NC1=NC(=NC(=N1)N)N (with methyl group at C4)
*2 = CN1C=NC(=N1)N (with methyl groups at C4 and C6)
*3 = CCCCN1C=NC(=N1)N (with propyl groups at C4 and C6)
*4 = CCCCCCCCCCCCN1C=NC(=N1)N (with dodecyl groups at C4 and C6)

Как видно из приведенных данных, триазиновый остов модификации в составе олигонуклеотида лишь незначительно понижает температуру плавления дуплекса (например, 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, в частности фосфорилгуанидиновых [170]. Введение нескольких модификаций закономерно еще больше снижает температуру плавления (например, олигонуклеотиды М-А1 и М-А2, Табл. 3). При этом, локальное нуклеотидное окружение и положение модификаций в значительной мере влияет на стабильность комплементарного комплекса. Например, расположение в данной олигонуклеотидной системе модификаций со стороны 5'-конца (G*С) и в середине цепи (А*А) понижает T_m дуплекса больше, чем на 7°С при T_m нативного дуплекса равной 66°С (10%), но в то же время при расположении модификаций в концевых участках (G*С и А*Т) T_m дуплекса снижается всего на 3°С (4,5%) (например, олигонуклеотиды М-А3 и М-А4, Табл. 3). Увеличение объема заместителей в составе триазиламидафосфатной модификации также незначительно дестабилизирует дуплекс. Так, например, наличие

остатков бутиламина или додециламина в триазиновом остове единичной модификации, расположенной со стороны 3'-конца снижает температуру плавления всего на 0,4°C и 0,8°C соответственно при T_m нативного дуплекса равной 50°C (0,8–1,6%) (олигонуклеотиды ТВ1 и TD1, Табл. 3).

4.6.2. Химическая стабильность триазиниламидофосфатной группы

Из литературных данных известно, что различные амидофосфатные производные могут гидролизироваться в кислой среде, и при этом устойчивы в щелочных условиях [127, 128]. Из множества проведенных экспериментов по получению триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов (см., например, раздел 4.4.1) можно сделать вывод, что триазиниламидофосфатная группа закономерно не деградирует в щелочных условиях при деблокировании олигонуклеотида с твердофазного носителя. Таким образом, целесообразным является определение стабильности триазиниламидофосфатной группы в кислой среде.

Стабильность триазиниламидофосфатной группы в кислой среде была определена в отдельном эксперименте на примере олигонуклеотида, содержащего два бутильных остатка при триазиновом остове. Синтезированные декатимидилаты, содержащие триазиниламидофосфатную группу (M-B) или бензиламидофосфатную модификацию (Bz) по ближайшему к 5'-концу межнуклеотидному фосфату (5'-T*TTTTTTTT-3') были обработаны 0.1M соляной кислотой в течение разных промежутков времени (от 30 минут до 13 часов). Для каждой временной точки был проведен анализ ВЭЖХ с оценкой количества оставшегося модифицированного олигонуклеотида, на основании чего был построен график времязависимой деградации (Рис. 54). Бензиламидофосфатная группа в составе соответствующего олигонуклеотида, ожидаемо, начала гидролизироваться уже в первой временной точке (30 минут), а в конечной точке эксперимента (780 минут) в реакционной смеси присутствовало всего около 15% целевого НК-производного. В свою очередь, триазиниламидофосфатная модификация оставалась стабильной на протяжении всего эксперимента.

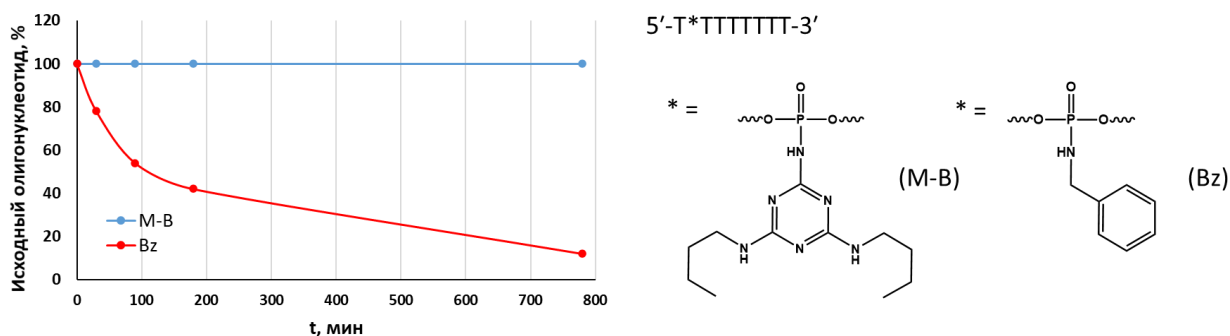


Рис. 54. Устойчивость триазириламинофосфатной и бензиламинофосфатной модификаций в кислой среде. Процентное содержание исходного олигонуклеотида было определено методом ОФ ВЭЖХ.

Кислотная устойчивость связи P-N во многом обусловлена распределением электронной плотности в структуре амидофосфатной группы в составе различных НК-производных. Так, например, алкиламинофосфатные модификации в значительной мере подвержены кислотному гидролизу [127, 128]. Это связано с донорным характером алкильного остатка и, как следствие, накоплением электронной плотности на атоме азота, что способствует электрофильной атаке протона. В то же время, сульфонаминофосфатные и фосфорилгуанидиновые группы устойчивы в кислой среде в связи с более акцепторной природой остатков при атоме азота в составе P-N связи и перераспределением электронной плотности (данные не опубликованы). Стабильность P-N связи в случае триазириламинофосфатной модификации обусловлена, вероятно, сопряжением неподеленной пары азота с ароматической системой триазина. Для более детального определения характера P-N связи и проведения возможной корреляции между донорно-акцепторными свойствами заместителей в составе различных амидофосфатных модификаций и их кислотной устойчивостью, был проведен ^{31}P -ЯМР анализ фосфат-модифицированных динуклеотидов. Химические сдвиги атомов фосфора были определены для дитимидилата, содержащего триазириламинофосфатную или сульфонаминофосфатную модификацию (полученную по реакции Штаудингера), алкиламинофосфатную группу (введенную посредством окислительного аминирования), а также его нативной формы (Рис. 55).

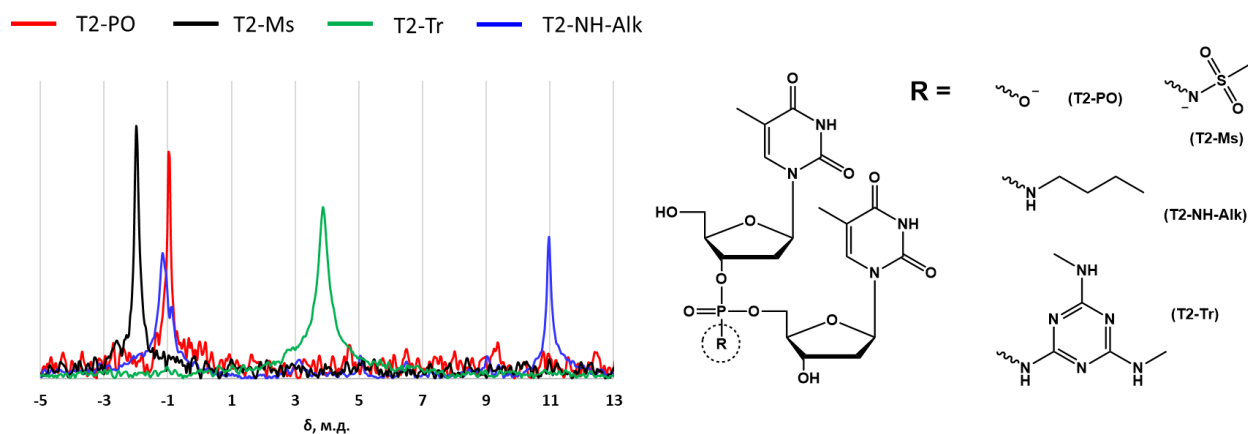


Рис. 55. Фрагменты спектров ^{31}P -ЯМР дитимидилатов, содержащих сульфониамидофосфатную, алкиламидофосфатную, триазиламидофосфатную модификации, и нативного дитимидилата.

Исходя из полученных данных видно, что атом фосфора обладает наибольшим химическим сдвигом в составе алкиламидофосфатной группы (около 11 м.д.), а наименьшим – в составе сульфониамидофосфатной группы (около -2 м.д.). При этом в составе триазиламидофосфатной группы атом фосфора обладает промежуточным химическим сдвигом (около 4 м.д.). Учитывая также вышеописанные донорно-акцепторные свойства различных заместителей в составе амидофосфатных модификаций, можно заключить, что триазиновый остов обладает скорее акцепторными свойствами, что дополнительно обеспечивает кислотную устойчивость соответствующей модификации. Кроме того, наличие определенного химического сдвига атома фосфора при P-N связи, отличного от других амидофосфатных модификаций, также позволяет выделить триазиламидофосфатные олигонуклеотиды в отдельный класс НК-производных.

Стоит также отметить, что в ЯМР анализе были использованы реакционные смеси дитимидилатов без очистки от побочных продуктов. Атом фосфора в составе сульфониамидофосфатного (T2-Ms) и триазиламидофосфатного (T2-Tr) дитимидилата, полученные по реакции Штаудингера, обладают одним химическим сдвигом, в то время как для атома фосфора в составе алкиламидофосфатного производного (T2-NH-Alk), полученного путем окислительного аминирования, на ЯМР спектре наблюдается два сигнала, один из которых относится к нативному дитимидилату. Данный факт указывает на неполное протекание окислительного аминирования в отличие от реакции Штаудингера, что является дополнительным преимуществом последней как подхода к модификации олигонуклеотидов.

Таким образом, в ходе изучения гибридизационных свойств исследуемых НК-производных было обнаружено, что при единичном включении в состав олигонуклеотида

триазириламидофосфатные модификации проявляют незначительный дестабилизирующий эффект при образовании дуплексов. В то же время при множественном введении модификаций стабильность дуплекса может снижаться в большей степени, в том числе в зависимости от нуклеотидного окружения и места расположения модификации. Кроме того, была продемонстрирована значительная химическая стабильность триазириламидофосфатной группы в составе олигонуклеотидов в кислых и щелочных условиях. Такой набор свойств триазириламидофосфатных модификаций указывает на возможность создания модифицированных олигонуклеотидов для их дальнейшего более комплексного изучения, в том числе для проведения биологических исследований *in vivo*. Стоит отдельно отметить, что изученные свойства являются фундаментальными, то есть присущими всему классу триазириламидофосфатных олигонуклеотидов, в силу их независимости от типа введенных заместителей в состав триазинового остова модификации.

4.7. Додецил-содержащие триазириламидофосфатные олигонуклеотиды

Среди всех полученных представителей класса триазириламидофосфатных олигонуклеотидов наиболее широко были изучены додещил-содержащие производные, что обусловлено несколькими факторами. Ранее было показано, что введение гидрофобных додещильных остатков в состав олигонуклеотида обеспечивает его эффективную доставку в клетки, что позволяет детально исследовать биологические свойства подобных НК-конструкций [126]. Кроме того, додещильные группы могут быть введены в триазиновый остов модификации с практически количественными выходами, что было показано на примере модифицированного олиготимидилата (разд. 4.4.1.1., Табл. 1, олигонуклеотид N-17). Высокая эффективность получения соответствующих НК-производных в совокупности с продемонстрированной возможностью введения модификаций в состав гетероолигонуклеотидов позволяет создавать додещил-содержащие триазириламидофосфатные олигонуклеотиды различного состава. В данной работе был получен набор подобных производных и дополнительно изучен ряд их свойств, позволяющих оценить перспективы их дальнейшего биологического исследования.

Первоначально была получена пара додещил-содержащих триазириламидофосфатных олигонуклеотидов модельных последовательностей с остатком флуоресцеина на 5'-конце, не содержащих других модификаций (Табл. 5, олигонуклеотиды TD1 и TD2). Модификации были введены в район 3'-конца последовательностей между двумя тимидилатными звеньями по стандартной схеме с использованием 2-азидо-4,6-хлоро-1,3,5-триазина в

качестве реагента-модификатора (см. раздел 4.4.1.1). По результатам ВЭЖХ анализа реакционных смесей (Рис. 56) видно, что модификация встраивается в состав олигонуклеотидов с достаточно высокой эффективностью (около 70%).

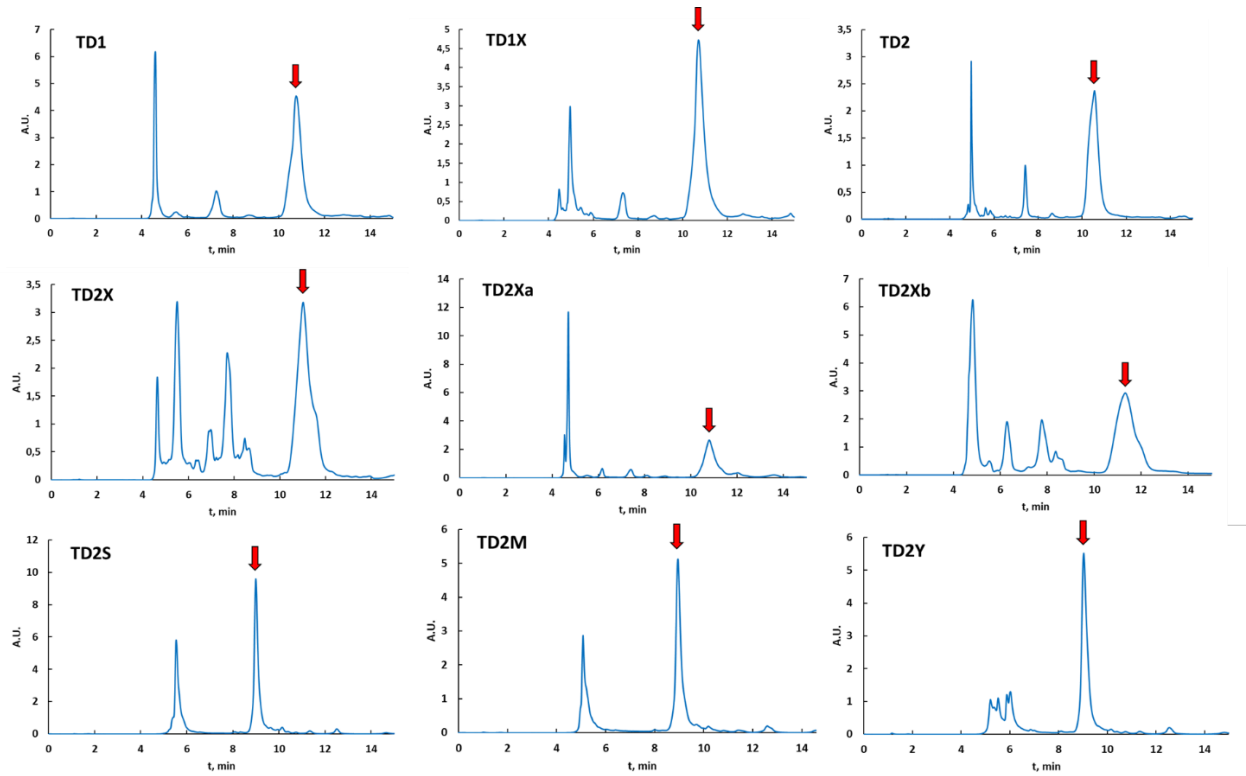


Рис. 56. Профили ОФ ВЭЖХ реакционных смесей различных додецил-содержащих триазириламидофосфатных гетероолигонуклеотидов. Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-90% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм.

Стоит отдельно отметить, что в данной работе структуры всех модифицированных олигонуклеотидов и степени конверсии были определены комплексом методов: ОФ-ВЭЖХ, электрофорез в ПААГ и ESI-MS масс-спектрометрия. Применимость такого подхода была продемонстрирована на производном TD2: идентификация пика целевого продукта по данным ОФ-ВЭЖХ (Рис. 57, а) с учетом свойств триазинового остова; выделение и подтверждение чистоты и массы продукта ОФ-ВЭЖХ, электрофорезом и масс-спектрометрией (Рис. 57б, 57в, 57г). Комплекс анализов позволил оценить эффективность модификации, а также подтвердить массу и наличие целевого продукта в реакционной смеси для всех синтезированных олигонуклеотидов.

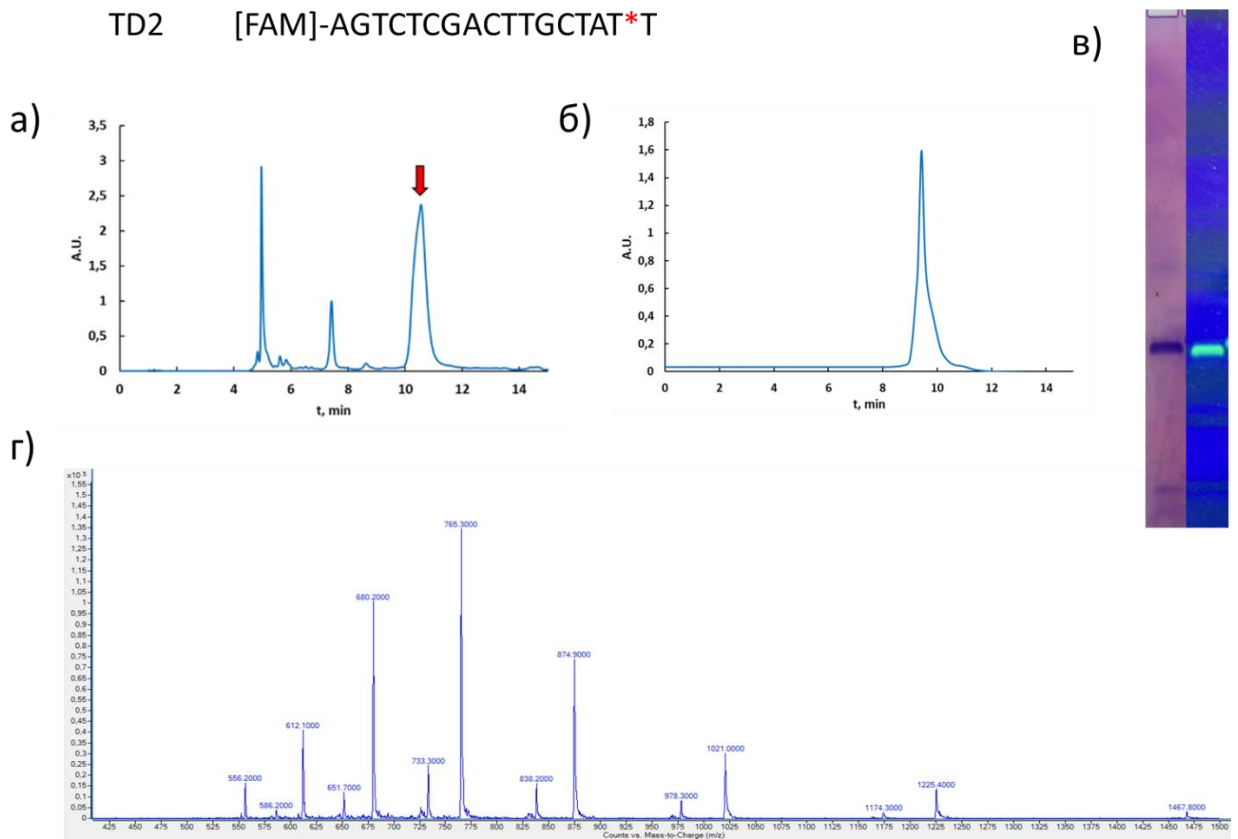


Рис. 57. Профили ОФ ВЭЖХ для реакционной смеси (а) и выделенного (б) олигонуклеотида TD2; фрагмент электрофоретического профиля выделенного олигонуклеотида TD2 при облучении УФ-светом ($\lambda = 254$ нм) (справа) и после окраски красителем StainsAll™ (слева) (в); ESI-MS масс-спектр в варианте отрицательных ионов выделенного олигонуклеотида TD2 (г). [FAM] – остаток 6-карбоксифлуоресцеина, * – триазиламидофосфатная группа с двумя додецильными остатками. Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-90% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе TEA*AcOH, $\lambda = 260$ нм.

Также была рассмотрена возможность получения додецил-содержащих триазиламидофосфатных гетероолигонуклеотидов, несущих дополнительные модификации межнуклеотидного фосфата. Подобные НК-конструкции, несущие комбинации различных модификаций, в том числе и фосфатных, на данный момент широко исследуются в качестве перспективных терапевтических препаратов и диагностических инструментов (см, например, [11, 12]). В связи с этим, получение таких олигонуклеотидов, несущих в том числе и триазиламидофосфатную модификацию, представляет особый интерес.

В качестве одной из дополнительных фосфатных модификаций была выбрана фосфорилгуанидиновая диметилимидазолидиниевая (ФГ) группа. При введении двух ФГ-модификаций в район 5'-конца, эффективность получения соответствующих олигонуклеотидов практически не меняется или незначительно снижается, что может быть связано с нуклеотидным окружением ФГ-групп (олигонуклеотиды TD1X, TD2X, Табл. 4,

Рис. 56). В то же время введение ФГ-групп в другие положения цепи, в частности в середину и в район 3'-конца рядом с триазиламидофосфатной модификацией, более существенно снижает выходы целевых продуктов (олигонуклеотиды TD2Xa, TD2Xb, Табл. 4, Рис. 56). В качестве других дополнительных фосфатных модификаций были выбраны пирролидин-содержащая фосфорилгуанидиновая, метансульфоамидофосфатная (мезильная) и тиофосфатная группы (Табл. 4, олигонуклеотиды TD2Y, TD2M, TD2S соответственно). Олигонуклеотиды, содержащие приведенные модификации в районе 5'-конца, также были получены с высокими выходами, по аналогии с производным, несущим ФГ-группу (Рис. 56). Все синтезированные олигонуклеотиды были очищены методом ОФ ВЭЖХ и проанализированы методом ESI-MS масс-спектрометрии (Табл. 4), на основании чего была подтверждена их предполагаемая масса.

Табл. 4. Список полученных додецил-содержащих триазиламидофосфатных олигонуклеотидов, несущих различные фосфатные модификации (обозначены как X, Y, M, S). [FAM] – остаток флуоресцеина.

Код	Последовательность (5'→3')	М (теор.)	М (эксп.)
TD1	[FAM]-CTGACTATGAAGTAT*T	5877.5	5876.5
TD1X	[FAM] ^X C ^X TGACTATGAAGTAT*T	6067.8	6067.6
TD1X2	[FAM] ^X C ^X T ^X G ^X ACTATGAAGTAT*T	6254.8	6253.8
TD1X3	[FAM] ^X C ^X T ^X G ^X A ^X C ^X TATGAAGTAT*T	6444.9	6446.0
TD1X4	[FAM] ^X C ^X T ^X G ^X A ^X C ^X T ^X A ^X TGAAGTAT*T	6635.1	6637.0
TD1X5	[FAM] ^X C ^X T ^X G ^X A ^X C ^X T ^X A ^X T ^X G ^X AAGTAT*T	6825.3	6827.0
TD2	[FAM]-AGTCTCGACTTGCTAT*T	6130.4	6132.0
TD2X	[FAM] ^X A ^X GTCTCGACTTGCTAT*T	6320.6	6321.6
TD2Xa	[FAM]-AGTCTCG ^X A ^X CTTGCTAT*T	6320.6	6322.0
TD2Xb	[FAM]-AGTCTCGACTTGCT ^X A ^X T*T	6320.6	6322.0
TD2Y	[FAM] ^Y A ^Y GTCTCGACTTGCTAT*T	6428.7	6430.0
TD2M	[FAM] ^M A ^M GTCTCGACTTGCTAT*T	6284.4	6286.0
TD2S	[FAM] ^S A ^S GTCTCGACTTGCTAT*T	6162.4	6163.5

* =

X =

Y =

M =

S =

На основе олигонуклеотида TD1X дополнительно были синтезированы производные, несущие большее количество ФГ-групп. Так, в состав олигонуклеотидов TD1X2, TD1X3, TD1X4 и TD1X5 со стороны 5'-конца последовательности были введены подряд 4, 6, 8 и 10 ФГ-модификаций соответственно (Табл. 4). По аналогии с TD1X, данные олигонуклеотиды были получены с высокой эффективностью, при этом количество ФГ-групп практически не влияло на выходы целевых продуктов (данные не приведены). Стоит отметить, что при увеличении числа ФГ-модификаций гидрофобность олигонуклеотидов TD1X–TD1X5 последовательно повышалась; подобный эффект ФГ-групп описан в литературе [119]. Однако, в случае исследуемых олигонуклеотидов данный эффект проявляется незначительно, что связано с исходной повышенной гидрофобностью додецил-содержащей триазилиламидофосфатной группы (Рис. 58).

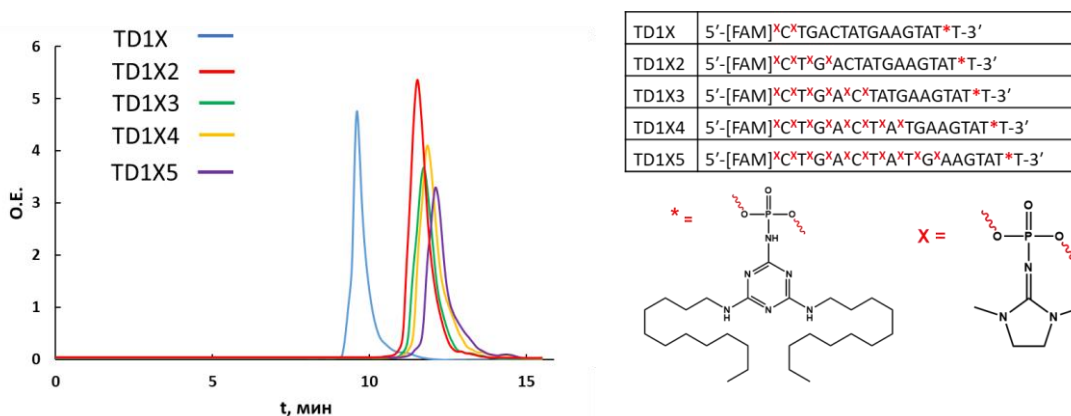


Рис. 58. Профили ОФ ВЭЖХ очищенных олигонуклеотидов TD1X–TD1X5, несущих триазилиламидофосфатную группу с двумя остатками додецила, и разное количество ФГ-модификаций.

Градиент ОФ ВЭЖХ: 0-90% ацетонитрила (15 минут, поток 200 мкл/мин) в 0,02М водном растворе ТЕА*АсОН, $\lambda = 260$ нм.

Таким образом, была показана применимость разработанного подхода для синтеза додецил-содержащих триазилиламидофосфатных олигонуклеотидов, содержащих дополнительные компактные модификации межнуклеотидного фосфата различной природы (TD2X, TD2Y, TD2M, TD2S) и в различном количестве (TD1X–TD1X5).

На примере некоторых олигонуклеотидов из полученного набора далее были исследованы характерные свойства додецил-содержащих триазилиламидофосфатных НК-производных.

4.7.1. Мицеллообразование в растворе додецил-содержащих триазириламидофосфатных олигонуклеотидов

Одним из полезных свойств олигонуклеотидов, несущих гидрофобные группы, является возможность самосборки в мицеллоподобные структуры за счет амфифильной природы [172–174]. Комплексы гидрофобных олигонуклеотидов в виде мицелл эффективно проникают в клетку по механизму эндоцитоза, что обуславливает высокую степень их внутриклеточного накопления. В данной работе возможность образования мицеллоподобных структур для додецил-содержащих триазириламидофосфатных олигонуклеотидов была показана на примере производных TD2, TD2X, TD2Xa, TD2Xb, TD2Y, TD2M, TD2S (Табл. 4). Способность формирования мицелл в растворе олигонуклеотидов (5 мкМ раствор в среде DMEM) была определена с применением метода динамического светорассеяния (ДСР). Полученные данные ДСР-анализа после 10 измерений 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. 59.

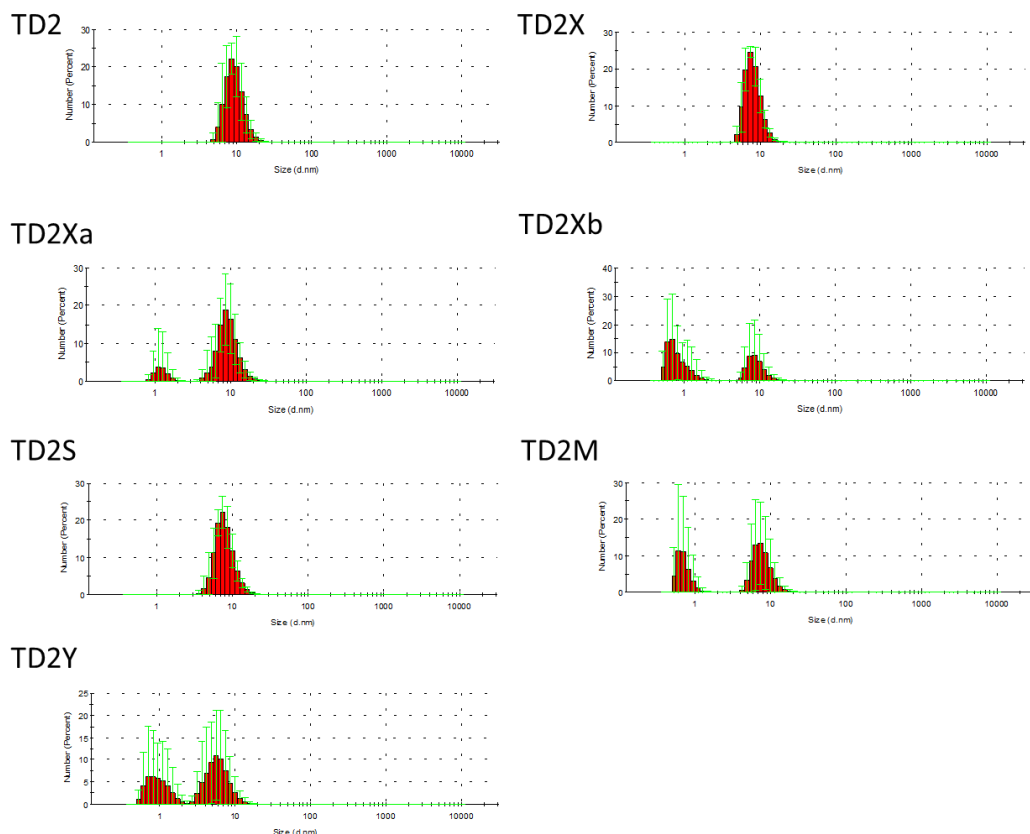


Рис. 59. Графики зависимости распределения значений размера частиц от числа измерений для додецил-содержащих триазириламидофосфатных производных в виде 5 мкМ растворов в DMEM-среде после 10 измерений в течение 4 часов. Ось X – размер частиц, нм; ось Y – число измерений, проценты. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

Из полученных данных видно, что триазириламидофосфатный олигонуклеотид TD2, как и его ФГ-содержащий аналог TD2X, образуют стабильные частицы со средним гидродинамическим диаметром около 10 нм, что в целом согласуется с литературными данными по схожим олигонуклеотидным системам [174]. В то же время, при постепенном перемещении ФГ-групп в сторону 3'-конца, в растворе олигонуклеотидов детектируется большое количество неупорядоченных структур (производные TD2Xa и TD2Xb, Рис. 59). Среди производных, несущих другие фосфатные модификации, наиболее упорядоченные комплексы образует триазириламидофосфатный олигонуклеотид, содержащий тиофосфатные группы (TD2S), в то время как мезильный и пирролидин-содержащий фосфорилгуанидиновый аналоги (TD2M и TD2Y соответственно) образуют как мицеллы, так и неупорядоченные структуры. Примечательно, что даже при незначительном изменении структуры фосфатной модификации способность к агрегации меняется существенно – так олигонуклеотид TD2Y образует значительно меньше мицеллоподобных структур по сравнению с его более компактным аналогом TD2X. Исходя из полученных данных затруднительно провести какую-либо корреляцию между структурой фосфатных модификаций в составе исследуемых производных и эффективностью мицеллообразования.

4.7.2. Проникновение додецил-содержащих триазириламидофосфатных олигонуклеотидов в клетки, их цитотоксичность и ферментативная устойчивость

Одной из важнейших задач в области разработки терапевтических олигонуклеотидов является повышение эффективности их проникновения в клетки. Для решения этой задачи зачастую используют различные системы доставки НК в клетки, такие как, например, катионные липосомы и комплементарные гидрофобные олигонуклеотиды [126, 160, 161]. Реже гидрофобные или иные заместители, обеспечивающие проникновение в клетку (например, остатки (N-ацетил)галактозамина), вводят в состав самого доставляемого олигонуклеотида [4, 8, 149]. Несмотря на наличие большого числа способов доставки НК в клетки, разработка новых путей повышения эффективности проникновения олигонуклеотидов остается релевантной задачей.

В данной работе первоначальная эффективность внутриклеточного накопления додецил-содержащих триазириламидофосфатных НК-производных была продемонстрирована на примере олигонуклеотида TD1 (Табл. 4) [175]. 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 (Приложение 2). В данном случае для 100% клеток детектируется флуоресцентный сигнал, а интенсивность флуоресценции практически на два порядка превышает таковую для контрольного немодифицированного олигонуклеотида К. 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 (ТВ1), также показало значительное преимущество додецил-содержащего производного, что указывает на основной вклад додецильных остатков в эффективность проникновения (Приложение 2).

На следующем этапе был проведен более комплексный анализ эффективности проникновения додецил-содержащих триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов в зависимости от наличия, количества и положения в их структуре дополнительных фосфатных модификаций [171]. На примере двух пар олигонуклеотидов, а именно TD1/TD1X и TD2/TD2X (Табл. 4), было обнаружено, что введение двух ФГ-групп в район 5'-конца повышает эффективность проникновения додецил-содержащих НК-производных (Приложение 3, Рис. П3а, П3б). Эффект повышения степени внутриклеточного накопления олигонуклеотидов при точечном введении в их состав ФГ-групп известен и описан в литературе на примере модификации тиофосфатных олигонуклеотидов [12]. В то же время, последовательное увеличение числа ФГ-групп (Табл. 4, олигонуклеотиды TD1X, TD1X2, TD1X3, TD1X4, TD1X5) или их смещение в сторону 3'-конца ближе к триазиниламидофосфатной модификации (Табл. 4, олигонуклеотиды TD2X, TD2Xа и TD2Xб) понижает эффективность проникновения в клетки (Приложение 3, Рис. П3а, П3б). Подобный эффект влияния количества и положения ФГ групп на степень проникновения олигонуклеотидов также согласуется с ранее опубликованными данными по антисмысловым НК-конструкциям [138]. При этом, для самопроникающих додецил-содержащих триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов такой эффект проявляется более контрастно. Введение других фосфатных модификаций, а именно пирролидин-содержащих фосфорилгуанидиновых, тиофосфатных или мезильных (Табл. 4, олигонуклеотиды TD2Y, TD2S, TD2M) в район 5'-конца олигонуклеотидов также во всех случаях увеличивает эффективность их проникновения (Приложение 3, Рис. П3в). При этом изменение данного параметра в зависимости от структур фосфатных модификаций неочевидна. Так, олигонуклеотид TD2Y, содержащий более объемную и гидрофобную ФГ-модификацию, проникает хуже производного TD2X с менее объемной ФГ-группой. С

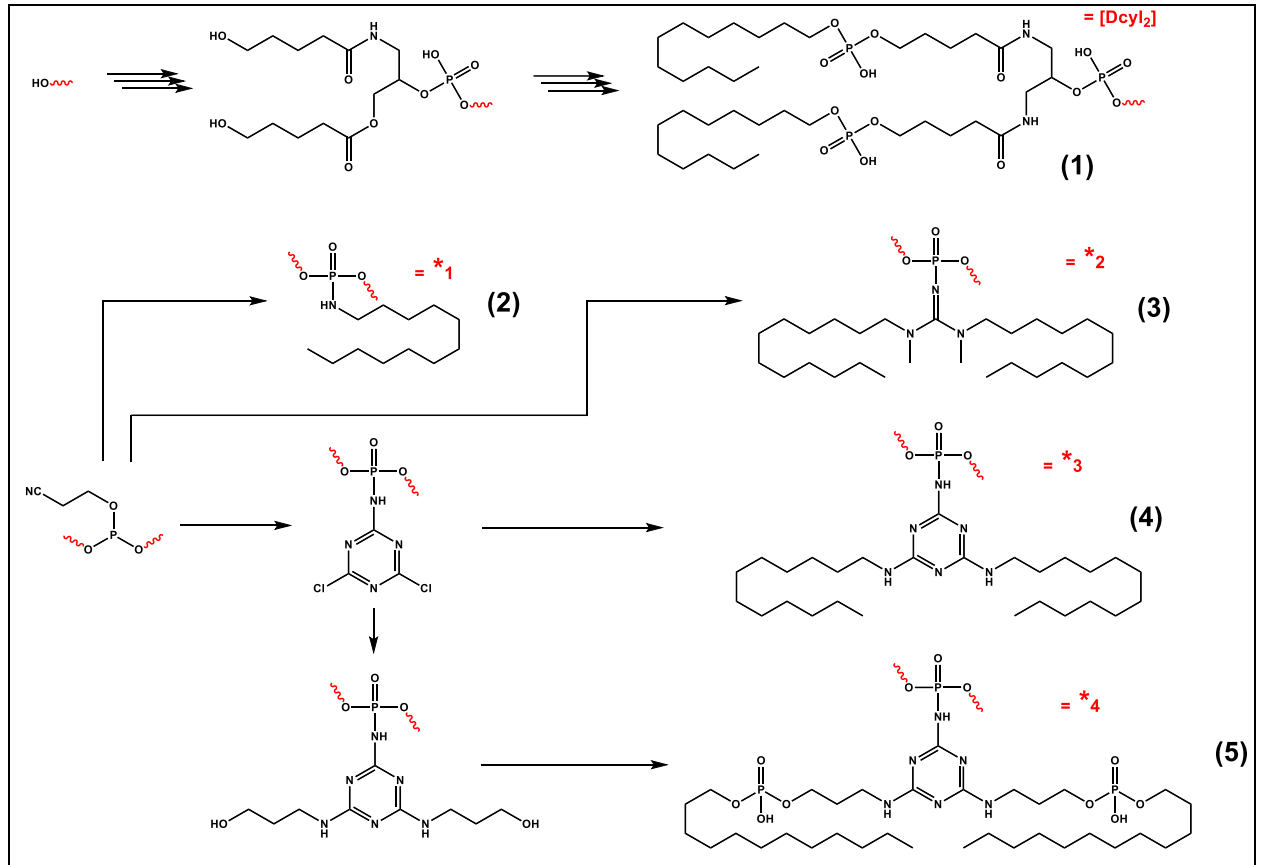
наибольшей эффективностью из приведенного ряда накапливается мезильное производное TD2M, несмотря на наименьшую гидрофобность данной группы.

В работе также был выявлен значимый вклад взаимного пространственного расположения додецильных остатков в структуре триазириламидофосфатной модификации в степень внутриклеточного накопления соответствующих олигонуклеотидов [176]. Данный эффект был продемонстрирован на примере сравнения эффективности проникновения производного TD1 с другими модифицированными олигонуклеотидами, несущими по два додецильных остатка на различных остовах. Полный перечень синтезированных додецил-содержащих олигонуклеотидов представлен в Табл. 5 (олигонуклеотид TD1 представлен структурой 4). Для получения представленных производных были использованы методики, ранее разработанные в лаборатории; упрощенные схемы введения модификаций также представлены в Табл. 5. Так, например, додецильные остатки в составе олигонуклеотида OD1 были введены путем последовательного применения двух амидофосфитных структур в рамках двух циклов твердофазного синтеза – коммерчески доступного разветвляющего агента (doubler phosphoramidite) и разработанного модификатора в виде (N,N-диизопропиламино)-2-цианэтил-додециламидофосфита [176] (Табл. 5, структура 1). Для введения модификаций в состав олигонуклеотидов ND1 и GD1 были использованы окислительные агенты в виде додециламина в смеси иода и пиридина, и додецил-содержащего диаминокарбонийазида соответственно [115, 119] (Табл. 5, структуры 2, 3). При получении производного TOD1 была применена комбинация подходов, основанная на первоначальном введении остатков 3-аминопропанола-1 в состав триазинового остова по разработанному подходу, и дальнейшем введении додецильных групп с применением разработанного 5'-концевого модификатора (Табл. 5, структура 5) [176].

Табл. 6. Список модифицированных олигонуклеотидов, несущих по два додецильных остатка на различных остовах (обозначены как [Dcy]₂, *¹, *², *³, *⁴; структуры расшифрованы в таблице), и упрощенные схемы введения модификаций. [FAM] – остаток флуоресцеина.

Код	Последовательность (5'→3')	M (теор.)	M (эксп.)
OD1	[Dcy] ₂ -CTGACSTATGAAGTATT-[FAM]	6394.7	6392.4
ND1	[FAM]-TTTCTGACSTATGTA* ¹ T* ¹ T	5724.3	5731.8
GD1	[FAM]-CTGACSTATGAAGTAT* ² T	5838.4	5837.4
TD1	[FAM]-CTGACSTATGAAGTAT* ³ T	5877.4	5877.4
TOD1	[FAM]-TTTTTTT* ⁴ T	3629.9	3628.8

Табл. 5, продолжение



По результатам цитофлуориметрического анализа клеток, трансфицированных модифицированными олигонуклеотидами, было обнаружено, что именно триазиламидофосфатный олигонуклеотид, несущий два додецильных остатка, напрямую присоединенных к триазиновому остову (Табл. 5, олигонуклеотид TD1), проникает в клетки с наибольшей эффективностью (Приложение 4). Вероятно, такое взаимное расположение остатков додецила и триазинового остова, а также природа этих групп в значительной мере влияют на степень внутриклеточного накопления. Несколько подобных примеров зависимости эффективности проникновения НК-производных от структуры их гидрофобной части описаны в литературе [126, 177].

На примере производного TD1 дополнительно была продемонстрирована ферментативная устойчивость и низкая цитотоксичность додецил-содержащих триазиламидофосфатов. Так, при обработке самого олигонуклеотида TD1, или его дуплекса (TD1/Comp) нуклеазами цельноклеточных экстрактов клеточных линий НЕК293Т и Т98G в течение 15 минут образуется лишь небольшое количество продуктов деградации, в то время как нативный олигонуклеотид К или его дуплекс (К/Comp) в тех же условиях практически полностью гидролизуются (Приложение 5). При анализе цитотоксичности

олигонуклеотида TD1 и его дуплекса TD1/Comp в реальном времени было обнаружено, что концентрации полувывживаемости клеток IC₅₀ в несколько раз превышает рабочие концентрации олигонуклеотидов при проведении биологических экспериментов (1–5 мкМ) (Приложение 6). Стоит при этом отметить, что дуплекс TD1/Comp более стабилен при обработке нуклеазами, но в то же время более токсичен, что связано, вероятно, с повышенной эффективностью его связывания с белками репарации [175].

По совокупности полученных результатов можно заключить, что додецил-содержащие триазириламидофосфатные олигонуклеотиды обладают рядом полезных свойств, позволяющих проводить их дальнейшие биологические исследования. Одной из самых важных подобных особенностей является высокая эффективность внутриклеточного накопления указанных производных. Данное свойство может быть обусловлено как возможностью образования мицелл триазириламидофосфатными олигонуклеотидами с гидрофобными группами, так и выгодным взаимным расположением триазинового остова и додецильных остатков. Также была показана возможность еще большего повышения степени проникновения таких олигонуклеотидов путем введения в их состав дополнительных модификаций межнуклеотидного фосфата.

4.8. Заключение

В ходе выполнения данной работы был значительно развит предложенный ранее подход к получению нового класса триазириламидофосфатных НК-производных, основанный на взаимодействии фосфит-триэфирного звена олигонуклеотида с различными 2-азидо-1,3,5-триазинами по реакции Штаудингера. При разработке различных способов в рамках единого подхода была показана строгая зависимость эффективности протекания реакции Штаудингера от донорно-акцепторных свойств заместителей в составе триазинового остова реагентов-модификаторов. Так, например, при использовании 2-азидо-4,6-диалкиламино-1,3,5-триазинов реакция Штаудингера протекает с эффективностью, не превышающей 15%, в то время как применение самого реакционноспособного из таких модификаторов – 2-азидо-4,6-дихлоро-1,3,5-триазина – обеспечивает практически количественное встраивание триазинового остова в состав олигонуклеотида в тех же условиях. При исследовании реакционной способности азидо-триазинов также были определены некоторые ключевые факторы, влияющие на эффективность получения триазириламидофосфатных групп. В частности, было показано, что включение в синтетическую схему отдельного этапа β-элиминирования 2-цианозтильной группы значительно повышает выходы целевых продуктов за счет перевода триазирилфосфазенового интермедиата реакции в более стабильную амидофосфатную

форму. Кроме того, было установлено, что присутствие воды в используемых растворах может приводить к деградации как фосфазенового, так и амидофосфатного звена. Определение данных факторов позволило в значительной степени оптимизировать процесс получения исследуемых НК-производных.

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

В ходе исследования физико-химических свойств некоторых представителей класса триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов была продемонстрирована их высокая химическая и ферментативная устойчивость. Модификация остается стабильной при обработке олигонуклеотида сильнокислым или сильнощелочным раствором, а также практически не расщепляется при инкубации олигонуклеотида с нуклеазами цельноклеточных экстрактов. Такие свойства триазиниламидофосфатной группы можно

использовать, например, при разработке антисмысловых препаратов гапмерного типа для стабилизации концевых участков. На примере некоторых триазиниламидофосфатных модификаций показана лишь незначительная дестабилизация соответствующих дуплексов олигонуклеотидов, в том числе и множественно модифицированных. Степень дестабилизации, однако, зависит от нуклеотидного контекста и расположения модификации в цепи, что следует учитывать при дизайне триазиниламидофосфатных НК-конструкций для конкретных приложений.

В качестве одного из самых важных результатов работы можно привести доказанную высокую эффективность проникновения триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов на примере додецил-содержащего производного. Было показано, что такой модифицированный олигонуклеотид накапливается в клетках с эффективностью, сопоставимой с доставкой нативного олигонуклеотида коммерчески доступным реагентом Lipofectamine2000. Кроме того, было обнаружено, что додецил-содержащий триазиниламидофосфатный олигонуклеотид проникает в клетки лучше остальных гидрофобных НК-производных, несущих додецильные остатки на разных остовах. Данный факт можно объяснить влиянием взаимного расположения додецильных остатков в составе олигонуклеотида на эффективность проникновения, которое в случае триазиниламидофосфатного производного наиболее предпочтительно. Также было определено влияние дополнительных фосфатных модификаций в составе додецил-содержащих триазиниламидофосфатных олигонуклеотидов на эффективность их проникновения. В частности, было обнаружено, что введение дополнительных фосфорилгуанидиновых, тиофосфатных или сульфониламидофосфатных групп в район 5'-конца олигонуклеотида, содержащего триазиниламидофосфатную модификацию при 3'-конце, способно кратно повысить эффективность проникновения. Для подобных олигонуклеотидов дополнительно была продемонстрирована способность образовывать мицеллоподобные структуры, что может быть одной из причин высокой степени внутриклеточного накопления. В целом можно заключить, что додецил-содержащие триазиниламидофосфатные олигонуклеотиды являются удобным и перспективным инструментом доставки НК в клетки.

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

5. ВЫВОДЫ

1. 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 триазирил-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 вводить остатки диаминов или аминокспиртов, 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.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khvorova, A., Watts, J. K. The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility // *Nat. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 35. – N. 3. – P. 238–248.
2. Belgrad, J., Fakih, H. H., Khvorova, A. Nucleic Acid Therapeutics: Successes, Milestones, and Upcoming Innovation // *Nucleic Acid Ther.* – 2024. – Vol. 34. – N. 2. – P. 52–72.
3. Gao, J., Nutan, B., Gargouri, D., Pisal, N. D., Do, V., Zubair, M., Alanzi, H., Wang, H., Lee, D., Joshi, N., Ullah, A. Unlocking the Potential of Chemically Modified Nucleic Acid Therapeutics // *Adv. Ther.* – 2024. – Vol. 7. – N. 11. – P. 1–29.
4. Vinjamuri, B. P., Pan, J., Peng, P. A review on commercial oligonucleotide drug products // *J. Pharm. Sci.* – 2024. – Vol. 113. – N. 7. – P. 1749–1768.
5. Rinaldi, C., Wood, M. J. A. Antisense oligonucleotides : the next frontier for treatment of neurological disorders // *Nat. Rev. Neurol.* – 2017. – Vol. 14. – N. 1. – P. 9–21.
6. Egli, M., Manoharan, M. Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – Vol. 51. – N. 6. – P. 2529–2573.
7. Cronin, J. M., Yu, A. Small RNA or oligonucleotide drugs and challenges in evaluating drug-drug interactions // *Front. Pharmacol.* – 2025. – Vol. 16:1720361. – P. 1–20.
8. Østergaard, M. E., Jackson, M., Low, A., E Chappell, A., G Lee, R., Peralta, R. Q., Yu, J., Kinberger, G. A., Dan, A., Carty, R., Tanowitz, M., Anderson, P., Kim, T. W., Fradkin, L., Mullick, A. E., Murray, S., Rigo, F., Prakash, T. P., Bennett, C. F., Swayze, E. E., Gaus, H. J., Seth, P. P. Conjugation of hydrophobic moieties enhances potency of antisense oligonucleotides in the muscle of rodents and non-human primates // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – Vol. 47. – N. 12. – P. 6045–6058.
9. Crooke, S. T., Vickers, T. A., Liang, X. H. Phosphorothioate modified oligonucleotide-protein interactions // *Nucleic Acids Res.* – 2021. – Vol. 48. – N. 10. – P. 5235–5253.
10. Schultz, R. G., Gryaznov, S. M. Oligo-2'-fluoro-2'-deoxynucleotide N3'→P5' phosphoramidates: Synthesis and properties // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – Vol. 24. – N. 15. – P. 2966–2973.
11. Kandasamy, P., Liu, Y., Aduda, V., Akare, S., Alam, R., Andreucci, A., Boulay, D., Bowman, K., Byrne, M., Cannon, M., Chivatakarn, O., Shelke, J. D., Iwamoto, N., Kawamoto, T., Kumarasamy, J., Lamore, S., Lemaitre, M., Lin, X., Longo, K., Looby, R., Marappan, S., Metterville, J., Mohapatra, S., Newman, B., Paik, I. H., Patil, S., Purcell-Estabrook, E., Shimizu, M., Shum, P., Standley, S., Taborn, K., Tripathi, S., Yang, H., Yin, Y., Zhao, X., Dale, E., Vargeese, C. Impact of guanidine-containing backbone linkages on stereopure antisense oligonucleotides in the CNS // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – Vol. 50. – N. 10. – P. 5401–5423.
12. Kandasamy, P., McClorey, G., Shimizu, M., Kothari, N., Alam, R., Iwamoto, N.,

Kumarasamy, J., Bommineni, G. R., Bezigian, A., Chivatakarn, O., Butler, D. C. D., Byrne, M., Chwalenia, K., Davies, K. E., Desai, J., Shelke, J. D., Durbin, A. F., Ellerington, R., Edwards, B., Godfrey, J., Hoss, A., Liu, F., Longo, K., Lu, G., Marappan, S., Oieni, J., Paik, I. H., Estabrook, E. P., Shivalila, C., Tischbein, M., Kawamoto, T., Rinaldi, C., Rajão-Saraiva, J., Tripathi, S., Yang, H., Yin, Y., Zhao, X., Zhou, C., Zhang, J., Apponi, L., Wood, M. J. A., Vargeese, C. Control of backbone chemistry and chirality boost oligonucleotide splice switching activity // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – Vol. 50. – N. 10. – P. 5443–5466.

13. Williams, D. M., Benseler, F., Eckstein, F. Properties of 2'-Fluorothymidine-Containing Oligonucleotides: Interaction with Restriction Endonuclease EcoRV // *Biochemistry.* – 1991. – Vol. 30. – N. 16. – P. 4001–4009.

14. Inoue, H., Hayase, Y., Imura, A., Iwai, S., Miura, K., Ohtsuka, E. Synthesis and hybridization studies on two complementary nona(2'-O-methyl)ribonucleotides // *Nucleic Acids Res.* – 1987. – Vol. 15. – N. 15. – P. 6131–6148.

15. Pierre, M. Ein neuer Zugang zu 2'-O-(2-Methoxyethyl)ribonucleosiden ausgehend von D-Glucose // *Helv. Chim. Acta.* – 2003. – Vol. 86. – N. 1. – P. 204–209.

16. Ross, B. S., Song, Q., Han, M. Kilo-scale synthesis process for 2'-O-(2-methoxyethyl)-pyrimidine derivatives // *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* – 2005. – Vol. 24. – N. 5–7. – P. 815–818.

17. Manoharan, M. 2'-Carbohydrate modifications in antisense oligonucleotide therapy: Importance of conformation, configuration and conjugation // *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* – 1999. – Vol. 1489. – N. 1. – P. 117–130.

18. Schröder, A. S., Kotljarova, O., Parsa, E., Iwan, K., Raddaoui, N., Carell, T. Synthesis of (R)-Configured 2'-Fluorinated mC, hmC, fC, and caC Phosphoramidites and Oligonucleotides // *Org. Lett.* – 2016. – Vol. 18. – N. 17. – P. 4368–4371.

19. Prakash, T. P. An overview of sugar-modified oligonucleotides for antisense therapeutics // *Chem. Biodivers.* – 2011. – Vol. 8. – N. 9. – P. 1616–1641.

20. Hara, R. I., Kageyama, M., Arai, K., Uchiyama, N., Wada, T. Synthesis of 2'-O-monohaloethoxymethyl-modified RNAs and their duplex formation ability // *RSC Adv.* – 2017. – Vol. 7. – N. 65. – P. 41297–41303.

21. Pasternak, A., Wengel, J. Unlocked nucleic acid - An RNA modification with broad potential // *Org. Biomol. Chem.* – 2011. – Vol. 9. – N. 10. – P. 3591–3597.

22. Jensen, T. B., Henriksen, J. R., Rasmussen, B. E., Rasmussen, L. M., Andresen, T. L., Wengel, J., Pasternak, A. Thermodynamic and biological evaluation of a thrombin binding aptamer modified with several unlocked nucleic acid (UNA) monomers and a 2'-C-piperazino-UNA monomer // *Bioorganic Med. Chem.* – 2011. – Vol. 19. – N. 16. – P. 4739–4745.

23. Karlsen, K. K., Jensen, T. B., Wengel, J. Synthesis of an unlocked nucleic acid terpyridine monomer and binding of divalent metal ion in nucleic acid duplexes // *J. Org. Chem.* – 2009. – Vol. 74. – N. 22. – P. 8838–8841.
24. Karlsen, K. K., Pasternak, A., Jensen, T. B., Wengel, J. Pyrene-Modified Unlocked Nucleic Acids: Synthesis, Thermodynamic Studies, and Fluorescent Properties // *ChemBioChem.* – 2012. – Vol. 13. – N. 4. – P. 590–601.
25. Singh, S. K., Nielsen, P., Koshkin, A. a., Wengel, J. LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition // *Chem. Commun.* – 1998. – Vol. 4. – P. 455–456.
26. Youssefyeh, R. D., Verheyden, J. P. H., Moffatt, J. G. 4'-Substituted Nucleo'sides. 4. Synthesis of Some 4'-Hydroxymethyl Nucleosides // *J. Org. Chem.* – 1979. – Vol. 44. – N. 8. – P. 1201–1309.
27. Rahman, S. M. A., Seki, S., Obika, S., Yoshikawa, H., Miyashita, K., Imanishi, T. Design, synthesis, and properties of 2',4'-BNANC: A bridged nucleic acid analogue // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – Vol. 130. – N. 14. – P. 4886–4896.
28. Shrestha, A. R., Kotobuki, Y., Hari, Y., Obika, S. Guanidine bridged nucleic acid (GuNA): An effect of a cationic bridged nucleic acid on DNA binding affinity // *Chem. Commun.* – 2014. – Vol. 50. – N. 5. – P. 575–577.
29. Osawa, T., Hari, Y., Dohi, M., Matsuda, Y., Obika, S. Synthesis and Properties of the 5-Methyluridine Derivative of 3,4-Dihydro-2H-pyran-Bridged Nucleic Acid (DpNA) // *J. Org. Chem.* – 2015. – Vol. 80. – N. 21. – P. 10474–10481.
30. Seth, P. P., Vasquez, G., Allerson, C. A., Berdeja, A., Gaus, H., Kinberger, G. A., Prakash, T. P., Migawa, M. T., Bhat, B., Swayze, E. E. Synthesis and biophysical evaluation of 2',4'-Constrained 2'O-Methoxyethyl and 2',4'-Constrained 2'O-Ethyl nucleic acid analogues // *J. Org. Chem.* – 2010. – Vol. 75. – N. 5. – P. 1569–1581.
31. Abdur Rahman, S. M., Sato, H., Tsuda, N., Haitani, S., Narukawa, K., Imanishi, T., Obika, S. RNA interference with 2',4'-bridged nucleic acid analogues // *Bioorganic Med. Chem.* – 2010. – Vol. 18. – N. 10. – P. 3474–3480.
32. Kurreck, J., Wyszko, E., Gillen, C., Erdmann, V. A. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30. – N. 9. – P. 1911–1918.
33. Summerton, J., Weller, D. Morpholino Antisense Oligomers: Design, Preparation, and Properties // *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* – 1997. – Vol. 7. – N. 3. – P. 187–195.
34. Kundu, J., Ghosh, A., Ghosh, U., Das, A., Nagar, D., Pattanayak, S., Ghose, A., Sinha, S. Synthesis of Phosphorodiamidate Morpholino Oligonucleotides Using Trityl and Fmoc Chemistry in an Automated Oligo Synthesizer // *J. Org. Chem.* – 2022. – Vol. 87. – N. 15. – P.

9466–9478.

35. Ghosh, A., Mukherjee, M., Banerjee, A., Acharya, S., Sinha, S. Phosphoramidite Platform for the Automated Synthesis of Morpholino Antisense Oligonucleotides and Their Chimeras // *Curr. Protoc.* – 2025. – Vol. 5. – N. 6. – P. e70162.
36. Summerton, J. Morpholino, siRNA and S-DNA Compared: Impact of Structure and Mechanism of Action on Off-Target Effects and Sequence Specificity // *Curr. Top. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 7. – N. 7. – P. 651–660.
37. Damha, M. J., Usman, N., Ogilvie, K. K. Solution and solid phase chemical synthesis of arabinonucleotides // *Can. J. Chem.* – 1989. – Vol. 67. – N. 5. – P. 831–839.
38. Noronha, A. M., Wilds, C. J., Lok, C. N., Viazovkina, K., Arion, D., Parniak, M. A., Damha, M. J. Synthesis and biophysical properties of arabinonucleic acids (ANA): Circular dichroic spectra, melting temperatures, and ribonuclease H susceptibility of ANA·RNA hybrid duplexes // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39. – N. 24. – P. 7050–7062.
39. Damha, M. J., Wilds, C. J., Noronha, A., Brukner, I., Borkow, G., Arion, D., Parniak, M. A. Hybrids of RNA and arabinonucleic acids (ANA and 2'F-ANA) are substrates of ribonuclease H // *J. Am. Chem. Soc.* – 1998. – Vol. 120. – N. 49. – P. 12976–12977.
40. Berger, I., Tereshko, V., Ikeda, H., Marquez, V. E., Egli, M. Crystal structures of B-DNA with incorporated implications of conformational preorganization for duplex stability // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – Vol. 26. – N. 10. – P. 2473–2480.
41. Bellon, L., Barascut, J. Louis, Maury, G., Divita, G., Goody, R., Imbach, J. Louis. 4'-thio-oligo- β -d-ribonucleotides: Synthesis of β -4'-thio-oligoridylates, nuclease resistance, base pairing properties, and interaction with HIV-1 reverse transcriptase // *Nucleic Acids Res.* – 1993. – Vol. 21. – N. 7. – P. 1587–1593.
42. Inagaki, Y., Minakawa, N., Matsuda, A. Synthesis and properties of oligonucleotides containing 4'-selenoribonucleosides // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf).* – 2008. – N. 52. – P. 329–330.
43. Leydier, C., Bellon, L., Barascut, J. L., Deydier, J., Maury, G., Pelicano, H., El Alaoui, M. A., Imbach, J. L. A new synthesis of some 4-thio-d-ribonucleosides and preliminary enzymatic evaluation // *Nucleosides and Nucleotides.* – 1994. – Vol. 13. – N. 10. – P. 2035–2050.
44. Inoue, N., Minakawa, N., Matsuda, A. Synthesis and properties of 4'-thioDNA: Unexpected RNA-like behavior of 4'-thioDNA // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – Vol. 34. – N. 12. – P. 3476–3483.
45. Dande, P., Prakash, T. P., Sioufi, N., Gaus, H., Jarres, R., Berdeja, A., Swayze, E. E., Griffey, R. H., Bhat, B. Improving RNA interference in mammalian cells by 4'-thio-modified small interfering RNA (siRNA): Effect on siRNA activity and nuclease stability when used in

- combination with 2'-O-alkyl modifications // *J. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 49. – N. 5. – P. 1624–1634.
46. Hoshika, S., Minakawa, N., Matsuda, A. Synthesis and physical and physiological properties of 4'-thioRNA: Application to post-modification of RNA aptamer toward NF- κ B // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – N. 13. – P. 3815–3825.
47. Hayakawa, H., Kohgo, S., Kitano, K., Ashida, N., Kodama, E., Mitsuya, H., Ohru, H. Potential of 4'-C-substituted nucleosides for the treatment of HIV-1 // *Antivir. Chem. Chemother.* – 2004. – Vol. 15. – N. 4. – P. 169–187.
48. Petrová, M., Páv, O., Buděšínský, M., Zborníková, E., Novák, P., Rosenbergová, Š., Pačes, O., Liboska, R., Dvořáková, I., Šimák, O., Rosenberg, I. Straightforward Synthesis of Purine 4'-Alkoxy-2'-deoxynucleosides: First Report of Mixed Purine-Pyrimidine 4'-Alkoxyoligodeoxynucleotides as New RNA Mimics // *Org. Lett.* – 2015. – Vol. 17. – N. 14. – P. 3426–3429.
49. Zhou, Y., Lu, K., Li, Q., Fan, C., Zhou, C. C4'-Fluorinated Oligodeoxynucleotides: Synthesis, Stability, Structural Studies // *Chem. - A Eur. J.* – 2021. – Vol. 27. – N. 59. – P. 14738–14746.
50. Malek-Adamian, E., Guenther, D. C., Matsuda, S., Martínez-Montero, S., Zlatev, I., Harp, J., Burai Patrascu, M., Foster, D. J., Fakhoury, J., Perkins, L., Moitessier, N., Manoharan, R. M., Taneja, N., Bisbe, A., Charisse, K., Maier, M., Rajeev, K. G., Egli, M., Manoharan, M., Damha, M. J. 4'-C-Methoxy-2'-deoxy-2'-fluoro Modified Ribonucleotides Improve Metabolic Stability and Elicit Efficient RNAi-Mediated Gene Silencing // *J. Am. Chem. Soc.* – 2017. – Vol. 139. – N. 41. – P. 14542–14555.
51. Kel'in, A. V., Zlatev, I., Harp, J., Jayaraman, M., Bisbe, A., O'Shea, J., Taneja, N., Manoharan, R. M., Khan, S., Charisse, K., Maier, M. A., Egli, M., Rajeev, K. G., Manoharan, M. Structural Basis of Duplex Thermodynamic Stability and Enhanced Nuclease Resistance of 5'-C-Methyl Pyrimidine-Modified Oligonucleotides // *J. Org. Chem.* – 2016. – Vol. 81. – N. 6. – P. 2261–2279.
52. Mikami, A., Erande, N., Matsuda, S., Kel'in, A., Woods, L. B., Chickering, T., Pallan, P. S., Schlegel, M. K., Zlatev, I., Egli, M., Manoharan, M. Synthesis, chirality-dependent conformational and biological properties of siRNAs containing 5'-(R)- and 5'-(S)-C-methyl-guanosine // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – Vol. 48. – N. 18. – P. 10101–10124.
53. Frey, P. A., Sammons, R. D. Bond order and charge localization in nucleoside phosphorothioates // *Science.* – 1985. – Vol. 228. – N. 4699. – P. 541–545.
54. Iyer, R. P., Egan, W., Regan, J. B., Beaucage, S. L. 3H-1,2-Benzodithiole-3-one 1,1-Dioxide as an Improved Sulfurizing Reagent in the Solid-Phase Synthesis of Oligodeoxyribonucleoside

- Phosphorothioates // *J. Am. Chem. Soc.* – 1990. – Vol. 112. – N. 3. – P. 1253–1254.
55. Iyer, R. P., Phillips, L. R., Egan, W., Regan, J. B., Beaucage, S. L. The automated synthesis of sulfur-containing oligodeoxyribonucleotides using 3H-1, 2-benzodithiol-3-one 1, 1-dioxide as a sulfur-transfer reagent // *J. Org. Chem.* – 1990. – Vol. 55. – N. 15. – P. 4693–4699.
56. Cheruvallath, Z. S., Carty, R. L., Moore, M. N., Capaldi, D. C., Krotz, A. H., Wheeler, P. D., Turney, B. J., Craig, S. R., Gaus, H. J., Scozzari, A. N. Synthesis of antisense oligonucleotides: Replacement of 3H-1, 2-benzodithiol-3-one 1, 1-dioxide (Beaucage reagent) with phenylacetyl disulfide (PADS) as efficient sulfurization reagent: From bench to bulk manufacture of active pharmaceutical ingredient // *Org. Process Res. Dev.* – 2000. – Vol. 4. – N. 3. – P. 199–204.
57. Krotz, A. H., Gorman, D., Mataruse, P., Foster, C., Godbout, J. D., Coffin, C. C., Scozzari, A. N. Phosphorothioate oligonucleotides with low phosphate diester content: greater than 99.9% sulfurization efficiency with “aged” solutions of phenylacetyl disulfide (PADS) // *Org. Process Res. Dev.* – 2004. – Vol. 8. – N. 6. – P. 852–858.
58. Guzaev, A. P. Reactivity of 3H-1,2,4-dithiazole-3-thiones and 3H-1,2-dithiole-3-thiones as sulfurizing agents for oligonucleotide synthesis // *Tetrahedron Lett.* – 2011. – Vol. 52. – N. 3. – P. 434–437.
59. Scotson, J. L., Andrews, B. I., Laws, A. P., Page, M. I. Phosphorothioate anti-sense oligonucleotides: the kinetics and mechanism of the sulfurisation of phosphites by phenylacetyl disulfide (PADS) // *Org. Biomol. Chem.* – 2016. – Vol. 14. – N. 46. – P. 10840–10847.
60. Ponomarov, O., Laws, A. P., Hanusek, J. 1,2,4-Dithiazole-5-ones and 5-thiones as efficient sulfurizing agents of phosphorus(iii) compounds - A kinetic comparative study // *Org. Biomol. Chem.* – 2012. – Vol. 10. – N. 44. – P. 8868–8876.
61. Yang, J., Stolee, J. A., Jiang, H., Xiao, L., Kiesman, W. F., Antia, F. D., Fillon, Y. A., Ng, A., Shi, X. Solid-Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligonucleotides Using Sulfurization Byproducts for in Situ Capping // *J. Org. Chem.* – 2018. – Vol. 83. – N. 19. – P. 11577–11585.
62. Koziolkiewicz, M., Krakowiak, A., Kwinkowski, M., Boczkowska, M., Stec, W. J. Stereodifferentiation-the effect of P chirality of oligo (nucleoside phosphorothioates) on the activity of bacterial RNase H // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – Vol. 23. – N. 24. – P. 5000–5005.
63. Yu, D., Kandimalla, E. R., Roskey, A., Zhao, Q., Chen, L., Chen, J., Agrawal, S. Stereo-enriched phosphorothioate oligodeoxynucleotides: Synthesis, biophysical and biological properties // *Bioorganic Med. Chem.* – 2000. – Vol. 8. – N. 1. – P. 275–284.
64. Iwamoto, N., Butler, D. C. D., Svrzikapa, N., Mohapatra, S., Zlatev, I., Sah, Di. W. Y., Meena, Standley, S. M., Lu, G., Apponi, L. H., Frank-Kamenetsky, M., Zhang, J. J., Vargeese, C., Verdine, G. L. Control of phosphorothioate stereochemistry substantially increases the efficacy of antisense oligonucleotides // *Nat. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 35. – N. 9. – P. 845–

851.

65. Crooke, S. T., Wang, S., Vickers, T. A., Shen, W., Liang, X. H. Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides // *Nat. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 35. – N. 3. – P. 230–237.
66. Geary, R. S., Norris, D., Yu, R., Bennett, C. F. Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2015. – Vol. 87. – P. 46–51.
67. Crooke, S. T., Seth, P. P., Vickers, T. A., Liang, X. H. The interaction of phosphorothioate-containing RNA targeted drugs with proteins is a critical determinant of the therapeutic effects of these agents // *J. Am. Chem. Soc.* – 2020. – Vol. 142. – N. 35. – P. 14754–14771.
68. Wiesler, W. T., Caruthers, M. H. Synthesis of phosphorodithioate DNA via sulfur-linked, base-labile protecting groups // *J. Org. Chem.* – 1996. – Vol. 61. – N. 13. – P. 4272–4281.
69. Marshall, W. S., Caruthers, M. H. Phosphorodithioate DNA as a potential therapeutic drug // *Science.* – 1993. – Vol. 259. – N. 5101. – P. 1564–1570.
70. Abeydeera, N. D., Egli, M., Cox, N., Mercier, K., Conde, J. N., Pallan, P. S., Mizurini, D. M., Sierant, M., Hibti, F. E., Hassell, T., Wang, T., Liu, F. W., Liu, H. M., Martinez, C., Sood, A. K., Lybrand, T. P., Frydman, C., Monteiro, R. Q., Gomer, R. H., Nawrot, B., Yang, X. Evoking picomolar binding in RNA by a single phosphorodithioate linkage // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – Vol. 44. – N. 17. – P. 8052–8064.
71. Wu, S. Y., Yang, X., Gharpure, K. M., Hatakeyama, H., Egli, M., McGuire, M. H., Nagaraja, A. S., Miyake, T. M., Rupaimoole, R., Pecot, C. V., Taylor, M., Pradeep, S., Sierant, M., Rodriguez-Aguayo, C., Choi, H. J., Previs, R. A., Armaiz-Pena, G. N., Huang, L., Martinez, C., Hassell, T., Ivan, C., Sehgal, V., Singhanian, R., Han, H. D., Su, C., Kim, J. H., Dalton, H. J., Kovvali, C., Keyomarsi, K., McMillan, N. A. J., Overwijk, W. W., Liu, J., Lee, J. S., Baggerly, K. A., Lopez-Berestein, G., Ram, P. T., Nawrot, B., Sood, A. K. 2'-OMe-phosphorodithioate-modified siRNAs show increased loading into the RISC complex and enhanced anti-tumour activity // *Nat. Commun.* – 2014. – Vol. 5. – P. 1–12.
72. Cummins, L., Graff, D., Beaton, G., Marshall, W. S., Caruthers, M. H. Biochemical and physicochemical properties of phosphorodithioate DNA // *Biochemistry.* – 1996. – Vol. 35. – N. 26. – P. 8734–8741.
73. Li, N.-S., Frederiksen, J. K., Piccirilli, J. A. Synthesis, properties, and applications of oligonucleotides containing an RNA dinucleotide phosphorothiolate linkage // *Acc. Chem. Res.* – 2011. – Vol. 44. – N. 12. – P. 1257–1269.
74. Duschmalé, J., Hansen, H. F., Duschmalé, M., Koller, E., Albaek, N., Møller, M. R., Jensen, K., Koch, T., Wengel, J., Bleicher, K. In vitro and in vivo properties of therapeutic oligonucleotides containing non-chiral 3' and 5' thiophosphate linkages // *Nucleic Acids Res.* –

2020. – Vol. 48. – N. 1. – P. 63–74.

75. Sun, S., Yoshida, A., Piccirilli, J. A. Synthesis of 3'-thioribonucleosides and their incorporation into oligoribonucleotides via phosphoramidite chemistry // *RNA*. – 1997. – Vol. 3. – N. 11. – P. 1352–1363.

76. Kuimelis, R. G., McLaughlin, L. W. Cleavage properties of an oligonucleotide containing a bridged internucleotide 5'-phosphorothioate RNA linkage // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – Vol. 23. – N. 23. – P. 4753–4760.

77. Cosstick, R., Gaynor, J. W. Synthesis, properties and application of nucleic acids containing phosphorothiolate linkages // *Curr. Org. Chem.* – 2008. – Vol. 12. – N. 4. – P. 291–308.

78. Burgin, A. B., Huizenga, B. N., Nash, H. A. A novel suicide substrate for DNA topoisomerases and site-specific recombinases // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – Vol. 23. – N. 15. – P. 2973–2979.

79. Szczelkun, M. D., Connolly, B. A. Sequence-Specific Binding of DNA by the EcoRV Restriction and Modification Enzymes with Nucleic Acid and Cofactor Analogs // *Biochemistry*. – 1995. – Vol. 34. – N. 34. – P. 10724–10733.

80. Piccirilli, J. A., Vyle, J. S., Caruthers, M. H., Cech, T. R. Metal ion catalysis in the Tetrahymena ribozyme reaction // *Nature*. – 1993. – Vol. 361. – N. 6407. – P. 85–88.

81. Shaw, B. R., Madison, J., Sood, A., Spielvogel, B. F. Oligonucleoside Boranophosphate (Borane Phosphonate) // *Protoc. Oligonucleotides Analog. Synth. Prop.* – 1993. – P. 225–243.

82. Tomasz, J., Shaw, B. R., Porter, K., Spielvogel, B. F., Sood, A. 5'-p-borane-substituted thymidine monophosphate and triphosphate // *Angew. Chemie Int. Ed. English*. – 1992. – Vol. 31. – N. 10. – P. 1373–1375.

83. McCuen, H. B., Noé, M. S., Sierzchala, A. B., Higson, A. P., Caruthers, M. H. Synthesis of mixed sequence borane phosphonate DNA // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 128. – N. 25. – P. 8138–8139.

84. Roy, S., Olesiak, M., Shang, S., Caruthers, M. H. Silver nanoassemblies constructed from boranephosphonate DNA // *J. Am. Chem. Soc.* – 2013. – Vol. 135. – N. 16. – P. 6234–6241.

85. Higson, A. P., Sierzchala, A., Brummel, H., Zhao, Z., Caruthers, M. H. Synthesis of an oligothymidylate containing boranophosphate linkages // *Tetrahedron Lett.* – 1998. – Vol. 39. – N. 23. – P. 3899–3902.

86. Roy, S., Paul, S., Roy, M., Kundu, R., Monfregola, L., Caruthers, M. H. Pyridinium Boranephosphonate Modified DNA Oligonucleotides // *J. Org. Chem.* – 2017. – Vol. 82. – N. 3. – P. 1420–1427.

87. Hall, A. H. S., Wan, J., Shaughnessy, E. E., Shaw, B. R., Alexander, K. A. RNA interference using boranophosphate siRNAs: Structure-activity relationships // *Nucleic Acids Res.* – 2004. –

Vol. 32. – N. 20. – P. 5991–6000.

88. Olesiak, M., Krivenko, A., Krishna, H., Caruthers, M. H. Synthesis and biological activity of borane phosphonate DNA // *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* – 2011. – Vol. 186. – N. 4. – P. 921–932.

89. McCuen, H. B., Noe, M. S., Olesiak, M., Sierzchala, A. B., Caruthers, M. H., Higson, A. P. Synthesis and biochemical activity of new oligonucleotide analogs // *Phosphorus, Sulfur, and Silicon.* – 2008. – Vol. 183. – N. 2–3. – P. 349–363.

90. Nukaga, Y., Takemura, T., Iwamoto, N., Oka, N., Wada, T. Enhancement of the affinity of 2'-O-Me-oligonucleotides for complementary RNA by incorporating a stereoregulated boranophosphate backbone // *RSC Adv.* – 2015. – Vol. 5. – N. 4. – P. 2392–2395.

91. Iwamoto, N., Oka, N., Wada, T. Stereocontrolled synthesis of oligodeoxyribonucleoside boranophosphates by an oxazaphospholidine approach using acid-labile N-protecting groups // *Tetrahedron Lett.* – 2012. – Vol. 53. – N. 33. – P. 4361–4364.

92. Miller, P. S. Oligonucleoside Methylphosphonates as Antisense Reagents // *Bio/Technology.* – 1991. – Vol. 9. – N. 4. – P. 358–362.

93. Flür, S., Micura, R. Chemical synthesis of RNA with site-specific methylphosphonate modifications // *Methods.* – 2016. – Vol. 107. – N. 2016. – P. 79–88.

94. Miller, P. S., Bhan, P., Cushman, C. D., Kean, J. M., Levis, J. T. Antisense oligonucleoside methylphosphonates and their derivatives // *Nucleosides and Nucleotides.* – 1991. – Vol. 10. – N. 1–3. – P. 37–46.

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

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

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

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

99. Reynolds, M. A., Hogrefe, R. I., Jaeger, J. A., Schwartz, D. A., Riley, T. A., Marvin, W. B., Daily, W. J., Vaghefi, M. M., Beck, T. A., Knowles, S. K., Klem, R. E., Arnold, L. J. Synthesis

- and thermodynamics of oligonucleotides containing chirally pure R(p) methylphosphonate linkages // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – Vol. 24. – N. 22. – P. 4584–4591.
100. Krishna, H., Caruthers, M. H. Alkynyl phosphonate DNA: A versatile “click”able backbone for DNA-based biological applications // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – Vol. 134. – N. 28. – P. 11618–11631.
101. Timmer, M. S. M., Ovaa, H., Filippov, D. V., Van Der Marel, G. A., Van Boom, J. H. Synthesis of phosphorus mono- and bicycles by catalytic ring-closing metathesis // *Tetrahedron Lett.* – 2001. – Vol. 42. – N. 46. – P. 8231–8233.
102. Shang, S., Monfregola, L., Caruthers, M. H. Peptide-substituted oligonucleotide synthesis and non-toxic, passive cell delivery // *Signal Transduct. Target. Ther.* – 2016. – Vol. 1. – N. July. – P. 1–9.
103. Dellinger, D. J., Sheehan, D. M., Christensen, N. K., Lindberg, J. G., Caruthers, M. H. Solid-phase chemical synthesis of phosphonoacetate and thiophosphonoacetate oligodeoxynucleotides // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – Vol. 125. – N. 4. – P. 940–950.
104. Yamada, C. M., Dellinger, D. J., Caruthers, M. H. Synthesis and Biological Activity of Phosphonocarboxylate DNA // *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids.* – 2007. – Vol. 26. – N. 6–7. – P. 539–546.
105. Sheehan, D., Lunstad, B., Yamada, C. M., Stell, B. G., Caruthers, M. H., Dellinger, D. J. Biochemical properties of phosphonoacetate and thiophosphonoacetate oligodeoxyribonucleotides // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – Vol. 31. – N. 14. – P. 4109–4118.
106. Threlfall, R. N., Torres, A. G., Krivenko, A., Gait, M. J., Caruthers, M. H. Synthesis and biological activity of phosphonoacetate- and thiophosphonoacetate-modified 2'-O-methyl oligoribonucleotides // *Org. Biomol. Chem.* – 2012. – Vol. 10. – N. 4. – P. 746–754.
107. Matsui, M., Threlfall, R. N., Caruthers, M. H., Corey, D. R. Effect of 2'-O-methyl/thiophosphonoacetate-modified antisense oligonucleotides on huntingtin expression in patient-derived cells // *Artif. DNA. PNA XNA.* – 2014. – Vol. 5. – N. 3. – P. e1146391.
108. Hendel, A., Bak, R. O., Clark, J. T., Kennedy, A. B., Ryan, D. E., Roy, S., Steinfeld, I., Lunstad, B. D., Kaiser, R. J., Wilkens, A. B., Bacchetta, R., Tsalenko, A., Dellinger, D., Bruhn, L., Porteus, M. H. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells // *Nat. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 33. – N. 9. – P. 985–989.
109. Yamada, C. M., Dellinger, D. J., Caruthers, M. H. Synthesis and biochemical evaluation of phosphonoformate oligodeoxyribonucleotides // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 128. – N. 15. – P. 5251–5261.
110. Meade, B. R., Gogoi, K., Hamil, A. S., Palm-Apergi, C., Van Den Berg, A., Hagopian, J. C., Springer, A. D., Eguchi, A., Kacsinta, A. D., Dowdy, C. F., Presente, A., Lönn, P., Kaulich,

- M., Yoshioka, N., Gros, E., Cui, X. S., Dowdy, S. F. Efficient delivery of RNAi prodrugs containing reversible charge-neutralizing phosphotriester backbone modifications // *Nat. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 32. – N. 12. – P. 1256–1261.
111. Monfregola, L., Caruthers, M. H. Solid-Phase Synthesis, Hybridizing Ability, Uptake, and Nuclease Resistant Profiles of Position-Selective Cationic and Hydrophobic Phosphotriester Oligonucleotides // *J. Org. Chem.* – 2015. – Vol. 80. – N. 18. – P. 9147–9158.
112. Yanachkov, I., Zavizion, B., Metelev, V., Stevens, L. J., Tabatadze, Y., Yanachkova, M., Wright, G., Krichevsky, A. M., Tabatadze, D. R. Self-neutralizing oligonucleotides with enhanced cellular uptake // *Org. Biomol. Chem.* – 2017. – Vol. 15. – N. 6. – P. 1363–1380.
113. Poijarvi-Virta, P., Lonnberg, H. Prodrug Approaches of Nucleotides and Oligonucleotides // *Curr. Med. Chem.* – 2006. – Vol. 13. – N. 28. – P. 3441–3465.
114. Hansen, R. A., Märcher, A., Pedersen, K. N., Gothelf, K. V. Insertion of Chemical Handles into the Backbone of DNA during Solid-Phase Synthesis by Oxidative Coupling of Amines to Phosphites // *Angew. Chemie - Int. Ed.* – 2023. – Vol. 62. – N. 26. – P. 1–8.
115. Nekrasov, M. D., Pyshnyi, D. V., Kupryushkin, M. S. Application of Iodine-Amine Oxidation Approach in the Synthesis of Various N-Alkyl Phosphoramidate Oligonucleotide Derivatives // *Med. Chem. (Los. Angeles)*. – 2025. – Vol. 21. – N. 3. – P. 229–238.
116. Jäger, A., Levy, M. J., Hecht, S. M. Oligonucleotide N-Alkylphosphoramidates: Synthesis and Binding to Polynucleotides // *Biochemistry*. – 1988. – Vol. 27. – N. 19. – P. 7237–7246.
117. Nielsen, J., Caruthers, M. H. Directed Arbuzov-Type Reactions of 2-Cyano-1,1-dimethylethyl Deoxynucleoside Phosphites // *J. Am. Chem. Soc.* – 1988. – Vol. 110. – N. c. – P. 6275–6276.
118. Santorelli, A., Gothelf, K. V. Conjugation of chemical handles and functional moieties to DNA during solid phase synthesis with sulfonyl azides // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – Vol. 50. – N. 13. – P. 7235–7246.
119. Zhukov, S. A., Pyshnyi, D. V., Kupryushkin, M. S. Synthesis of Novel Representatives of Phosphoryl Guanidine Oligonucleotides // *Russ. J. Bioorganic Chem.* – 2021. – Vol. 47. – N. 2. – P. 380–389.
120. Leffler, J. E., Temple, R. D. The Staudinger Reaction between Triarylphosphines and Azides. A Study of the Mechanism // *J. Am. Chem. Soc.* – 1967. – Vol. 89. – N. 20. – P. 5235–5246.
121. Van Kalker, H. A., Bruins, J. J., Rutjes, F. P. J. T., Van Delft, F. L. Organophosphorus-catalysed Staudinger reduction // *Adv. Synth. Catal.* – 2012. – Vol. 354. – N. 8. – P. 1417–1421.
122. Bazhenov, M. A., Shernyukov, A. V., Kupryushkin, M. S., Pyshnyi, D. V. Study of the Staudinger Reaction and Reveal of Key Factors Affecting the Efficacy of Automatic Synthesis of

Phosphoryl Guanidinic Oligonucleotide Analogs // *Russ. J. Bioorganic Chem.* – 2019. – Vol. 45. – N. 6. – P. 699–708.

123. Laurent, A., Naval, M., Debart, F., Vasseur, J. J., Rayner, B. Chiral and steric effects in the efficient binding of α -anomeric deoxyoligonucleoside N-alkylphosphoramidates to ssDNA and RNA // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – Vol. 27. – N. 21. – P. 4151–4159.

124. Letsinger, R. L., Singman, C. N., Hestand, G., Salunkhe, M. Cationic oligonucleotides // *J. Am. Chem. Soc.* – 1988. – Vol. 110. – N. 13. – P. 4470–4471.

125. 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.

126. Markov, O. V., Filatov, A. V., Kupryushkin, M. S., Chernikov, I. V., Patutina, O. A., Strunov, A. A., Chernolovskaya, E. L., Vlassov, V. V., Pyshnyi, D. V., Zenkova, M. A. Transport oligonucleotides—a novel system for intracellular delivery of antisense therapeutics // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25. – N. 16. – P. 1–27.

127. Tomasz, J., Simoncsits, A. On the stability of phosphodiester-amide internucleotide bond // *Tetrahedron Lett.* – 1981. – Vol. 22. – N. 39. – P. 3905–3908.

128. Garrison, A. W., Boozer, C. E. The Acid-Catalyzed Hydrolysis of a Series of Phosphoramidates // *J. Am. Chem. Soc.* – 1968. – Vol. 90. – N. 13. – P. 3486–3494.

129. Heindl, D., Kessler, D., Schube, A., Thuer, W., Giraut, A. Easy method for the synthesis of labeled oligonucleotides // *Nucleic Acids Symp. Ser. (Oxf).* – 2008. – N. 52. – P. 405–406.

130. Chelobanov, B. P., Burakova, E. A., Prokhorova, D. V., Fokina, A. A., Stetsenko, D. A. New oligodeoxynucleotide derivatives containing N-(methanesulfonyl)-phosphoramidate (mesyl phosphoramidate) internucleotide group // *Russ. J. Bioorganic Chem.* – 2017. – Vol. 43. – N. 6. – P. 664–668.

131. Derzhalova, A., Markov, O., Fokina, A., Shiohama, Y., Zatsepin, T., Fujii, M., Zenkova, M., Stetsenko, D. Novel lipid-oligonucleotide conjugates containing long-chain sulfonyl phosphoramidate groups: Synthesis and biological properties // *Appl. Sci.* – 2021. – Vol. 11. – N. 3. – P. 1–15.

132. 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. 1–18.

133. Zhukov, S. A., Seroklinova, E. G., Kupryushkin, M. S. Expanding the Range of Methods for Obtaining Diverse Representatives of Sulfonyl Phosphoramidate Oligonucleotides // *ACS Omega.* – 2026. – Vol. 11. – N. 6. – P. 10191–10208.

134. Miroshnichenko, S. K., Patutina, O. A., Burakova, E. A., Chelobanov, B. P., Fokina, A. A.,

- Vlassov, V. V., Altman, S., Zenkova, M. A., Stetsenko, D. A. Mesyl phosphoramidate antisense oligonucleotides as an alternative to phosphorothioates with improved biochemical and biological properties // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2019. – Vol. 116. – N. 4. – P. 1229–1234.
135. 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.
136. Kupryushkin, M. S., Pyshnyi, D. V., Stetsenko, D. A. Phosphoryl guanidines: A new type of nucleic acid analogues // *Acta Naturae.* – 2014. – Vol. 6. – N. 23. – P. 116–118.
137. Stetsenko, D., Kupryushkin, M., Pyshnyi, D. Modified Oligonucleotides and Methods for Their Synthesis. International Patent No. WO2016028187A1 // 2014.
138. Kupryushkin, M. S., Filatov, A. V., Mironova, N. L., Patutina, O. A., Chernikov, I. V., Chernolovskaya, E. L., Zenkova, M. A., Pyshnyi, D. V., Stetsenko, D. A., Altman, S., Vlassov, V. V. Antisense oligonucleotide gapmers containing phosphoryl guanidine groups reverse MDR1-mediated multiple drug resistance of tumor cells // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* – 2022. – Vol. 27. – N. March. – P. 211–226.
139. Lomzov, A. A., Kupryushkin, M. S., Shernyukov, A. V., Nekrasov, M. D., Dovydenko, I. S., Stetsenko, D. A., Pyshnyi, D. V. Diastereomers of a mono-substituted phosphoryl guanidine trideoxyribonucleotide: Isolation and properties // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2019. – Vol. 513. – N. 4. – P. 807–811.
140. Dyudeeva, E. S., Kupryushkin, M. S., Lomzov, A. A., Pyshnaya, I. A., Pyshnyi, D. V. Physicochemical Properties of the Phosphoryl Guanidine Oligodeoxyribonucleotide Analogs // *Russ. J. Bioorganic Chem.* – 2019. – Vol. 45. – N. 6. – P. 709–718.
141. Lomzov, A. A., Kupryushkin, M. S., Dyudeeva, E. S., Pyshnyi, D. V. A Comparative Study of the Hybridization of Phosphoryl Guanidine Oligonucleotides with DNA and RNA // *Russ. J. Bioorganic Chem.* – 2021. – Vol. 47. – N. 2. – P. 461–468.
142. Gryaznov, S. M., Lloyd, D. H., Chen, J. K., Schultz, R. G., Dedionisio, L. A., Ratmeyer, L., Wilson, W. D. Oligonucleotide N3' → P5' phosphoramidates // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1995. – Vol. 92. – N. 13. – P. 5798–5802.
143. Chen, J. kang, Schultz, R. G., Lioyd, D. H., Gryaznov, S. M. Synthesis of oligodeoxyribonucleotide N3'→P5' phosphoramidates // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – Vol. 23. – N. 14. – P. 2661–2668.

144. Matray, T. J., Gryaznov, S. M. Synthesis and properties of RNA analogs - Oligoribonucleotide N3'→P5' phosphoramidates // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – Vol. 27. – N. 20. – P. 3976–3985.
145. Gryaznov, S., Skorski, T., Cucco, C., Nieborowska-Skorska, M., Chiu, C. Y., Lloyd, D., Chen, J. K., Koziolkiewicz, M., Calabretta, B. Oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates as antisense agents // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – Vol. 24. – N. 8. – P. 1508–1514.
146. Skorski, T., Perrotti, D., Nieborowska-Skorska, M., Gryaznov, S., Calabretta, B. Antileukemia effect of c-myc N3'→P5' phosphoramidate antisense oligonucleotides in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1997. – Vol. 94. – N. 8. – P. 3966–3971.
147. Gryaznov, S. M. Oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates and thio-phosphoramidates as potential therapeutic agents // *Chem. Biodivers.* – 2010. – Vol. 7. – N. 3. – P. 477–493.
148. Shea-Herbert, B., Pongracz, K., Shay, J. W., Gryaznov, S. M. Oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates as efficient telomerase inhibitors // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 21. – N. 1. – P. 638–642.
149. Keam, S. J. Imetelstat: First Approval // *Drugs.* – 2024. – Vol. 84. – N. 9. – P. 1149–1155.
150. Stetsenko, D., Kupryushkin, M., Pyshnyi, D. Modified Oligonucleotides and Methods for Their Synthesis // 2016.
151. Riobé, F., Grosshans, P., Sidorenkova, H., Geoffroy, M., Avarvari, N. Mono- and bis(tetrathiafulvalene)-1,3,5-triazines as covalently linked donor-acceptor systems: Structural, spectroscopic, and theoretical investigations // *Chem. - A Eur. J.* – 2009. – Vol. 15. – N. 2. – P. 380–387.
152. Fink, R., Frenz, C., Thelakkat, M., Schmidt, H. W. Synthesis and characterization of aromatic poly(1,3,5-triazine-ether)s for electroluminescent devices // *Macromolecules.* – 1997. – Vol. 30. – N. 26. – P. 8177–8181.
153. Sun, D., Si, C., Wang, T., Zysman-Colman, E. 1,3,5-Triazine-Functionalized Thermally Activated Delayed Fluorescence Emitters for Organic Light-Emitting Diodes // *Adv. Photonics Res.* – 2022. – Vol. 3. – N. 11. – P. 1–54.
154. Lomzov, A. A., Kupryushkin, M. S., Shernyukov, A. V., Nekrasov, M. D., Dovydenko, I. S., Stetsenko, D. A., Pyshnyi, D. V. Data for isolation and properties analysis of diastereomers of a mono-substituted phosphoryl guanidine trideoxyribonucleotide // *Data Br.* – 2019. – Vol. 25. – P. 104148.
155. Blotny, G. Recent applications of 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine and its derivatives in organic synthesis // *Tetrahedron.* – 2006. – Vol. 62. – N. 41. – P. 9507–9522.
156. Min, Q., Miao, P., Chu, D., Liu, J., Qi, M., Kazemnejadi, M. Introduction of a Recyclable Basic Ionic Solvent with Bis-(NHC) Ligand Property and The Possibility of Immobilization on

- Magnetite for Ligand- and Base-Free Pd-Catalyzed Heck, Suzuki and Sonogashira Cross-Coupling Reactions in Water // *Catal. Letters*. – 2021. – Vol. 151. – N. 10. – P. 3030–3047.
157. Thurston, J. T., Schaefer, F. C., Dudley, J. R., Holm-Hansen, D. Cyanuric Chloride Derivatives. V. Reaction of Alkoxy-s-triazines and Aryloxy-s-triazines with Amines // *J. Am. Chem. Soc.* – 1951. – Vol. 73. – N. 7. – P. 2992–2996.
158. Palacios, F., Aparicio, D., Rubiales, G., Alonso, C., de los Santos, J. N-Vinyllic Phosphazenes. A Useful Tool for the Synthesis of Acyclic and Heterocyclic Compounds // *Curr. Org. Chem.* – 2006. – Vol. 10. – N. 18. – P. 2371–2392.
159. Soltani Rad, M. N., Behrouz, S., Asrari, Z., Khalafi-Nezhad, A. A simple and regioselective one-pot procedure for the direct N-acylation of some purine and pyrimidine nucleobases via carboxylic acids using cyanuric chloride // *Monatshefte für Chemie*. – 2014. – Vol. 145. – N. 12. – P. 1933–1940.
160. Roberts, T. C., Langer, R., Wood, M. J. A. Advances in oligonucleotide drug delivery // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2020. – Vol. 19. – N. 10. – P. 673–694.
161. Merdan, T., Kopeček, J., Kissel, T. Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2002. – Vol. 54. – N. 5. – P. 715–758.
162. Sorensen, M. D., Meldgaard, M., Rajwanshi, V. K., Wengel, J. Branched oligonucleotides containing bicyclic nucleotides as branching points and DNA or LNA as triplex forming branch // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* – 2000. – Vol. 10. – N. 16. – P. 1853–1856.
163. Azhayeva, E., Azhayev, A., Guzaev, A., Hovinen, J., Lönnberg, H. Looped oligonucleotides form stable hybrid complexes with a single-stranded DNA // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – Vol. 23. – N. 7. – P. 1170–1176.
164. Antopolsky, M., Azhayeva, E., Tengvall, U., Azhayev, A. Towards a general method for the stepwise solid-phase synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates // *Tetrahedron Lett.* – 2002. – Vol. 43. – N. 3. – P. 527–530.
165. Halpin, D. R., Lee, J. A., Wrenn, S. J., Harbury, P. B. DNA display III. Solid-phase organic synthesis on unprotected DNA // *PLoS Biol.* – 2004. – Vol. 2. – N. 7. – P. 1031–1038.
166. Meschaninova, M. I., Novopashina, D. S., Semikolenova, O. A., Silnikov, V. N., Venyaminova, A. G. Novel convenient approach to the solid-phase synthesis of oligonucleotide conjugates // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – N. 23. – P. 1–14.
167. Venner, H. Untersuchungen an Nucleinsäureii, IX Stabilität der N-glykosidischen Bindung von Nucleosiden // *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiol. Chemie*. – 1964. – Vol. 339. – N. Jahresband. – P. 14–27.
168. Michelson, A. M., Todd, A. R. Michelson and Todd : Nucleotides. Part XXIII .

Mononucleotides derived from Deoxycytidine. Note on the Structure of Cytidylic Acids and b // *J. Chem. Soc.* – 1953. – N. 34.

169. Dyudeeva, E. S., Pavlova, A. S., Kupryushkin, M. S., Pyshnyi, D. V., Pyshnaya, I. A. Problems of the Synthesis of Oligonucleotide Derivatives in the Realization of the Anchimeric Effect // *Russ. J. Bioorganic Chem.* – 2021. – Vol. 47. – N. 2. – P. 505–513.
170. Golyshev, V. M., Pyshnyi, D. V., Lomzov, A. A. Effects of Phosphoryl Guanidine Modification of Phosphate Residues on the Structure and Hybridization of Oligodeoxyribonucleotides // *J. Phys. Chem. B.* – 2021. – Vol. 125. – N. 11. – P. 2841–2855.
171. 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. – Vol. 29. – N. 2.
172. Pokholenko, O., Gissot, A., Vialet, B., Bathany, K., Thiéry, A., Barthélémy, P. Lipid oligonucleotide conjugates as responsive nanomaterials for drug delivery // *J. Mater. Chem. B.* – 2013. – Vol. 1. – N. 39. – P. 5329–5334.
173. Pavlova, A. S., Dovydenko, I. S., Kupryushkin, M. S., Grigor'eva, A. E., Pyshnaya, I. A., Pyshnyi, D. V. Amphiphilic “like-a-brush” oligonucleotide conjugates with three dodecyl chains: Self-assembly features of novel scaffold compounds for nucleic acids delivery // *Nanomaterials.* – 2020. – Vol. 10. – N. 10. – P. 1–19.
174. Bauer, I., Ilina, E., Zharkov, T., Grigorieva, E., Chinak, O., Kupryushkin, M., Golyshev, V., Mitin, D., Chubarov, A., Khodyreva, S., Dmitrienko, E. Self-Penetrating Oligonucleotide Derivatives: Features of Self-Assembly and Interactions with Serum and Intracellular Proteins // *Pharmaceutics.* – 2023. – Vol. 15. – N. 12.
175. Kupryushkin, M. S., Zharkov, T. D., Ilina, E. S., Markov, O. V., Kochetkova, A. S., Akhmetova, M. M., Lomzov, A. A., Pyshnyi, D. V., Lavrik, O. I., Khodyreva, S. N. Triazinylamidophosphate Oligonucleotides: Synthesis and Study of Their Interaction with Cells and DNA-Binding Proteins // *Russ. J. Bioorganic Chem.* – 2021. – Vol. 47. – N. 3. – P. 719–733.
176. 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. – Vol. 24. – N. 19.
177. Petrova, N. S., Chernikov, I. V., Meschaninova, M. I., Dovydenko, I. S., Venyaminova, A. G., Zenkova, M. A., Vlassov, V. V., Chernolovskaya, E. L. Carrier-free cellular uptake and the gene-silencing activity of the lipophilic siRNAs is strongly affected by the length of the linker between siRNA and lipophilic group // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Vol. 40. – N. 5. – P. 2330–2344.

Приложение 1

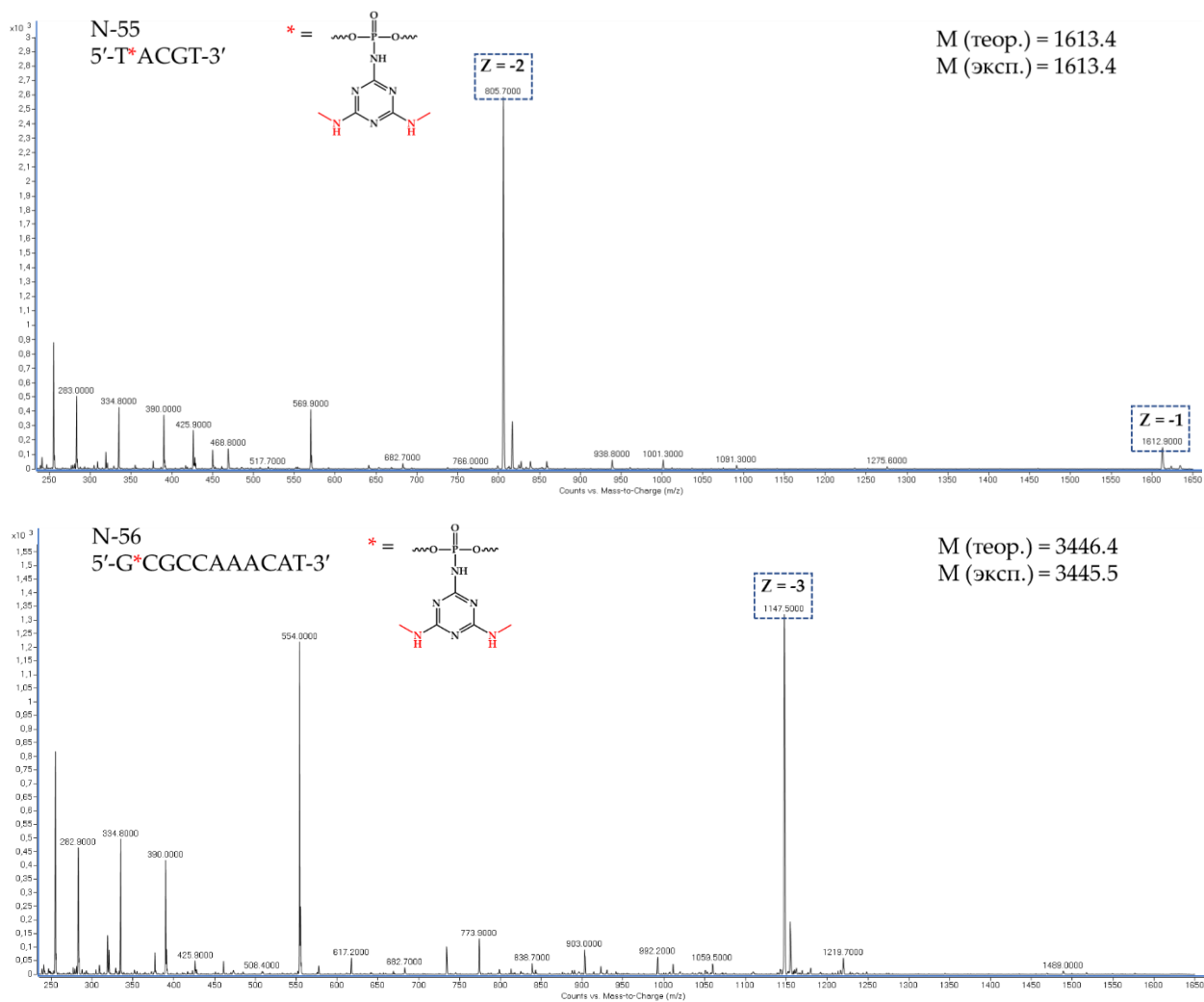


Рис. П1. Фрагменты ESI-MS масс-спектра в варианте отрицательных ионов реакционных смесей гетероолигонуклеотидов (N-55, N-56) и структуры триазиламидофосфатного звена.

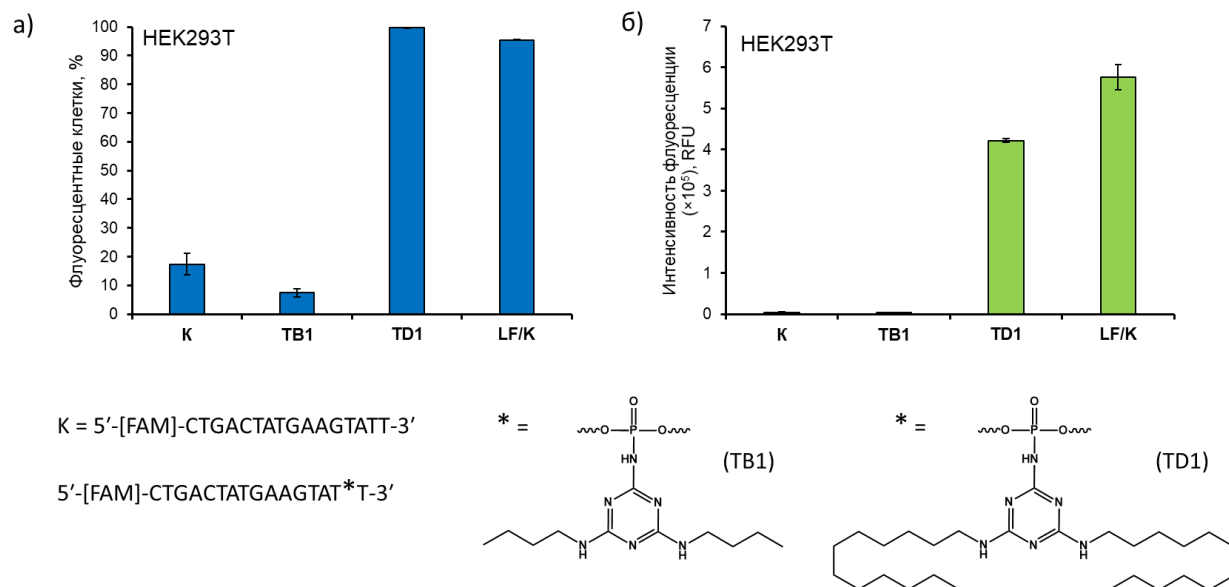


Рис. П2. Процент флуоресцентных клеток (а) и интенсивность флуоресценции (б) при трансфекции клеток линии HEK293T триазириламинофосфатными олигонуклеотидами последовательности 5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTAT*T-3', содержащими остатки бутиламина (TB1) или додециламина (TD1), а также контрольным немодифицированным олигонуклеотидом (K) и его комплексом с трансфецирующим агентом (LF/K). Концентрация олигонуклеотидов – 5 мкМ. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

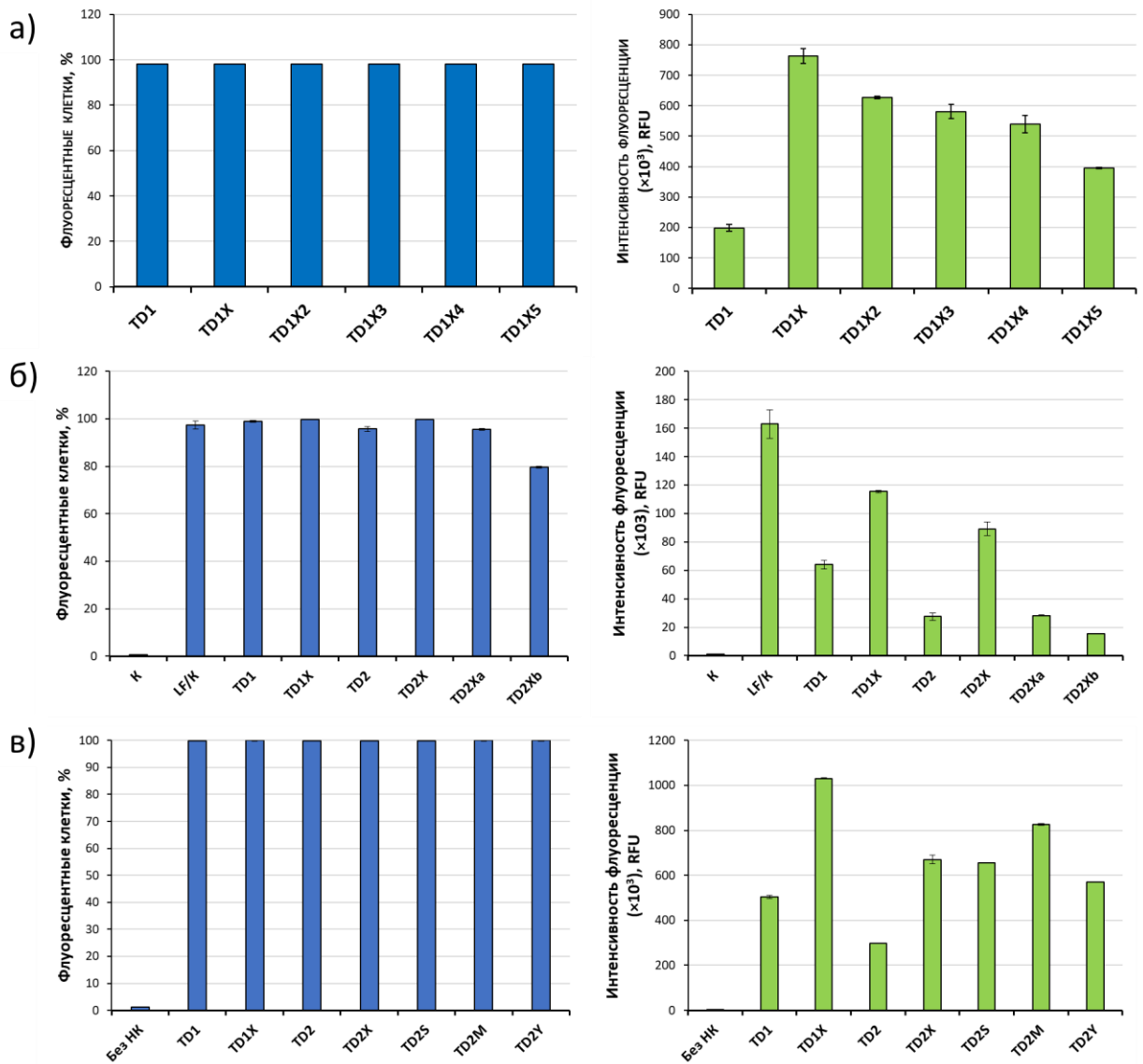


Рис. П3. Процент флуоресцентных клеток (левая панель) и интенсивность флуоресценции (правая панель) при трансфекции клеток НЕК293Т додецил-содержащими олигонуклеотидами, содержащими разное количество ФГ-модификаций (а), ФГ-модификации в различных положениях цепи (б) и фосфатные модификации различной природы (в). Концентрация олигонуклеотидов – 5 мкМ. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

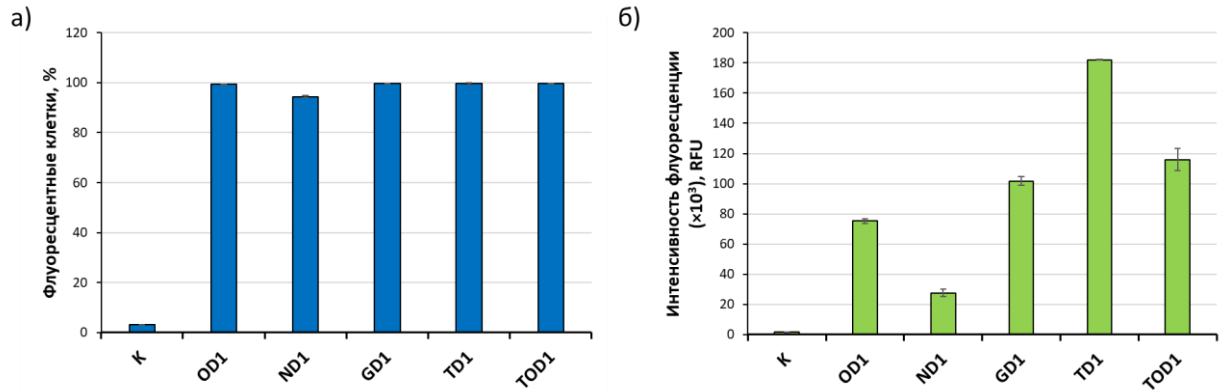
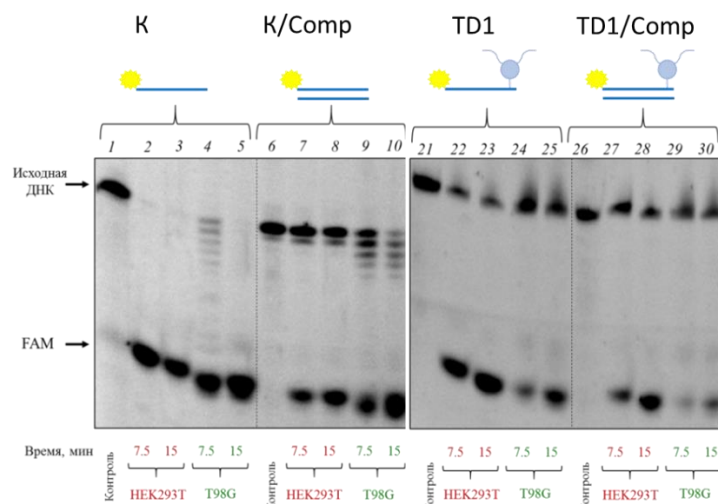


Рис. П4. Процент флуоресцентных клеток (а) и интенсивность флуоресценции (б) при трансфекции клеток НЕК293Т различными додецил-содержащими олигонуклеотидами, а также контрольным олигонуклеотидом последовательности 5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTATT-3' (К). Концентрация олигонуклеотидов – 5 мкМ.

Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение.



K = 5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTATT-3'

TD1 = 5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTAT*-T-3'

Comp = 5'-AATACTTCATAGTCAG-3'

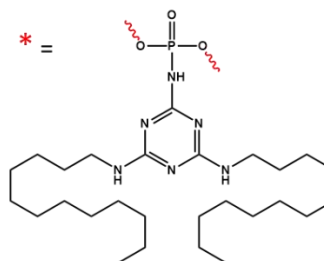


Рис. П5. Электрофоретический профиль реакционных смесей контрольного олигонуклеотида последовательности 5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTATT-3' (K) и модифицированного олигонуклеотида, содержащего триазириламидофосфатную группу со стороны 3'-конца (5'-[FAM]-CTGACTATGAAGTAT*-T-3'), несущую остатки додециламина (TD1), а также их дуплексных форм (K/Comp, TD1/Comp) после обработки нуклеазами цельноклеточных экстрактов клеточных линий HEK293T и T98G.

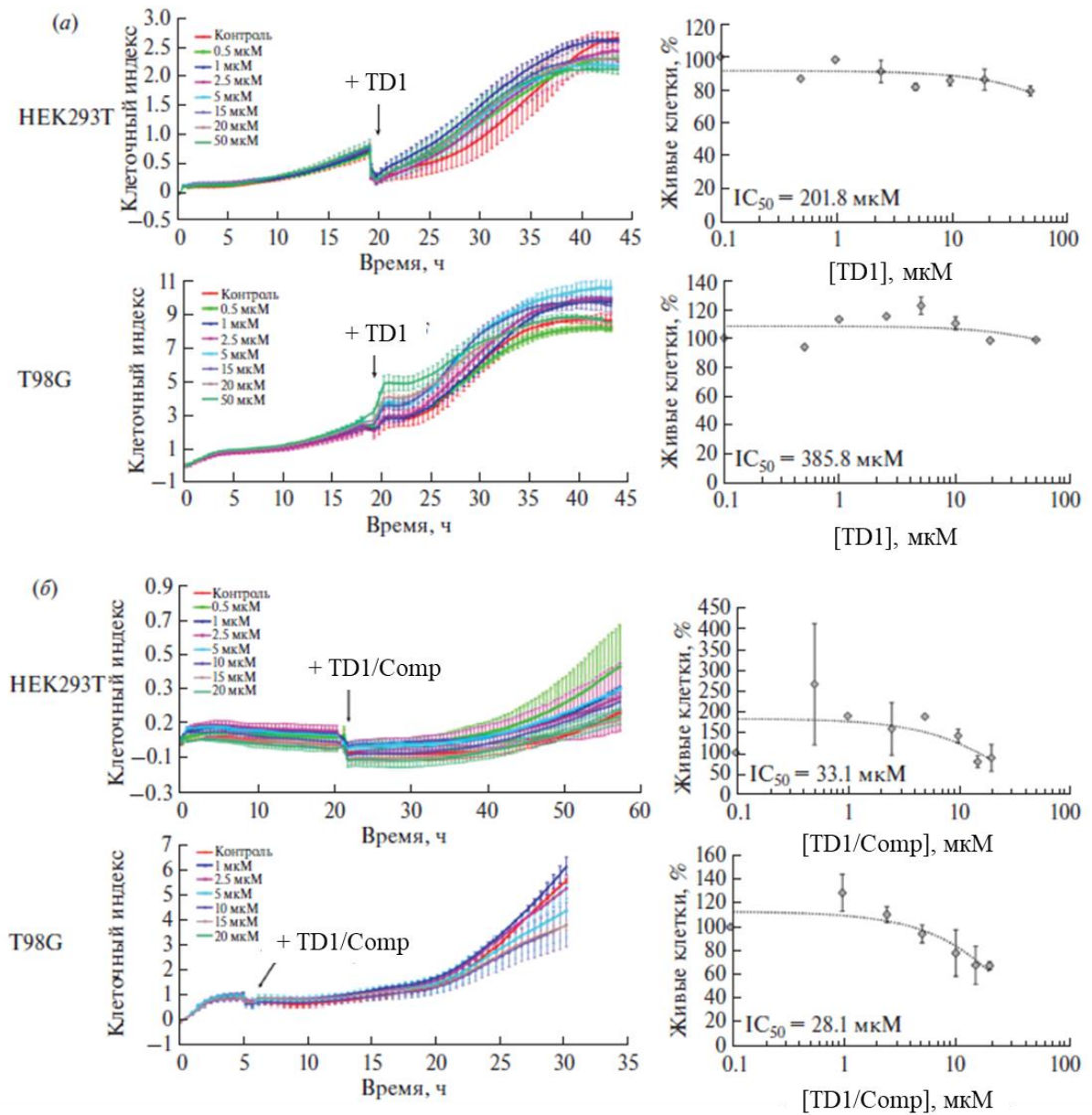


Рис. П6. Концентрационные кривые зависимости клеточного индекса от времени (левая панель) и кривые выживаемости клеток в зависимости от концентраций (правая панель) для модифицированного олигонуклеотида, содержащего триазиламидофосфатную группу со стороны 3'-конца (5'-[FAM]-СТГАСТАТГААГТАТ*Т-3'), несущую остатки додециламина (TD1) (а), и дуплекса этого олигонуклеотида (TD1/Comp) (б), на клетках HEK293Т и Т98G.