

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

На правах рукописи



МЕЩАНИНОВА МАРИЯ ИВАНОВНА

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

1.4.9 – биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Новосибирск – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д. Г. Кнорре СО РАН

Научный консультант:

Пышный Дмитрий Владимирович, д.х.н., член-корр. РАН,
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», ректор.

Официальные оппоненты:

Волчо Константин Петрович, д.х.н., профессор РАН
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Новосибирский институт органической химии имени Н.Н. Ворожцова СО РАН, главный научный сотрудник.

Варижук Анна Михайловна, д.х.н.
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», зав. лабораторией.

Гарафутдинов Равиль Ринатович, д.х.н.
Институт биохимии и генетики — обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра РАН, зав. лабораторией.

Защита состоится «25» декабря 2026г. в 12⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ 02.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: Новосибирск 630090, пр-кт акад. Лаврентьева, 8.

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

Автореферат диссертации разослан «_____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, к.х.н



П.Е. Пестряков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Олигонуклеотиды, их аналоги и производные в настоящее время активно используются как инструменты для терапии и диагностики различных микробиологических, паразитарных, вирусных или онкологических заболеваний, анализа пищевых продуктов, различных типов биологических и экологических исследований, а также позволяют решать широкий спектр фундаментальных задач при изучении НК¹-НК и НК-белковых взаимодействий.

Создание терапевтических препаратов на основе олигонуклеотидов является одной из наиболее актуальных задач современной биохимии, молекулярной биологии и фундаментальной медицины. Благодаря своей специфичности, функциональному разнообразию и низкой токсичности терапевтические НК оказываются все более востребованы при создании лекарственных средств (Stein et al., *Mol. Ther.*, 2017; Shen et al., *Nucleic Acids Res.*, 2018; Smith et al., *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 2019; Scharner et al., *Mol. Ther.*, 2021; Bege et al., *Pharmaceuticals*, 2022; de la Torre et al., *Molecules*, 2023; Egli et al., *Nucleic Acids Res.*, 2023; Jo et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2023; McDowall et al., *Front. Neurosci.*, 2024; AlShaer et al., *Pharmaceuticals*, 2026). Первым одобренным в мире к применению препаратом на основе химически синтезированного олигонуклеотида в 1998 году стал VitraceneTM, содержащий 21-звенный PS-модифицированный² олигодезоксирибонуклеотид Fomivirsen. Уже через несколько лет, в 2004 году, был одобрен препарат MacugenTM, используемый в офтальмологии для лечения сосудов глаз, в основе которого представитель класса РНК - модифицированный олигорибонуклеотид Pegaptanib – 5'-пегилированный (ПЭГ, ~40кДа) 28-звенный 2'-F/2'-O-Me/2'-ОН/PO/invT-РНК-аптамер. Введение ПЭГ позволяет повысить терапевтический потенциал лекарств за счет увеличения времени их циркуляции в организме, снизить иммуногенность и антигенность препаратов, а также увеличить гидродинамический размер лекарств и снизить их почечный клиренс (Porfiryeva et al., *Polym. Sci. Ser. C*, 2020). Последнее десятилетие ознаменовалось выходом на рынок лекарств еще нескольких препаратов, в основе которых химически синтезированные, модифицированные олигорибонуклеотиды действующие по антисмысловому механизму и по механизму РНК-интерференции (табл. 1). Подавляющая часть препаратов на основе малых интерферирующих РНК (siРНК)

¹ нуклеиновая кислота

² здесь и далее: PS - межнуклеотидная фосфотиоатная связь; PO - стандартная межнуклеотидная фосфодиэфирная связь; 2'-F - атом фтора в 2'-положении рибозы; 2'-O-Me - метильная модификация в 2'-положении рибозы; 2'-O-MOE - метоксиэтильная модификация в 2'-положении рибозы; 2'-ОН - стандартная рибоза; 5mC(5mU) - цитидин(уридин), модифицированный введением метильной группы в С5-положение гетероциклического основания; ПЭГ - полиэтиленгликоль; invT - остаток инвертированного дезокситимидина на 3'-конце олигонуклеотида; dTdT - два остатка дезокситимидина на 3'-конце олигонуклеотида; NH₂ - алифатическая аминогруппа; C18 - алифатическая цепь; GalNAc - остаток N-ацетилгалактозамина, введенный в состав антисмыслового олигонуклеотида (ACO) или siРНК; GalNAc₃ - три остатка N-ацетилгалактозамина, введенные на 3'-конец смысловой цепи siРНК или на 5'-конец ACO-гапмера.

содержат в своем составе *N*-ацетилгалактозамин (GalNAc) – функциональную молекулу (ФМ)³ для направленной доставки олигонуклеотидов (в т.ч. siRNA) в печень.

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

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

Также на рынке присутствует еще 4 препарата, содержащие 21-30-звенные морфолиновые олигонуклеотиды (Exondys51, 2016; Vyondys53, 2019; Viltespo, 2020; Amondys45, 2021), действующие по антисенс механизму (*Bege et al., Pharmaceuticals, 2022*). В 2023 году помимо еще одного препарата на основе РНК-аптамера для терапии возрастной макулодистрофии (Avacincaptad pegol, IzervayTM - 5'-пегилированный 39-звенный 2'-F/2'-O-Me/2'-OH/PO/invT) был одобрен к применению препарат Casgevy, работающий на системе редактирования генов CRISPR и представляющий собой первую генную терапию для лечения серповидно-клеточной анемии (*Singh et al., Ann Med Surg (Lond). 2024; Cronin et al., Front. Pharmacol., 2025*).

Суммируя приведенные данные, можно сказать, что в олигонуклеотидных препаратах для терапии различных заболеваний пока лидируют технологии с использованием АСО или siPHK, а в качестве действующего вещества в основном используют 2'-модифицированные PO/PS-содержащие аналоги олигорибонуклеотидов длиной до 30 оснований и/или их конъюгаты с функциональными молекулами.

³ В работе приняты следующие термины и понятия:
Функциональная молекула (ФМ) – это химическое соединение, обладающее определенными/заданными свойствами, позволяющими ему выполнять специфическую роль в химических, биологических и физических процессах.
Модификация (аналог) – это небольшое структурное изменение нуклеотидного фрагмента, например, замены в рибозном фрагменте, фосфатной группе или гетероциклическом основании, сохраняющее базовую функцию нуклеотида в РНК/ДНК, но влияющее на его стабильность, ферментативное узнавание и др.
Производное – это олигонуклеотид с введенной реакционноспособной группой, предназначенной для дальнейших химических превращений и способной участвовать в реакциях конъюгации, либо содержащий флуорофоры (красители/тушители) для визуализации/отслеживания.
Конъюгат – это молекулярная конструкция, которая состоит из НК (олигонуклеотида) и ФМ.

Другим, из наиболее значимых, применений олигонуклеотидов в области диагностики вот уже более 40 лет является ПЦР-анализ (американский биохимик Kary Mullis предложил метод ПЦР в 1983 году, первая научная публикация, касающаяся использования метода на практике, появилась в 1985 году в журнале *Science* (Saiki et al., *Science*, 1985)), в рамках которого синтетические фрагменты ДНК используются в качестве праймеров-затравок. В настоящее время эта рутинная процедура крайне востребована во многих отраслях: здравоохранение, пищевая промышленность, ветеринария, сельское хозяйство, судебно-медицинская экспертиза, экология, археология, и многие другие сферы деятельности человека.

Диагностический потенциал олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов с каждым годом раскрывается все больше, например: включение LNA-звеньев⁴ в состав олигонуклеотидных праймеров повышает прочность связывания с матрицей и специфичность для амплификации ДНК (Ballantyne et al., *Genomics*, 2008); разработка технологии олигорибонуклеотидной интерференционной ПЦР, в которой короткая РНК гибридизуется с комплементарной последовательностью ДНК для ингибирования ПЦР-амплификации в конкретной последовательности-мишени (Shimizu et al., *Biol. Methods Protoc.*, 2022); создание уникальных аналитических систем, основанных на структурных особенностях аптамеров, для определения бактериальных патогенов, низкомолекулярных соединений, белковых мишеней, в том числе маркеров различных заболеваний (напр., микотоксины, антибиотики, пестициды, лекарственные препараты, иммуноглобулин Е, тромбоцитарный фактор роста, фактор некроза опухоли и др.) (Kaur et al., *Theranostics*, 2018; Davydova et al., *Biomedicines*, 2022).

Активное развитие исследований в области регуляции экспрессии генов с использованием аналогов микроРНК или siРНК по механизму РНК-интерференции, открытие CRISPR/Cas-зависимой технологии редактирования генома с помощью гидовой РНК, а также возросший интерес к аптамерам, как компонентам систем доставки и распознавания молекул-мишеней, требуют получения разнообразных синтетических фрагментов (нативных и модифицированных) РНК длиной от примерно 20 до 100 и более нуклеотидов (Panigaj et al., *ACS Nano*, 2019; Bajan et al., *Cells*, 2020; Sauvagère et al., *Genes*, 2023; Ahn et al., *Exp. Mol. Med.*, 2023). Введение ФМ, как правило, представляющих собой низкомолекулярные соединения различной природы, в заданные положения олигонуклеотидной цепи – конъюгирование биомолекул с олигонуклеотидами – позволяет улучшить физико-химические, биохимические, фармако-кинетические свойства последних, то есть направленным образом изменить функциональность синтезируемых фрагментов ДНК или РНК (Chernikov et al., *Front Pharmacol.*, 2019; Benizri et al., *Bioconj. Chem.*, 2019; Hawner et al., *Molecules*, 2020; Zhang et al., *Chem. Rev.*, 2021; Hall, *RNA*, 2023; Ali Zaidi et al., *J Nanobiotechnol.*, 2023; Belgrad et al., *Nucleic Acid Ther.*, 2024; Anand et al., *J. Med. Chem.*, 2025).

⁴ LNA – замкнутые нуклеиновые кислоты на основе бициклических сахаров, Locked Nucleic Acids

В настоящее время для синтеза олигонуклеотидов различных типов применяют твердофазный фосфитамидный метод, представляющий собой автоматизированный процесс с использованием специальных "строительных блоков" (фосфитамидов и носителей (твердых подложек для синтеза)) и вспомогательных реагентов. Синтетический цикл для присоединения каждого из нуклеотидов, их аналогов и производных, а также внутрицепочечных нуклеотидных звеньев различной природы состоит из четырех основных стадий (детритилирование, конденсация, экпирование, окисление) и повторяется циклично до получения целевой последовательности. На рынке синтетических олигонуклеотидов действует большое число отечественных компаний (например, <https://ru.lumiprobe.com/>, <https://evrogen.ru/>, <https://www.syntol.ru/>), предлагающих функционализированные фрагменты ДНК длиной примерно до 150 нуклеотидов. В то же время синтез олигорибонуклеотидов менее распространен, поскольку получение протяженных последовательностей, особенно с введением специфических модификаций или функциональных молекул, остается сложной и дорогостоящей задачей, за решение которой берется ограниченное число исполнителей.

Для получения производных олигонуклеотидов и/или их конъюгатов с различными ФМ выделяют два подхода – *пресинтетический* и *постсинтетический* (Singh et al., Chem. Soc. Rev., 2010; Bartosik et al., Molecules, 2020; Ito et al., Chem Rec., 2022).

Основным преимуществом *пресинтетического* подхода, основанного на использовании ФМ-содержащего фосфитамида/носителя (нуклеотидной или нуклеотидной природы), является возможность непосредственного "встраивания" ФМ в структуру олигонуклеотидной цепи в заданное положение в ходе стандартного автоматического синтеза. Однако такие (коммерческие) модифицированные фосфитамиды или носители, как правило, имеют высокую стоимость и их набор ограничен – флуоресцентные красители, остатки холестерина, α -токоферола, пирена, биотина (например, <https://ru.lumiprobe.com> или <https://www.glenresearch.com>). При синтезе фосфитамида или носителя, содержащих требуемую ФМ, в условиях лаборатории необходимо учесть ее совместимость с реагентами синтетического цикла автоматического синтеза (растворимость, инертность к ангидридам, окисляющему и детритилирующему агентам), а также стабильность в условиях финального деблокирования целевого конъюгата. Тем не менее, учитывая особенности стандартных обработок в рамках синтетического цикла и химическую устойчивость вводимых в олигонуклеотиды остатков ФМ в настоящее время есть возможность получения широчайшего спектра производных ДНК и РНК в рамках *пресинтетического* подхода.

Постсинтетический подход оправдан, когда вводимая ФМ несовместима с химией синтетического цикла или финального деблокирования, и подразумевает введение как в олигонуклеотид, так и в ФМ реакционноспособных групп, селективно взаимодействующих друг с другом в определенных условиях ("клик"-реакция, тиол-малеимидная конденсация, реакция Соногаширы и др.). Примерами таких групп являются карбоксильная, гидроксильная, альдегидная, аминная, гидразидная, азидная,

алкинильная, фосфатная, фосфитная, а также атом галогена – они должны быть инертны в ходе автоматического синтеза или защищены. В последнем случае их деблокирование может происходить либо отдельно, либо одновременно с удалением всех защитных групп с олигонуклеотида на финальном этапе синтетического процесса, что позволяет выбрать оптимальную для исследователя стратегию введения ФМ (*Beaucage et al., Tetrahedron*, 1993; *Winkler et al., Ther. Deliv.* 2013). Описанный *постсинтетический* подход можно разделить на два варианта: "на твердой фазе" и "в растворе". Последний предполагает введение ФМ в полностью деблокированный олигонуклеотид, что может ограничивать природу вводимого остатка, поскольку: олигонуклеотиды ограниченно растворимы в органических растворителях; некоторые ФМ (например, холестерин и другие липофильные соединения) ограниченно растворимы в водно-органических смесях; требуется, как правило, использование минимальных избытков вводимых ФМ; возникает сложность отделения конъюгата от непрореагировавшей ФМ и возможных катализаторов или активаторов реакции. Таким образом, в каждом случае приходится подбирать индивидуальные условия: растворители, соотношения и способ удаления избытков реагентов и т.д. Преимуществом является возможность полной очистки и характеристики компонентов перед конъюгированием. Вариант *постсинтетического* подхода "на твердой фазе" также накладывает свои ограничения на структуру вводимой ФМ – она должна быть стабильна в условиях присоединения к олигонуклеотиду и в условиях его финального деблокирования. И этот вариант обладает рядом преимуществ: использование различных растворителей, включая водно-органические среды, а также любые избытки ФМ, удаление непрореагировавших компонентов и возможных побочных продуктов простой промывкой твердого носителя, к которому прикреплен олигонуклеотид. В отдельную задачу можно выделить получение конъюгатов олигонуклеотидов, в которых ФМ и олигонуклеотид соединены посредством стимул-чувствительных связей (например, дисульфидная, кислотолabile, ацетальная, оксимная, ортоэфирная и др.).

Резюмируя данные по получению синтетических НК и их производных/конъюгатов, стоит отметить, что оптимизация синтеза олигонуклеотидов является нетривиальной и актуальной задачей, решение которой объективно отвечает современным запросам биоорганической химии, среди которых необходимость создания протяженных олигомеров, их модифицированных аналогов и производных/конъюгатов. Несмотря на большое разнообразие *пре-* и *постсинтетических* подходов и методов, предложенных для получения конъюгатов олигонуклеотидов различными научными группами (*Winkler et al., Ther. Deliv.* 2013; *Bartosik et al., Molecules*, 2020; *Watson et al., Biomolecules*, 2022; *Tran et al., Pharmaceutics*, 2022; *Anwar et al., Pharmaceutics*, 2023; *Fàbrega et al., Pharmaceutics*, 2023), разработка новых универсальных подходов к ковалентному конъюгированию олигонуклеотидов с биомолекулами, направленных на сокращение временных, трудовых и материальных затрат, требует своего развития.

Цель и задачи исследования

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

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

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

Научная новизна и практическая значимость работы

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

Разработанные для отечественного синтезатора ASM-800/800E протоколы синтеза имеют потенциал и могут быть востребованы в рамках реализации политики импортозамещения. Тесное сотрудничество с единственным на национальном рынке производителем синтезаторов для получения нативных, модифицированных, а также гибридных НК-фрагментов позволяет обеспечить технологическую независимость и лидерство в научной и научно-практической сферах. Предложенные в работе твердофазные методы конъюгирования достаточно просты в исполнении и эффективны, не требуют использования "сложных" реакционных схем и процессов (например, специфических катализаторов, уникальных реагентов и синтонов) или экзотических условий проведения реакций. Они значимо расширяют возможности и практичность синтеза

конъюгатов ДНК и РНК, используя преимущества твердофазного метода: непрореагировавшие реагенты и возможные побочные продукты реакции на всех стадиях можно легко отделять путем промывок, поскольку в процессе синтеза конъюгат все время присоединен к носителю; возможность использования большого набора растворителей, в том числе варьирование соотношения водной и органической фаз в широких пределах. Подходы не требуют предварительных многостадийных синтезов для модификации вводимых биологически активных молекул, поскольку, зачастую, эти биомолекулы коммерчески доступны и содержат в своем составе гидроксильную или аминогруппу, которая может быть непосредственно использована для конъюгирования по одному из разработанных в работе методов и подходов. Предложенные синтетические протоколы позволяют: из одного олигонуклеотида-предшественника синтезировать серию олигомеров, отличающихся строением (длиной и структурой) как линкерного звена, так и вводимых ФМ; получать конъюгаты олигонуклеотидов, содержащие схожие по структуре, но отличающиеся по стабильности связи, соединяющие олигонуклеотид и ФМ, что во многом определяет эффективность их практического применения. Кроме того, предложенные подходы в сочетании с широким спектром коммерческих модификаторов для олигонуклеотидного синтеза уже содержащих ФМ или реакционный центр, инертный в ходе синтеза, но способный к дальнейшей постфункционализации, позволяют создавать мультифункционализированные конструкции, несущие несколько биологически значимых остатков нуклеозидной природы. В этом случае можно реализовать гибкую стратегию их получения, основанную либо на разнесении реакций модификации по этапам синтеза олигомера (сочетание пре- и постсинтетического подходов), либо на использовании комплексной постсинтетической стратегии (сочетание нескольких вариантов реакционноспособных групп).

Основные положения, выносимые на защиту

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

1. Протоколы, обеспечивающие в рамках разового запуска синтезатора ASM-800/800E получение как набора (до 8 вариантов) олигонуклеотидов в аналитическом количестве (до 0.05 микромоль каждого), так и семипрепаративного количества (до 0.5 микромоль) одной последовательности нативной/модифицированной РНК длиной до 100 и более нуклеотидов (каталитические НК, аптамеры, малые интерферирующие РНК, микроРНК, гидовые РНК, антисмысловые олигонуклеотиды и др.). Разработанные протоколы обеспечивают получение олигонуклеотидов с эффективностью до 99 % на каждый синтетический цикл автоматического синтеза в зависимости от длины и нуклеотидного состава последовательности.
2. Протокол гибридного твердофазного синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, сочетающий использование новых типов Н-фосфонатных синтонов на основе

гидроксилсодержащих функциональных молекул и стандартных амидофосфитных мономеров.

3. Подход к твердофазной конъюгации биомолекул, содержащих алифатическую аминогруппу, с олигонуклеотидом посредством сукцинилкарбаматной активации 5'-гидроксильной группы носитель-связанного олигонуклеотида.
4. Твердофазный вариант получения 5'-конъюгатов, в которых олигонуклеотид и аминоксодержащие биомолекулы различной природы соединены фосфамидной связью, способной к гидролизу при умеренно кислых pH (в диапазоне 4.5-6.0).
5. Твердофазный метод синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих гидразоновый фрагмент, обеспечивающий в структуре целевого продукта наличие кислоталабильной азометиновой связи. Последующее использование восстанавливающих агентов позволяет получать стабильный аналог целевого 5'-конъюгата олигонуклеотида без изменения его функциональности.
6. Разработанные подходы к твердофазному 5'-конъюгированию позволяют функционализировать олигонуклеотиды любых типов и длины биомолекулами различной структуры, с конверсией реакции конъюгации близкой к количественной.

Публикации и апробация работы

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

Личный вклад автора

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

Запись ЯМР-спектров и характеристика малых молекул и их производных проведены в ЦКП НИОХ СО РАН; LC-ESI- и MALDI-TOF-спектры производных органических соединений, а также олигонуклеотидов и их конъюгатов записаны в ОЦКП ИХБФМ СО РАН.

Благодарности

Автор посвящает эту работу памяти Веняминовой Алии Гусейновны, руководителя и наставника.

Автор выражает глубокую признательность своему научному консультанту, член-корр. РАН, д.х.н. Пышному Дмитрию Владимировичу за всестороннюю поддержку и помощь при написании диссертационной работы. Автор сердечно благодарит за поддержку своих коллег из Лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН, а также коллег из многих лабораторий ИХБФМ и других институтов за тесное сотрудничество.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, списка сокращений, трех глав (обзор литературы, результаты и обсуждение, материалы и методы), заключения, выводов, списка цитированной литературы. Материал работы изложен на 231 странице машинописного текста (12 шрифт, интервал 1.5) и содержит 112 рисунков, 11 таблиц. Библиография включает 547 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

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

Как уже упоминалось выше, для синтеза олигонуклеотидов различных типов в настоящее время используют автоматический твердофазный фосфитамидный метод синтеза с использованием ДНК/РНК синтезаторов⁵, предлагаемых различными фирмами. Несмотря на разницу в конструкциях, синтез, как правило, протекает в направлении от 3'- к 5'-концу олигонуклеотидной цепи и синтетический цикл для присоединения одного нуклеотидного звена состоит из четырех последовательных стадий - детритилирование, конденсация, кэпирование, окисление (рис. 1.1). Синтез проводят в колонке (реакторе) – полом цилиндра с двух сторон закрытом фильтрами, содержащем внутри ненабухающие или слабонабухающие твердые носители (ТН). В качестве таковых наиболее часто используют стекло с контролируемым размером пор или макропористый полистирол. Носители с порами размером 500 Å (50 нм) механически прочны и обычно используются при синтезе коротких олигонуклеотидов. При синтезе олигонуклеотидов длиной более 40-50 нт на носителях такого типа, выходы целевого продукта снижаются, поскольку растущая олигонуклеотидная цепь уменьшает диффузию реагентов через матрицу. Хотя носители с большими порами более хрупкие, ТН размером 1000 Å рекомендуют для синтеза олигонуклеотидов длиной до 100 оснований, а для более протяженных олигонуклеотидов рекомендовано использование ТН размером 2000 Å. Максимальный теоретический выход (Y) целевого олигонуклеотида после автоматического синтеза без учета процедуры очистки рассчитывается по формуле $Y = (\text{Эф.с.ц})^{n-1} \cdot 100$, где Эф.с.ц – эффективность синтетического цикла для каждого присоединенного нуклеотида, n - длина олигонуклеотида (табл. 1.1).

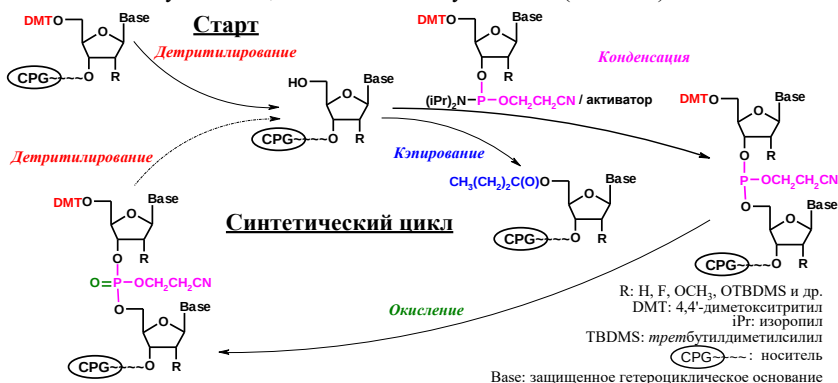


Рисунок 1.1. Общая схема синтетического цикла автоматического твердофазного фосфитамидного метода синтеза.

⁵ MerMade™ (<https://shop.biosearchtech.com/nucleic-acid-chemistry-reagents-and-instruments/dna-and-rna-synthesis/dna-and-rna-oligonucleotide-synthesizers/c/dna-rna-oligonucleotide-synthesizers>), Bio-Oligo™ (<https://www.jshannon.com/products/oligo-synthesizer/>), PolyGen™ (<https://polygen.de/>), Dr. Oligo™ (<https://www.biolytic.com/c-699-oligo-synthesizers.aspx>), ÄKTA oligopilot™/oligosynt™ (<https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/oligonucleotide-synthesis/synthesizers?sort=NameAsc&chunk=1>), ASM 800/2000™ (<https://biosset.com/services/sintezatory-dnk-rnk/>).

Таблица 1.1. Максимальный выход (Y) олигонуклеотида (теоретически, в %) без учета процедуры очистки в зависимости от эффективности синтетического цикла и длины олигомера						Например, при синтезе 20-звенного олигомера с эффективностью присоединения каждого нуклеотидного звена 95%, максимальный выход без учета процедуры очистки составит $Y=(0,95)^{19} \cdot 100=37,7\%$.
Эффективность	95%	97%	98%	99%	99,5%	
Длина						
10 звеньев	63,0%	76,0%	83,4%	91,3%	95,6%	
20 звеньев	37,7%	56,1%	68,1%	82,6%	90,9%	
50 звеньев	8,1%	22,5%	37,2%	61,1%	78,2%	
100 звеньев	0,6%	4,9%	13,5%	37,0%	60,9%	

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

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

К химическим аспектам можно отнести как "активность" в соответствующих реакциях используемых реагентов, так и сочетание химических группировок на каждой стадии синтеза. 1) Олигомеры *дезоксирibo*-ряда, в отличие от *риbo*-ряда, требуют более тщательной оптимизации условий детритилирования (природа кислоты, ее концентрация, продолжительность этапа) из-за повышенной вероятности апуринизации растущей цепи ДНК. 2) На синтез в целом значительно влияет выбор активирующего агента – в качестве таковых предложены 4,5-дицианоимидазол (DCI, pKa ~ 5.2) или 1H-тетразол (Tetr, pKa ~ 4.9) и его производные (5-этилтио-1H-тетразол (EtSTetr, pKa ~ 4.3), бензил-1H-тетразол (BTT, pKa ~ 4.1), 5-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1H-тетразол (Activator 42TM, pKa ~ 3.4)), так как от природы активатора существенно зависит эффективность и время реакции конденсации (Wincott *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 1995; Sack *et al.*, *J. Nanobiotechnol.*, 2016). Выбирая активирующий агент и его концентрацию, следует учитывать, что в процессе конденсации может происходить частичное отщепление диметокситритильной группы с вновь присоединяемого мономерного звена из-за

активатора кислотного типа и, как следствие этого, накопление более длинных олигомерных побочных продуктов ($n+1$ и более) (Krotz et al., *Tetrahedron Lett.*, 1997). 3) При синтезе целевого олигонуклеотида (с длиной n) существует вероятность образования укороченных последовательностей (олигомеры с длиной $n-1$, $n-2$ и т.д.), как правило, неомогенные по составу и являющиеся статистическим набором всех возможных $n-1$, $n-2$ и т.д. олигомеров. Вероятность тем выше, чем ниже эффективность этапа(ов) конденсации и/или экпирования. 4) В случае неполного окисления межнуклеозидный фосфиттриэфир деградирует под действием кислоты в условиях удаления диметокситритильной группы, что также может приводить к падению выхода целевого олигомера. 5) Немаловажное значение играет качество используемых в синтезе растворителей и реактивов и надежность обеспечения безводной среды на большей части синтетических этапов. 6) При получении олигомеров *рибо*-ряда следует учитывать главное отличие РНК от ДНК, значительно влияющее на их химический синтез - наличие защищенной 2'-гидроксильной группы в составе рибозы. Важным фактором при выборе подходящей 2'-защитной группы является стерическое влияние, которое она оказывает на амидофосфитный фрагмент в 3'-положении. Наиболее распространенным вариантом защиты 2'-ОН группы при синтезе РНК является объемная *трет*-бутилдиметилсилильная (TBDMS) защитная группа (Ogilvie et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1977). Для синтеза протяженных олигорибонуклеотидов были предложены рибофосфитамиды, содержащие менее стерически затрудненные триизопропилсилилоксиметильную (ТОМ), бис(2-ацетоксизетокси)метильную (АСЕ), 1,1-диоксо-1λ(6)-тиоморфолин-4-карботионатную (ТС), цианоэтоксиметильную (СЕМ), пивалоилоксиметильную (PivOM), ацеталь-левулиновую (АЛЕ) защитные группы (например, Pitsch et al., *US5986084A*, 1999; Basila et al., *PLoS One*, 2017; Ryan et al., *Nucleic Acids Res.*, 2018; Lyu et al., *Nucleic Acids Res.*, 2026), что снижает стерическую нагрузку на соседнюю фосфорамидитную группировку на стадии конденсации. Однако фосфитамиды с такими защитами более дорогостоящи, а часть коммерчески не доступна.

В настоящем исследовании оптимизацию условий автоматического фосфитамидного синтеза олигорибонуклеотидов длиной до 100 и более звеньев проводили в масштабе 0.4 мкмоль (объем колонки 50 мкл) для отечественного восьмиколонного синтезатора ASM-800/ASM-800E ("Биоссет", Новосибирск, Россия) с использованием 2'-*O*-TBDMS-защищенных рибонуклеозид-фосфитамидов и носителей CPG-500 (стекло с контролируемым размером пор), как широко представленных коммерчески и финансово доступных. Для оценки рациональности (коммерческая и количественная составляющие) использования альтернативных носителей для синтеза протяженных олигонуклеотидов был взят CPG-1000. Для получения структурных аналогов РНК в работе также были использованы 2'-дезокси-, 2'-*O*-Me-, 2'-F- и LNA рибонуклеозид-фосфитамиды. За основу протокола операций автоматического фосфитамидного синтеза олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов была взята базовая управляющая программа по синтезу олигорибонуклетидов для масштаба 0.4 мкмоль, входящая в

комплект поставки ASM-800. Изменению подвергали параметры, соответствующие временам, объемам, скоростям и способам подачи значимых реактивов для каждой из четырех стадий. Объемы, скорости и времена для промывки колонок (реакторов) и каналов жидкостной системы между стадиями, а также для предварительного заполнения каналов от емкостей до смесителя растворами значимых реактивов оставляли без изменений, поскольку данные параметры подобраны производителем синтезатора с учетом его конструкторских особенностей. Была проведена оценка влияния качества используемых растворителей на эффективность синтеза.

В ходе экспериментов было показано:

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

- *растворители* – Растворители перед использованием должны быть выдержаны над ситами не менее двух суток. Ацетонитрил, используемый для растворения активатора и фосфитаминов, должен быть перегнан над P₂O₅ и выдержан сутки над гидридом кальция. Для дополнительного осушения полученных растворов в емкости W1, W2, CpB, a, c, g, t, Act необходимо добавлять молекулярные сита (Molecular Serve, 3Å).

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

- *стадия конденсации* – В ходе исследования в качестве активатора были взяты 5-этилтио-1Н-тетразол (EtSTetr, pK_a ~ 4.3) и 5-(3,5-бис(трифторметил)фенил)-1Н-тетразол (Activator 42TM, pK_a ~ 3.4). Показано, что использование EtSTetr позволяет эффективно синтезировать олигорибонуклеотиды длиной до 80-ти звеньев (концентрация 5-этилтио-1Н-тетразола составляла 0.25 М, для дезокси- и 2'-О-метилрибонуклеозидфосфитаминов - 0.05 М (время конденсации 300 сек), для 2'-О-TBDMS-, 2'-F- и LNA рибонуклеозидфосфитаминов - 0.1 М (время конденсации 600 сек)). Увеличение концентрации EtSTetr до 0.4 М и фосфитаминов до 0.15 М позволяет провести присоединение ("дошивку") еще 20 звеньев (синтез до 100 звеньев), однако заметно стабильное падение эффективности конденсации при мониторинге по диметокситритилкатиону (для модели ASM-800E). При синтезе олигорибонуклеотидов и их 2'-аналогов длиной до 40 нуклеотидов допускается использование растворов рибофосфитаминов в концентрации 0.075 М без потери в эффективности синтеза. Использование Activator 42 дает возможность не только стабильно получать фрагменты РНК длиной до 100 и более звеньев (рис. 1.2, панель Г), но и сократить, и унифицировать время стадии конденсации (общее время конденсации для

2'-O-TBDMS-, 2'-O-Me-, 2'-F- и LNA рибонуклеозидфосфитамидов – 360 сек, концентрация 0.1 М), равно как и допускается использование растворов рибофосфитамидов в концентрации 0.075 М при синтеза олигомеров длиной до 70 нуклеотидов. Если олигонуклеотидная последовательность содержит дезоксирибо-звенья, то в качестве активирующего реагента можно использовать только 5-этилтио-1Н-тетразол.

- *стадия кэпирования* – В качестве кэпирующих реагентов были использованы смеси, содержащие пропионовый ангидрид, 2,6-лутидин и 1-метилимидазол. Унифицированное время кэпирования при синтезе олигонуклеотида любой длины составило 110 сек.

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

В качестве защитных групп экзоциклических аминоконфунций гетероциклических оснований аденина, гуанина и цитозина при использовании реагентов, входящих в разработанные протоколы, показано использование бензоильной (bz), изобутирильной (ibu), ацетильной (ac) или диметилформамидиновой (dmf) группировок. Следует учитывать, что при использовании dmf-защиты для аминоконфунций гуанозина, концентрация окисляющего реагента не должна превышать 0.02М, в противном случае на стадии окисления может образовываться до 20 % *N*-2-цианопродукта гуанозина (Mullah et al., *Tetrahedron Letters*, 1995). Использование Ultra Mild защитных групп (феноксиацетильная (PAC), 4-изопропилфеноксиацетильная (iPr-PAC)) нецелесообразно из-за их частичной замены на остаток пропионного ангидрида на стадии кэпирования (для фосфитамидов с Ultra Mild защитными группами на стадии кэпирования рекомендован феноксисукусный ангидрид; использование этих реагентов ведет к удорожанию синтеза).

Для отщепления олигонуклеотида (содержащего любые комбинации 2'-дезоксид, 2'-O-TBDMS-, 2'-O-Me-, 2'-F- или LNA-звеньев) от носителя, удаления защитных групп гетероциклических оснований и цианоэтильных защитных групп фосфатов предложенные протоколы допускают использование ряда реагентов, широко описанных в литературе: 40 %-ный водный раствор метиламина или смесь АМА (40 %-ный водный раствор метиламина/30 %-ный водный раствор аммиака, 1/1, v/v) в течении 2 ч при комнатной температуре (к.т.); 30 %-ный водный раствор аммиака 2 сут при к.т.; 0.05М раствор K₂CO₃ в метаноле 16 ч при к.т. (Johnsson et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014). В случае, если в синтезе был использован цитозин, содержащий bz-защитную группу, рекомендованы деблокирующие смеси, не содержащие метиламин, во избежание образования переаминированного цитозина (Reddy et al., *Nucleosides Nucleotides Nucl. Acids*, 1997). Для удаления 2'-O-TBDMS защитных групп в настоящее время широко применяют смесь *N*-метил-2-пирролидинон/(C₂H₅)₃N/(C₂H₅)₃N·3HF (1.5/0.7/1.0) при 65 °С в течении

1.5 ч (Westman et al., Nucl. Acids Res., 1994). Было показано, что для олигорибонуклеотидов длиной более 70-ти звеньев необходимо увеличить в два раза объем используемой десилилирующей смеси и время реакции до 2.0 ч.

На рисунке 1.2 в качестве примера приведены реакционные смеси олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов, полученные с использованием разработанных протоколов.

Предложенные протоколы позволяют получать с одного реактора 0.05 – 0.15 микромоль реакционной смеси с содержанием целевого олигонуклеотида длиной от 10 до 100 звеньев не менее 75 %⁶ независимо от его длины. После препаративного выделения в ПААГ их выходы (в расчете на первое нуклеозидное звено) составили: общие – 10-25 %, на стадию – 85-97 %. Гомогенность подтверждали методом аналитического гель-электрофореза в денатурирующих условиях с последующим подтверждением структуры с помощью LC-ESI- и MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

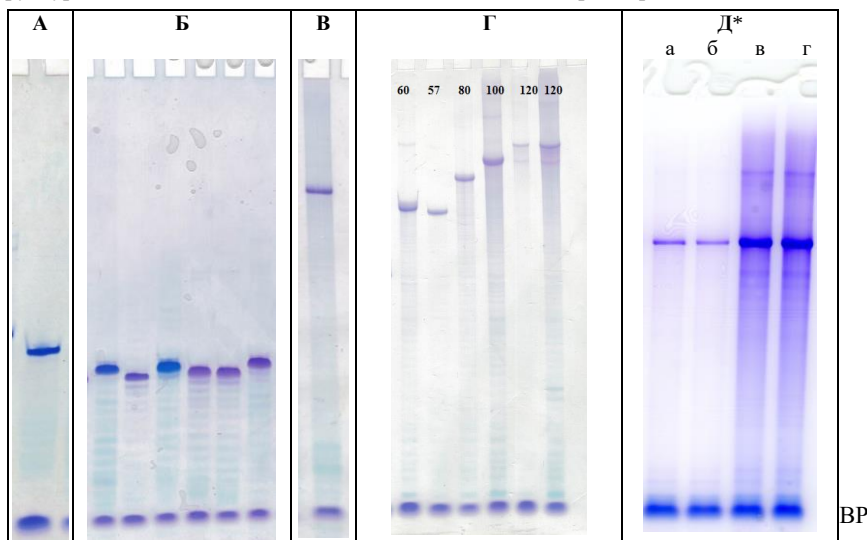


Рисунок 1.2. Анализ реакционных смесей олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов методом гель-электрофореза в 15 %-ном ПААГ в денатурирующих условиях (АА:бисАА 30/1, 7 М мочеви́на, ТБЕ буфер)⁷. Панели: **А** – смешанная 2'-F/2'-ОН/ сенс-цепь siРНК (21 зв.); **Б** – микроРНК смешанного состава (19-23 зв.); **В** – смешанный 2'-F/2'-дезоксид/2'-ОН/ аптамер (87 зв.); **Г** – олигорибонуклеотиды произвольного состава длиной 57, 60, 80, 100 и 120 звеньев; **Д** – гидовая РНК системы CRISPR/Cas9 (103 зв., получена на двух типах CPG-носителей с размером пор 500 Å (а, в) и 1000 Å (б, г)). Сканированные изображения гелей после окрашивания Stains-All. BP – краситель бромфеноловый синий. (*) - 12 %-ный ПААГ (АА:бисАА 30/0,5, 7 М мочеви́на, ТБЕ буфер).

⁶ полуколичественную оценку содержания целевого олигонуклеотида в полученных реакционных смесях проводили по анализу сигналов флуоресценции на электрофореграммах флуоресцентно-меченных олигонуклеотидов или электрофореграммах, визуализированных окрашиванием бромистым этидием; содержание целевого олигонуклеотида определяли, как отношение интенсивности флуоресценции полосы, соответствующей целевой последовательности, к интенсивности всей дорожки.

⁷ здесь и далее: ПААГ – полиакриламидный гель, АА – акриламид, бисАА – *N,N'*-метиленисакриламид, ТБЕ буфер – 89 мМ Трис-Н₃ВО₃, 2 мМ Na₂ЭДТА, рН 8.3.

По разработанным протоколам были получены: нативные и модифицированные малые интерферирующие РНК [2,4-6,8,10,12,13,16,19,20,25-28]⁸; иммуностимулирующие РНК [3,21,24]; антисмысловые олигонуклеотиды [17]; аналоги двухцепочечных РНК [14]; антирепликативные РНК и их структурные аналоги [8,9,23]; синтетические аналоги мРНК [7,15,18,22]; направляющие РНК [8,11]. По разработанным протоколам в лаборатории были синтезированы: нативные и 2'-модифицированные направляющие (sg, sg и tracr) РНК системы CRISPR/Cas9 (*Новопашина и др., RU2020128457A, 2020; Semikolenova et al., Int. J. Mol. Sci., 2021; Sakovina et al., Int. J. Mol. Sci., 2022; Ахметова и др., Биоорган. химия, 2024*); смешанные 2'-F/2'-дезоксид/2'-ОН/ аптамеры, обладающие способностью узнавать аутоантигены, характерные для рассеянного склероза, специфичные к гемоглобину, или способные выступать как агенты для борнейтронзахватной терапии (*Фокина и др., RU2549704C1, 2015; Чаукина и др., RU2644229C1, 2017; Davydova et al., Anal. Biochem., 2019 и 2020; Novopashina, et al., Int. J. Mol. Sci., 2020; Vorobyeva et al., Int. J. Mol. Sci., 2021; Новопашина и др., RU2786533C1, 2022; Novopashina, et al., Int. J. Mol. Sci., 2023*).

2. Разработка новых подходов к высокоэффективному твердофазному синтезу 5'-конъюгатов олигонуклеотидов различных типов с остатками функционально значимых молекул

В представленной работе для получения 5'-конъюгатов олигорибонуклеотидов и их структурных аналогов было использовано два подхода к конъюгированию: *пресинтетический* - использование на последнем синтетическом цикле модифицированного синтона, содержащего целевую ФМ; *постсинтетический* - когда защищенный носитель-связанный олигонуклеотид содержит в своем составе реакционную группу, способную к дальнейшей функционализации уже вне синтетического цикла синтеза. Оба подхода накладывают ограничения на структуру вводимой ФМ (она должна быть стабильна как в условиях присоединения к олигонуклеотиду, так и в условиях его финального деблокирования), но обладают всеми преимуществами твердофазного метода синтеза: позволяют использовать большой набор растворителей, в том числе варьировать в широких пределах соотношение водной и органической фаз; непрореагировавшие реагенты и возможные побочные продукты реакции на всех стадиях можно легко отделять путем промывок, поскольку в процессе синтеза конъюгат все время присоединен к носителю.

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

⁸ здесь и далее в квадратных скобках указаны ссылки на работы, в которых изложены основные результаты данной диссертации, приведенные в конце автореферата.

Холестерин – представитель класса стероидов – выполняет важные структурные и регуляторные функции, входя в состав биомембран и выступая предшественником в синтезе физиологически активных соединений разных классов. Он является наиболее известной биогенной молекулой, которая может усваиваться клеткой и выводиться из нее с помощью естественных клеточных механизмов. Интернализация холестерина в клетки происходит посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза и большая часть холестерина транспортируется по кровотоку в виде сложных эфиров холестерина в форме липидо-белковых частиц, известных как липопротеины низкой плотности (ЛПНП) (Nelson et al., *Int. J. Mol. Sci.* 2022). С ЛПНП и клеточными мембранами также взаимодействуют: литохолевая кислота – представитель класса желчных кислот – ключевых регуляторов системного метаболизма и энергетического обмена организма; α -токоферол (витамин Е) – представитель класса витаминов – является антиоксидантом и антигипоксантом, защищая клеточные и митохондриальные мембраны от окислительного повреждения; эстрон – еще один представитель класса стероидов – помимо участия в регуляции гормонального фона, защищает от сердечно-сосудистых заболеваний и инсультов, способствует укреплению тканей периферических кровеносных сосудов; олеиловый спирт или олеиламин – производные олеиновой кислоты, которая относится к группе омега-9 ненасыщенных жирных кислот – в организме человека липиды омега-9 выполняют энергетическую, противовоспалительную, антипролиферативную, гипотензивную и структурную функции, в частности, участвуют в построении клеточных мембран (Winkler et al., *Ther. Deliv.* 2013; Ma et al., *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2014; Asami et al., *Drug Discov. Ther.*, 2016; Benizri et al., *Bioconjug. Chem.*, 2019; Zagorski et al., *Sovrem. Tehnologii Med.*, 2020; Farag et al., *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, 2022; Santa-Maria et al., *Nutrients*, 2023). В ряде работ было показано, что присоединение короткого пептида трилейцина улучшает внутриклеточную доставку и эндосомальный выход олигонуклеотидов (Ullah et al., *J. Drug Target*, 2017; Singh et al., *Drug Deliv.*, 2018). Анисамид – производное *p*-анисовой кислоты – низкомолекулярная ФМ, перспективная для терапии некоторых заболеваний, таких как гиперлипидемия, диабет, инсульт, рак, ВИЧ-инфекция и другие, за счет своей аффинности к сигма-рецепторам, мембранным белкам эндоплазматического ретикулума, участвующим в регуляции связей между органеллами (Dasargyri et al., *Adv. Mater.*, 2017; Li et al., *J. Mater. Chem. B*, 2017; Hayash, *Front. Neurosci.*, 2019). Фолиевая кислота – витамин, необходимый для роста и развития кровеносной и иммунной систем – является одной из широко используемых ФМ, т.к. способна связываться с клеточными поверхностными фолатными рецепторами с высоким сродством. Рецепторы к этому витамину стали важными молекулярными мишенями для исследований рака, так как они гиперэкспрессируются в различных типах опухолей (Salim et al., *Nucleic Acids Res.*, 2020).

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

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

Как уже отмечалось выше, в настоящее время одним из перспективных подходов к созданию терапевтических препаратов, направленных на подавление экспрессии определенных генов, является подход, основанный на использовании siРНК – медиаторов процесса РНК-интерференции – природного механизма, в ходе которого происходит специфическая деградация мРНК гена-мишени (Corydon *et al.*, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2023; Ahn *et al.*, *Review Exp. Mol. Med.*, 2023). На основе синтетических siРНК можно получить широкий спектр биологически активных веществ, действующих на различные генетические структуры и запускающих процессы, приводящие к «выключению» генов либо изменению генетических программ. С помощью подобных соединений можно подавить функционирование определенных матричных РНК живой клетки, воздействуя на синтез белков, а также защитить клетки от вирусной инфекции. Показано, что конъюгирование siРНК с липофильными соединениями (Hu *et al.*, *Signal Transduct. Target Ther.*, 2020; Zhang *et al.*, *Chem. Rev.*, 2021) увеличивает эффективность их проникновения в клетки за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза или за счет взаимодействия с гидрофобной частью клеточной мембраны. Поэтому при разработке подхода в качестве представителя функциональных НК была выбрана малая интерферирующая РНК, направленная к участку 557-577 мРНК гена множественной лекарственной устойчивости MDR1 (ген множественной лекарственной устойчивости) [26,27]. Этот ген кодирует мембранный белок Р-гликопротеин, отвечающий за перенос многих веществ, таких как липиды, стероиды, пептиды, билирубин и др., через мембрану клетки, и позволяющий регулировать эффективность действия лекарственных препаратов.

Получение 5'-липофильных конъюгатов siРНК можно осуществить твердофазным фосфитамидным методом, вводя остатки липофильных ФМ в виде фосфитамида на последней стадии синтетического цикла сборки олигонуклеотида. Однако возможен и другой вариант получения таких производных, основанный на сочетании методов Н-фосфонатной и фосфитамидной химии. Суть данного подхода состоит в использовании носитель-связанного защищенного олигонуклеотида, синтезированного фосфитамидным методом, и липофильного остатка в виде Н-фосфонатного производного [28]. Преимуществом данного подхода является то, что Н-фосфонаты, в отличие от фосфитамидных мономерных синтонов, являются стабильными, негигроскопичными, устойчивыми к окислению кислородом воздуха соединениями, легко синтезируемыми в препаративных количествах и обладающими высокой реакционной способностью в реакциях конденсации.

Поскольку выбранный *пресинтетический* подход к синтезу 5'-липофильных конъюгатов siРНК основан на введении на последней стадии твердофазного синтеза олигонуклеотидов Н-фосфонатного синтона (рис. 2.1.1), первой задачей стала разработка

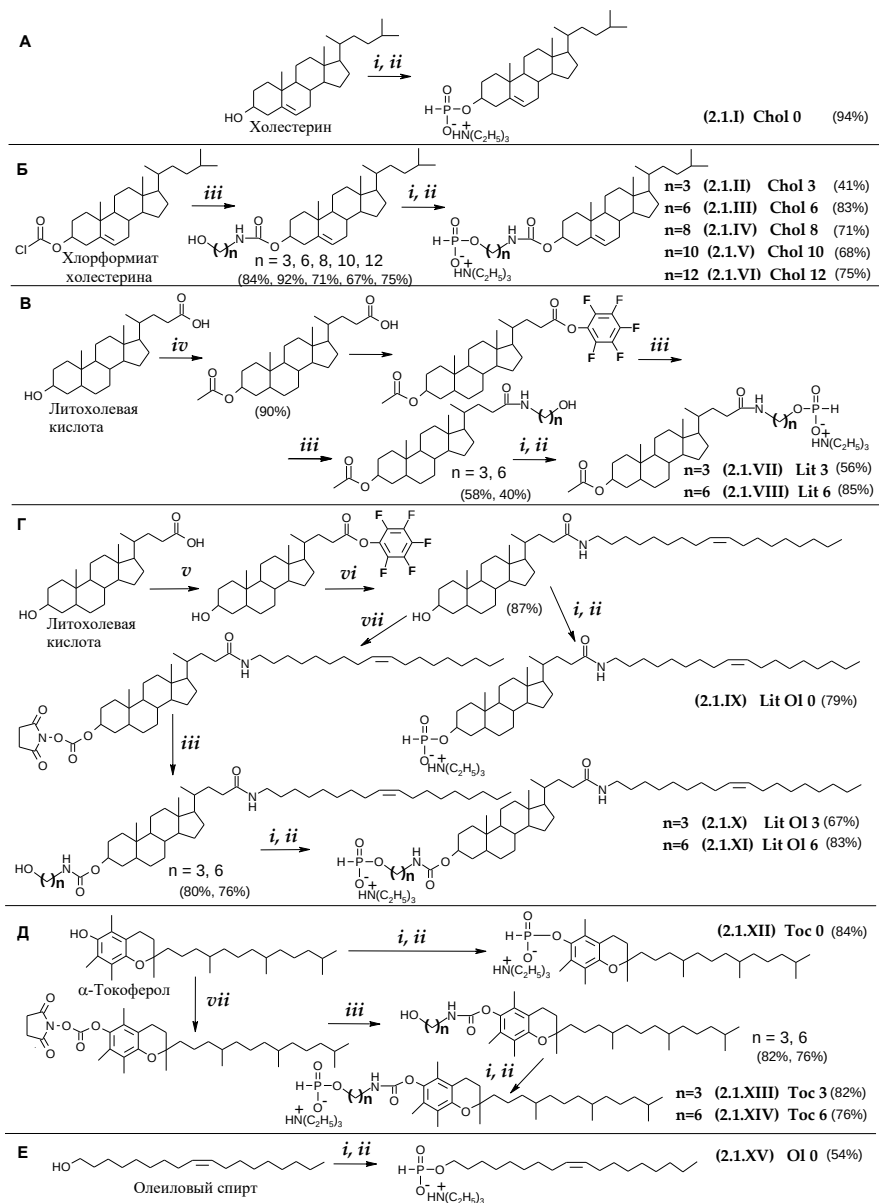


Рисунок 2.1.1. Общая схема синтеза липофильных Н-фосфонатов (2.1.I) - (2.1.XV). Реагенты: *i*) PCl_3 , имидазол, CH_2Cl_2 , CH_3CN , $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$, 0 °C; *ii*) H_2O , комнатная температура (к.т.); *iii*) 3-аминопропан-1-ол/6-аминогексан-1-ол/8-аминооктан-1-ол/10-аминодекан-1-ол/12-аминодodeкан-1-ол, CH_2Cl_2 , $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$, 0 °C, далее к.т.; *iv*) ацетил хлорид, 4-диметиламинопиридин, пиридин, 0 °C, далее к.т.; *v*) N,N' -дициклогексилкарбодинимид, пентафторфенол, CH_2Cl_2 , 0 °C, далее к.т.; *vi*) олеиламин, CH_2Cl_2 , $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$, 0 °C, далее к.т.; *vii*) DSC, CH_2Cl_2 , CH_3CN , $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$, к.т. Выходы соединений на каждой стадии представлены в скобках.

методов синтеза Н-фосфонатов ряда липофильных соединений. В качестве таковых были выбраны стероиды (холестерин (рис. 2.1.1.А, 2.1.1.Б), литохолевая кислота и ее производные (рис. 2.1.1.В, 2.1.1.Г)), олеиловый спирт (рис. 2.1.1.Е) и жирорастворимый витамин α -токоферол и его производные (рис. 2.1.1.Д)). Для последующего изучения влияния длины линкера между липофильным остатком и олигонуклеотидной цепью на эффективность проникновения в клетки и биологическую активность siРНК была поставлена цель в каждом случае (кроме олеилового спирта) создать "линейку" Н-фосфонатов, содержащих линкеры различной длины ("нулевой" линкер и линкеры на основе алифатических аминоспиртов).

Для синтеза Н-фосфонатов **(2.1.I), (2.1.IX), (2.1.XII) и (2.1.XV)** с "нулевым" линкером, холестерин, олеиламид литохолевой кислоты, α -токоферол и олеиловый спирт обрабатывали полученным *in situ* триимидазolidом фосфора, с последующим разложением водой до триэтиламмонийных солей соответствующих производных фосфористой кислоты. Взаимодействие аминоспиртов различной длины с хлорформиаом холестерина приводило к линейке его производных (рис. 2.1.1.Б, стадия *iii*). Активация карбоксильной группы литохолевой кислоты пентафторфенолом позволила провести дальнейшее введение алифатических аминоспиртов (рис. 2.1.1.В, стадия *iii*) или олеиламина (рис. 2.1.1.Г, стадия *vi*). 3 α -Гидроксильную группу олеиламида литохолевой кислоты и гидроксильную группу α -токоферола активировали *N,N'*-дисукцинимидилкарбонатом (DSC) (рис. 2.1.1.Г и 2.1.1.Д, стадия *vii*) и вводили в реакцию с 3-аминопропан-1-олом или 6-аминогексан-1-олом с получением соответствующих производных (рис. 2.1.1.Г и 2.1.1.Д, стадия *iii*). Полученные далее Н-фосфонаты **(2.1.II-2.1.VIII, 2.1.X, 2.1.XI, 2.1.XIII, 2.1.XIV)** выделяли в виде триэтиламмонийных солей. Стрoение целевых и промежуточных соединений было доказано методами ^1H -ЯМР и ^{31}P -ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией.

Ранее Веньяминовой с соавт. (Веньяминова и др., *Биоорган. химия*, 1989) на примере твердофазного 5'-фосфорилирования олигонуклеотидов с помощью β -цианэтил-Н-фосфоната было показано, что в реакциях с моноалкилфосфитом в присутствии пивалоилхлорида можно использовать носитель-связанные защищенные олигонуклеотиды с открытым 5'-гидроксилом, содержащие как Н-фосфонатные межнуклеозидные связи, так и фосфотриэфирные. Также из литературы известно, что введение модификаций на 5'-конец смысловой цепи siРНК не влияет на ее биологическую активность в аспекте РНК направленного действия. Эти данные и послужили основой для разработанного подхода к 5'-конъюгированию.

Для синтеза липофильных конъюгатов смысловой цепи siРНК проводили конденсацию 5'-гидроксильной группы носитель-связанного защищенного олигонуклеотида, синтезированного фосфитамидным методом, с Н-фосфонатом липофильного соединения (**(2.1.I) - (2.1.XV)**) в присутствии конденсирующего реагента с последующим окислением образующейся Н-фосфонатной связи до фосфодизэфирной

(рис. 2.1.2). Показано, что стандартные условия проведения реакций (Веньямина и др., Биоорганическая химия, 1991) обеспечивают количественное встраивание целевой ФМ.

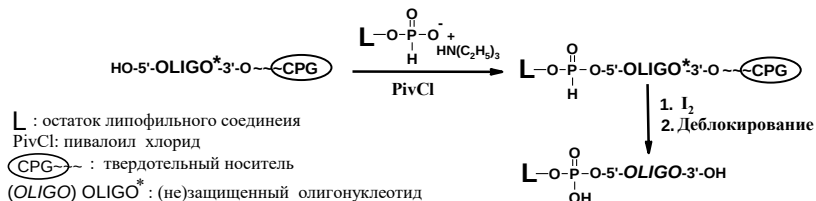


Рисунок 2.1.2. Общая схема синтеза 5'-липофильных конъюгатов олигонуклеотидов, основанная на сочетании методов Н-фосфонатной и фосфитамидной химии. Структуры Н-фосфонатов, использованных для синтеза конъюгатов, представлены на рисунке 2.1.1.

Для отщепления полученных 5'-липофильных конъюгатов олигонуклеотидов от носителя с одновременным деблокированием гетероциклических оснований и межнуклеотидных фосфатов допустимо использование стандартных реагентов (см. раздел 1), во всех этих условиях также происходит деблокирование 3α-гидроксильной группы литохоловой кислоты в случае конъюгатов, полученных с использованием Н-фосфонатов (2.1.VII) и (2.1.VIII) (рис. 2.1.1). В стандартных условиях удаления 2'-O-TBDMS защитных групп (N-метил-2-пирролидинон/(C₂H₅)₃N/(C₂H₅)₃N·3HF (1.5/0.7/1.0), 65 °C, 1.5 ч) ФМ не подвергались деструкции.

Термическая стабильность siРНК является важной характеристикой для их применения. Поэтому было изучено влияние введенных липофильных группировок (на примере линеек конъюгатов с линкерами n=0, 3 и 6) на формирование дуплексов siРНК и их термическую стабильность. Формирование дуплексов siРНК (рис. 2.1.3) проводили в буфере (30 мМ HEPES-КОН (рН 7.4), 100 мМ ацетат калия, 2 мМ ацетат магния) путем нагревания и медленного охлаждения реакционной смеси, содержащей эквимольные количества смысловой и антисмысловой цепей.

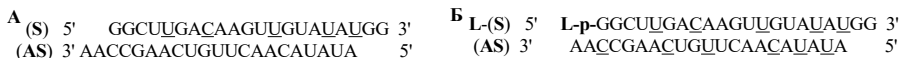


Рисунок 2.1.3. Структуры нативного (А) и модифицированного (Б) дуплекса siРНК. (S) – сенс-цепь, (AS) – антисенс-цепь, L – остаток липофильного соединения (структуры Н-фосфонатов, использованных для синтеза конъюгатов, представлены на рисунке 2.1.1), p – межнуклеотидный фосфат, N – рибонуклеозид, N – 2'-O-метил-рибонуклеозид.

Было изучено влияние остатков ряда липофильных соединений в составе siРНК на стабильность дуплексов [28]. Методом термической денатурации дуплексов были получены кривые плавления комплементарных дуплексов. Температуры плавления исходной siРНК и ее 5'-липофильных конъюгатов соответствовали максимумам графиков первой производной интегральных кривых плавления термической денатурации. Согласно полученным результатам (табл. 2.1.1), введение остатков липофильных соединений посредством фосфодиэфирной связи в 5'-положение

смысловой цепи siРНК приводило к незначительному изменению температуры плавления дуплекса (в пределах $\pm 1^{\circ}\text{C}$).

Таким образом, было показано, что введение остатков липофильных ФМ на 5'-конец смысловой цепи не приводит к дестабилизации дуплекса данной siРНК.

* 30 мМ НЕРЕС-КОН (рН 7.4), 100 мМ ацетат калия, 2 мМ ацетат магния, концентрация сенс и антисенс цепи $1 \cdot 10^{-6}\text{M}$; Cary 300 Bio, “Varian”, Австралия; измерения проведены Ломзовым А.А (ИХБФМ СО РАН)

Таблица 2.1.1. Температуры плавления исходной siРНК и ее 5'-липофильных конъюгатов*	
siРНК	$T_{пл}, ^{\circ}\text{C}$
(S)/(AS)	78.9
Chol 0-(S) / (AS)	78.8
Chol 3-(S) / (AS)	80.0
Chol 6-(S) / (AS)	79.0
Lit 3-(S) / (AS)	79.0
Lit 6-(S) / (AS)	79.0
Lit Ol 0-(S) / (AS)	78.0
Lit Ol 3-(S) / (AS)	78.9
Lit Ol 6-(S) / (AS)	78.0
Toc 0-(S) / (AS)	78.0
Toc 3-(S) / (AS)	79.9
Toc 6-(S) / (AS)	78.6
Ol 0-(S) / (AS)	78.5

В совместных исследованиях с ЛБНК ИХБФМ СО РАН было показано, что такие липофильные конъюгаты siРНК способны проникать в клетки в отсутствие трансфектантов и обеспечить целевой эффект и наиболее эффективной оказалась siРНК состава Chol6-(S)/(AS) [25]. По предложенному методу, для исследования их биологических свойств, были получены 5'-липофильные конъюгаты ряда иммуностимулирующих и малых интерферирующих РНК, их димерных и тримерных форм, а также конкатемерные конструкции на основе антисенс олигонуклеотидов [10,12,13,17,19,21].

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

Как уже отмечалось, при синтезе конъюгатов олигонуклеотидов с различными биоактивными молекулами можно варьировать линкеры, соединяющие их. При этом как длина, так и природа этих линкеров в определенной степени влияют на биологические эффекты конъюгатов. Способность химических связей, соединяющих две молекулярные единицы, разрушаться под действием различных стимулов с высвобождением олигонуклеотида из конъюгата позволяет разрабатывать перспективные лекарственные препараты и диагностические инструменты. Был предложен ряд лабильных линкеров, адаптированных для условий расщепления различными ферментами, электрофильными/кислотными реагентами, восстановителями или окислителями, фотооблучением и пр. (Kanamala et al., *Biomaterials*, 2016; Yang et al., *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.*, 2017; Guo et al., *J. Nanobiotechnol.*, 2018; Eroğlu et al., *J. Drug Target*, 2020; Stasitiska et al., *Bioorg. Chem.* 2020; Aho et al., *Molecules* 2021; Han et al., *Macromol. Res.*, 2021). Конъюгирование терапевтической НК посредством чувствительных к кислоте связей предотвращает разрушение олигонуклеотидных конъюгатов в кровотоке (рН 7.4), а после попадания в клетку-мишень кислотолабильная связь разрушается в компартментах

(эндо)лизосомального пути (pH 5.0–6.0) (Smith et al., *Bioconjug. Chem.*, 2019), освобождая терапевтическую НК для ее специфического действия.

В качестве биodeградируемых кислотолабильных линкеров используются ацетали, кетали, бета-тиопропионаты, оксимы, ортоэфиры, гидразоны и др. (Wolff et al., *Mol. Ther.*, 2008; Stanton et al., *J. Med. Chem.*, 2010; Oumzil et al., *ChemMedChem*, 2015; Movahedi et al., *Nanomedicine*, 2015; Jacques et al., *Org. Biomol. Chem*, 2016; Eroğlu et al., *J. Drug Target*, 2020). Кислотолабильные гидразоны вызывают особый интерес в этом плане, поскольку, варьируя их окружение в составе линкерного звена, можно добиваться максимальной степени их гидролиза при определенных значениях pH. Гидразоны (RX-C=N-N-YR') образуются в результате взаимодействия по механизму присоединения-отщепления карбонильной группы (RX-C=O) с производными гидразина ($\text{NH}_2\text{-NYR'}$), что позволяет разрабатывать эффективные способы синтеза конъюгатов олигонуклеотидов. Следует учитывать, что соединения, содержащие первичную аминогруппу, вступают с гидразонами в реакцию переаминирования (Dirksen et al., *Angew. Chem.*, 2010). Гидразоны гидролизуются при кислых значениях pH, однако, следует отметить, что электронные эффекты окружения (R, R', X, Y) $-\text{CH=N-NH}-$ фрагмента оказывают существенное влияние на эффективность гидролиза азометиновой связи ($-\text{CH=N}-$). Реакция взаимодействия производных гидразинов с карбонильными соединениями достаточно проста и при этом эффективна – продукт образуется при непосредственном смешивании растворов реагентов в «мягких» условиях (West et al., *Curr. Drug Discov. Technol.*, 2005). Также может быть использован целый ряд растворителей, таких как вода и водно-органические смеси, бензол, простые эфиры, диметилформамид, диметилсульфоксид, спирты, часто в систему добавляют каталитические количества кислот. Все это позволяет выбрать систему, не агрессивную по отношению к олигонуклеотиду при проведении реакции конъюгирования.

Как правило, pH-чувствительные конъюгаты олигонуклеотидов, содержащие гидразоновую связь, синтезируют путем взаимодействия между полностью незащищенными альдегидсодержащими олигонуклеотидами и гидразидами малых молекул, антител, пептидов, белков и других (Kachalova et al., *Russ. Chem. Rev.*, 2002; Zatsepin et al., *Bioconjug. Chem.*, 2005). При выборе структур альдегидной и гидразидной компонент были приняты во внимание работы Kratz с соавт. (Kratz et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 1999; Abu Ajaj et al., *Eur. J. Cancer*, 2012; Rodrigues et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 1999, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006), где была изучена гидролитическая стабильность гидразонов на серии модельных веществ. Согласно этим данным, введение алифатического заместителя/линкера в гидразидную компоненту увеличивает стабильность гидразона и затрудняет гидролиз, а в карбонильную компоненту – наоборот. Также природа карбонильного компонента влияет на стабильность гидразона – гидразоны, полученные присоединением альдегидов, стабильнее, чем аналогичные гидразоны, полученные при использовании кетонов. Таким образом, использование ароматического альдегида в качестве карбонильного компонента и неароматического гидразида в качестве

гидразиновой для синтеза гидразона является оптимальным и обеспечивает высокую скорость гидролиза при умеренно кислых рН при хорошей стабильности самого соединения в нейтральных или слабощелочных условиях, а также при хранении.

Гидразонсодержащие конъюгаты олигонуклеотидов можно синтезировать с использованием двух основных подходов, предполагающих автоматический фосфитамидный синтез соответствующих олигонуклеотидов, их 5'-альдегидную модификацию и дальнейшее взаимодействие с гидразидными производными биологически активных соединений (рис. 2.2.1).

Первый способ (рис. 2.2.1, вариант А), вариант синтеза "в растворе", был предложен ранее в лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН (*Dovydenko et al., Biomaterials, 2016*) на примере 5'-холестериновых конъюгатов олигонуклеотидов. Он предполагает удаление с носителя и деблокирование 5'-ацетальдегид-модифицированного олигонуклеотида, снятие ацетальной защиты и последующее проведение в растворе реакции присоединения-отщепления с гидразидным производным вводимой ФМ. Однако значительная гидрофильность олигонуклеотида и, напротив, гидрофобность (особенно в случае липофильных соединений) ФМ требуют тщательного подбора концентраций вводимых в реакцию компонентов и системы растворителей для обеспечения эффективного взаимодействия.

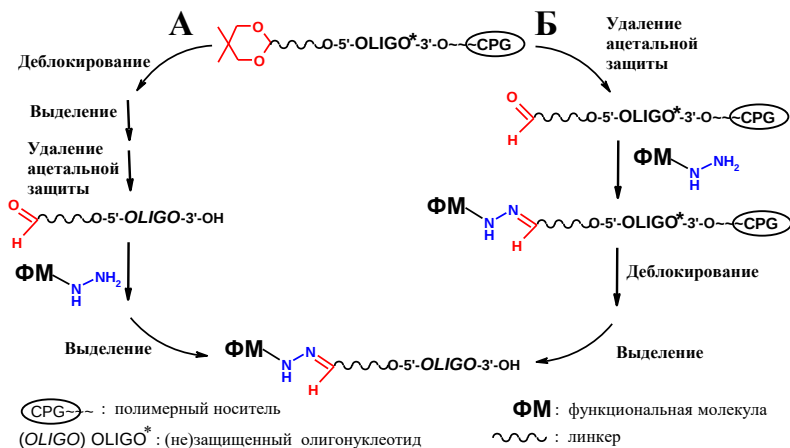


Рисунок 2.2.1. Два подхода к синтезу конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих кислотолabile гидразоновый фрагмент.

Разработанный в ходе описываемого исследования твердофазный вариант синтеза (рис. 2.2.1, вариант Б) подразумевает присоединение гидразидного производного ФМ к носитель-связанному 5'-альдегид-модифицированному защищенному олигонуклеотиду и последующее удаление полученного конъюгата с носителя с дальнейшим его деблокированием [8,9]. Данный способ позволяет варьировать в широких пределах соотношения водно-органической фазы и реагирующих компонентов, а также избежать проведения двойного этапа очистки.

В качестве ФМ были выбраны холестерин и α -токоферол. В качестве исходных соединений были взяты коммерчески доступный хлорформат холестерина и активированное производное α -токоферола, полученное с использованием N,N' -дисуццинимидилкарбоната. Их взаимодействие с 6-аминогексановой кислотой через N,O -бис-триметилсилильный интермедиат приводило к получению производных триметилсилильного эфира 6-аминогексановой кислоты холестерина и α -токоферола, которые легко трансформировались в кислых условиях в карбоксилсодержащие производные. Далее карбоксильные группы переводили в метиловые эфиры действием трихлорида фосфора в метаноле, с последующим взаимодействием полученных соединений с гидразин моногидратом с получением целевых гидразидов холестерина и α -токоферола. Все реакции проходили с хорошими выходами (не ниже 80%), продукты выделяли хроматографией на силикагеле. Структуры полученных соединений подтверждали методами ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР -спектроскопии и ESI-MS-спектрометрии.

Для введения замаскированной альдегидной функции в олигонуклеотидную цепь на последнем цикле автоматического синтеза был использован фосфитамид, содержащий остаток 4-(2-гидроксиэтокси)бензальдегида, защищенного 2,2-диметилпропан-1,3-дионом. Селективное удаление ацетальной защиты в мягких условиях приводило к получению защищенного носитель-связанного олигонуклеотида, содержащего на 5'-конце олигонуклеотидной цепи альдегидную группу (рис. 2.2.2, стадия *i*). Ее взаимодействие в водно-органической среде в слабокислых условиях с соответствующим гидразидом (рис. 2.2.2, стадия *ii*) и последующее полное деблокирование приводило к получению 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих кислотолабильную гидразоновую связь.

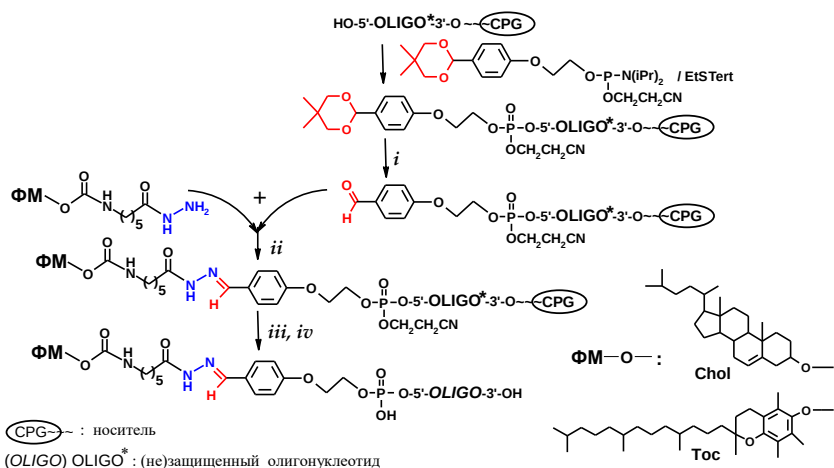


Рисунок 2.2.2. Схема синтеза 5-липофильных конъюгатов олигонуклеотидов. Реагенты: *i*) 80 %-ная CH_3COOH , комнатная температура (к.т.); *ii*) 0.1 М NaOAc (pH 5.2)/диоксан (1/1), к.т.; *iii*) 0.05М K_2CO_3 в CH_3OH , к.т.; *iv*) N -метил-2-пирролидинон/ $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}/(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ (1.5/0.7/1.0), 65 °C.

При разработке описываемого подхода (рис. 2.2.1, вариант Б) в качестве представителей функциональных НК были выбраны модельный гептадезоксирибонуклеотид, малая интерферирующая РНК, направленная на мРНК гена MDR1, митохондриальные антирепликативные РНК, а также гидовые и криспр-РНК для редактирования митохондриальной ДНК (табл. 2.2.1).

В ходе оптимизации условий синтеза и деблокирования было показано: 1) при образовании гидразоновой связи соотношение диоксан/вода играет большую роль нежели концентрация ацетатного буфера; 2) отщепление от носителя и удаление защитных групп аммиаком, метиламином или их смесью (смесь АМА) приводит к ее деструкции; 3) при использовании ультрамягких условий щелочного деблокирования (0.05 М раствор поташа в метаноле), а также смеси реагентов для удаления 2'-O-TBDMS-защитных групп эта связь инертна. Восстановление гидразоновой связи борциангидридом натрия в мягких условиях без изменения структуры самого олигонуклеотида (конъюгаты № 4, 6, табл. 2.2.1) до или после стадий деблокирования позволяет получать стабильный аналог целевого 5'-конъюгата. Это может иметь практическое применение при изучении влияния природы связи, соединяющей ФМ и НК на эффективность действия последней.

Таблица 2.2.1. Структуры 5'-липофильных конъюгатов олигонуклеотидов

N	Конъюгат	Последовательность 5' → 3' ¹	Тип
1	Chol-L-siDmS	Chol-L-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG (21нт)	siPHK ²
2	Toc-L-siDmS	Toc-L-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG (21нт)	
3	Chol-L-mCR57/16	Chol-L-CAAAUUUUAAACUCUCCAAACGAGCCCC UACAGGGCUCUU (40нт)	Митохондриальные антирепликативные РНК ³
4	Chol-L ₁ -mCR57/16	Chol-L ₁ -CAAAUUUUAAACUCUCCAAACGAGCCCC UACAGGGCUCUU (40нт) ⁶	
5	Chol-L-mCR57	Chol-L-GCGCAAUCGGUAGCGCCAAAUUUUAAACUC UCCAAACGAGCCCCUACAGGGCUCUU (56нт)	
6	Chol-L ₁ -mCR57	Chol-L ₁ -GCGCAAUCGGUAGCGCCAAAUUUUAAACUC UCCAAACGAGCCCCUACAGGGCUCUU (56нт) ⁶	
7	Chol-L-mCRC57L	Chol-L-GCGC ^m AAUC ^m GGU ^m AGCGCCAAAUUUU AACUCUCCAAACGAGCCCCU ^m AC ^m AGGGCUCUU (56нт)	
8	Chol-L-mCRC57H	Chol-L-GCGC ^m AAUC ^m GGU ^m AGCGCGUUUGGAGAGUU AAAUUUGGAGCCCCU ^m AC ^m AGGGCUCUU (56нт)	
9	Chol-L-mCRHBL	Chol-L-GCGCA ^m AUC ^m GGU ^m AGCGCAUCUUAAACUCUC UUUUAAACUGAGCCCCU ^m AC ^m AGGGCUCUU (56нт)	
10	Chol-L-mCRHBL	Chol-L-GCGC ^m AAUC ^m GGU ^m AGCGCAGUUAAAAGAGAG UUAAGAUGAGCCCCU ^m AC ^m AGGGCUCUU (56нт)	
11	Chol-L-KSS62	Chol-L-GAGAAGUAAGCACUGUAAAGGUUUUAGAG CUAGAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCCG (62нт)	Митохондриальные sgPHK ⁴
12	Chol-L-KSS84	Chol-L-GAGAAGUAAGCACUGUAAAGGUUUUAGAGCUAG AAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUAGUCCG UUGAGCCCCUACAGGGCUCUU (84нт)	
13	Chol-L-RNA40	Chol-L-UAAUUUCUACUCUUGUAGAUGAU GAUGUGGUCUUUGGAGU (40нт)	Митохондриальные crPHK ⁵
14	Toc-L-RNA40	Toc-L-UAAUUUCUACUCUUGUAGAUGAU GAUGUGGUCUUUGGAGU (40нт)	

¹ dN: дезоксирибонуклеотид; N: рибонуклеотид; N^m: 2'-O-метилрибонуклеотид. ² Сенс-цепь siPHK, направленная к участку 557-577 мРНК гена множественной лекарственной устойчивости MDR1 [30]. ³ Антирепликативные РНК [26], направленные на контрольную область митохондриальной ДНК (мтДНК) мыши, гаплотипы HB и C57BL/6N (Burgstaller J.P. et al., Cell Rep. 2014). ⁴ Гидовые РНК, распознающие границы KSS делеции m.8363-15438del мтДНК (Loutre R. et al., IUBMB Life, 2018). ⁵ crPHK для системы CRISPR/Cas12a, направленной на мтДНК человека (Zetsche B. et al., Cell, 2015). ⁶ Конъюгаты, содержащие восстановленную гидразоновую связь. Chol: остаток холестерина; Toc: остаток α-токоферола; L: -O-C(O)NH-(CH₂)₅-C(O)NH-N=CH-C₆H₄-O-(CH₂)₂-O-P(O)(OH)-; L₁: -O-C(O)NH-(CH₂)₅-C(O)NH-NH-CH₂-C₆H₄-O-(CH₂)₂-O-P(O)(OH)-.

Лабильность гидразоновой связи при различных значениях pH была протестирована на примере конъюгатов siРНК с холестерином и α -токоферолом (Chol-L-siRNA/S (1), Тос-L-siRNA/S (2), табл. 2.2.1), инкубированных в течение 1, 2, 3, 4, 5, и 24 ч при 37 °С в фосфатном буфере при pH 4.8-7.8 (рис. 2.2.3).

Было показано, что при значениях pH, близких к нейтральным, эти конъюгаты остаются стабильными. Напротив, более 70% обоих конъюгатов были гидролизованы за сутки при pH 4.8, что близко к pH внутри эндосом.

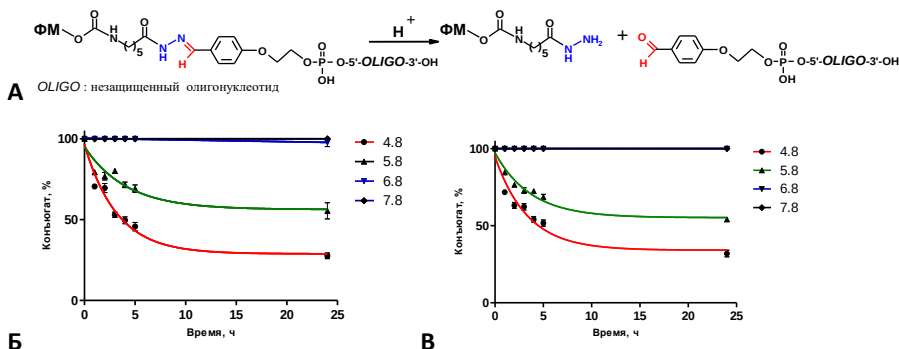


Рисунок 2.2.3. Схема гидролиза (А) и кинетические кривые расщепления гидразоновых связей в конъюгатах Chol-L-siRNA/S (Б) и Тос-L-siRNA/S (В) при различных значениях pH. Количественное определение полноразмерного конъюгата (% , ось Y) в зависимости от pH и времени инкубации. Результаты представляют собой среднее значение ($\pm$ SD) по результатам трех независимых экспериментов.

Резюмируя, можно сказать, что разработанный подход позволяет эффективно синтезировать 5'-липофильные конъюгаты олигонуклеотидов, содержащие кислотолабильную гидразонную связь, а также ее стабильный аналог. Подход может быть распространен на синтез pH-чувствительных конъюгатов олигонуклеотидов различных типов (рибо-, дезоксирибо-, 2'-O-метилрибо- и др.) с биомолекулами различной природы.

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

Еще один подход к созданию 5'-конъюгатов олигонуклеотидов основан на активации единственной свободной 5'-гидроксильной группы защищенного носитель-связанного олигонуклеотида N,N' -дисукцинимидилкарбонатом с последующим взаимодействием такого активированного олигонуклеотида с аминокислотами ФМ (рис. 2.3.1) [3,16].

Два гомо-бифункциональных реагента обычно используют в органической и биоорганической химии для активации amino- и гидроксильных групп: 1,1'-карбонилдиимидазол (CDI) и N,N' -дисукцинимидилкарбонат (DSC) (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*; Elsevier, 2008; ISBN 9780123705013). Реакционная способность N -сукцинимидилкарбаматного производного, образующегося при активации DSC, выше, чем имидазолкарбаматного производного, полученного после активации CDI.

Карбаматная связь, образующаяся при взаимодействии сукцинимидилкарбамата с аминоксодержащими ФМ, химически стабильна (Zalipsky et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1992). В контексте химии нуклеиновых кислот активация 5'-аминогруппы посредством DSC для синтеза олигонуклеотид-пептидных конъюгатов описана в работах (Diala et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007; Liu et al., *Int. J. Mol. Sci.* 2011). Для активации 5'-гидроксильной группы для синтеза 5'-аминоалкильных олигодезоксирибонуклеотидов описано использование CDI (Wachter et al., *Nucleic Acids Res.*, 1986; Shevelev et al., *J. Phys. Chem. B*, 2015). На момент разработки описываемого подхода не сообщалось об использовании DSC для таких целей, таким образом, данный вариант конъюгации был реализован впервые.

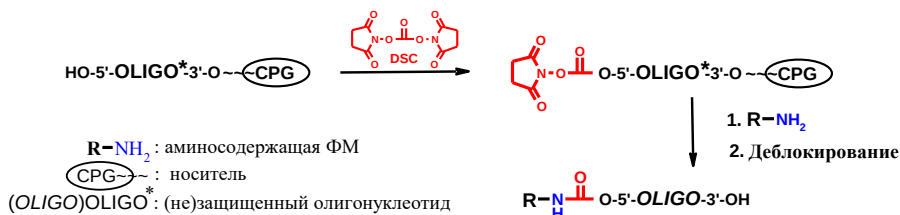


Рисунок 2.3.1. Общая схема синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, основанная на активации 5'-гидроксильной группы защищенного носитель-связанного олигонуклеотида *N,N'*-дисукцинимидилкарбонатом.

Возможности подхода были продемонстрированы с использованием ряда коммерчески доступных аминоксодержащих соединений (короткий пептид трилейцин, олеиламин, 1,6-диаминогексан, 1,12-диаминододекан, пропаргиламин, пиперазин), борного кластера (любезно предоставлен Сильниковым В.Н., ИХБФМ СО РАН), эстронил-6-аминогескилкарбамата (любезно предоставлен Новопашиной Д.С., ИХБФМ СО РАН), гидрохлорида монопиперазинового производного тритильной спиновой метки (любезно предоставлен Тормышевым В.М., НИОХ СО РАН), а также аминоксодержащих α -токоферола, фолиевой кислоты и холестерина. Гидроксильная группа α -токоферола была активирована *N,N'*-дисукцинимидилкарбонатом с последующим взаимодействием с 1,6-диаминогексаном. Введение 1,6-диаминогексана по карбоксильной группе фолиевой кислоты проводили после ее активации *N,N'*-дициклогексилкарбодимидом и *N*-гидроксисукцинимидом. Взаимодействие коммерчески доступного хлорформата холестерина с алифатическими 1,6-гексан- и 1,12-додекан-диаминами приводило к двум его производным. Выходы целевых соединений составили 45-80%. Их строение после хроматографического выделения было доказано методами ¹H-ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией. При разработке подхода в качестве олигонуклеотидов были использованы гепта- и эйкозадезоксирибонуклеотиды, а также малая интерферирующая РНК, направленная к мРНК гена MDR1.

Оптимизацию условий синтеза проводили на модельном гептадезоксиинуклеотиде (рис. 2.3.2, вариант А). Было показано: для активации 5'-гидроксильной группы добавление DSC к носитель-связанному олигонуклеотиду необходимо проводить дважды по 30-40 мин, в качестве растворителя лучше всего использовать абсолютный

ацетонитрил; требуется обязательная двукратная промывка носителя с активированным олигонуклеотидом ацетонитрилом перед добавлением аминокомпонента; растворитель для аминокомпонента не играет преимущественного значения; температура проведения обеих реакций 37 °С; в качестве основания можно использовать пиридин, триэтиламин, диизопропилэтиламин, причем их качество играет ключевую роль в эффективности прохождения обеих реакции; необходимо обеспечить эффективное перемешивание.

По разработанному протоколу синтеза [16] были получены (табл. 2.3.1) конъюгаты и производные гепта- (№ 1-11), гекса- (№ 12), дека- (№ 19-23), эйкоза- (№ 24, 25) дезоксирибонуклеотидов, а также siPHK (№ 26, 27).

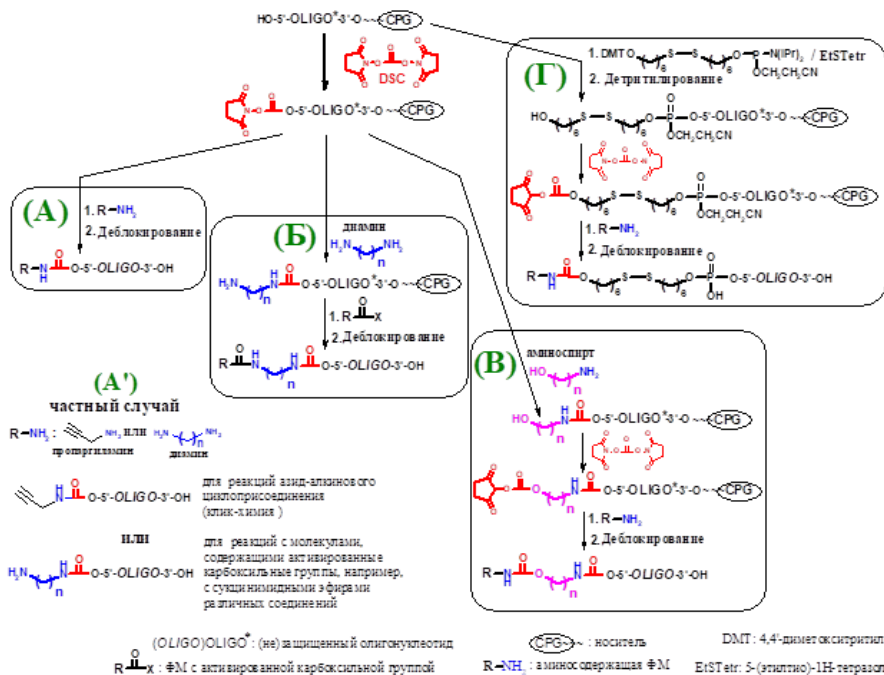


Рисунок 2.3.2. Возможности подхода к синтезу 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, основанного на активации 5'-гидроксильной группы защищенного носитель-связанного олигонуклеотида *N,N'*-дисуццинимидилкарбонатом.

Вариант Б (рис. 2.3.2) позволяет непосредственно в ходе синтеза гибко варьировать линкер между олигонуклеотидом и функциональной молекулой, используя диамины различного строения, но ограничен только молекулами, содержащими карбоксильную группу в виде их в активированных производных либо ацилхлоридов. Оптимизацию условий синтеза проводили на модельном гексадезокситимидате с использованием монозащищенных диаминов. Для оптимизации условий был выбран коммерчески доступный моно-*N*-Вос-защищенный 1,6-диаминогексан и получен аминомодифицированный гексатимидат (№ 12). Параллельно в реакции с дициклогексилкарбодиимидом (DCC) и гидроксибензотриазолом (HOBt) были

получены активированные НОВт-производные 4-метоксибензойной, фолиевой и глицирретиновой кислот. В результате оптимизации условий синтеза было установлено, что использование двухкратного избытка кислоты по отношению к DCC и НОВт и стократного по отношению к 5'-аминосодержащему носитель-связанному олигонуклеотиду приводит к количественной конверсии в целевые конъюгаты (№ **13-15**, **31-33**).

Таблица 2.3.1. Структуры 5'-конъюгатов олигонуклеотидов

N	Конъюгат, 5'-3' ¹	Молекуляр. масса	
		Теор.	Эксп. ²
1	<i>Chol</i> L ₆ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (A)	2623.2	2624.7
2	<i>Chol</i> L ₁₂ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (A)	2707.0	2708.6
3	<i>Oleyl</i> -NH-C(O)-d(TTTTTT) (A)	2361.9	2361.3
4	<i>Est</i> L ₆ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (A)	2506.9	2507.6
5	<i>Toc</i> L ₆ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (A)	2667.3	2668.2
6	<i>Fol</i> L ₆ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (A)	2677.9	2676.2
7	(<i>Leu</i>) ₃ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (A)	2451.9	2352.1
8	<i>c-B</i> ₁₂ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (A)	2303.0	2301.6
9	NH ₂ L ₆ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (A)	2210.6	2210.4
10	NH ₂ L ₁₂ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (A)	2294.8	2293.4
11	CH=C-CH ₂ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (A)	2149.5	2149.5
12	NH ₂ L ₆ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (A,Б)	1905.2	1905.5
13	MBL ₆ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (Б)	2039.4	2039.6
14	GlyL ₆ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (Б)	2357.9	2358.4
15	FolL ₆ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (Б)	2328.6	2329.0
16	<i>Phn</i> -NHL ₆ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (A')	-	-
17	<i>Phn</i> -NHL ₁₂ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (A')	-	-
18	Cy3L-CH ₂ -NH-C(O)-d(TTTTTT) (A')	-	-
19	NH ₂ L ₂ -NH-C(O)-d(CACGCCGCTG) (A)	3075.0	3073.6
20	NH ₂ L ₂ -NH-C(O)-d(CAGCGGCGTG) (A)	3155.0	3153.5
21	piperazin-C(O)-d(CACGCCGCTG) (A)	3101.0	3099.6
22	piperazin-C(O)-d(CAGCGGCGTG) (A)	3181.0	3179.6
23	Tr-piperazin-C(O)-d(CAGCGGCGTG) (A)	4111.0	4109.7
24	<i>c-B</i> ₁₂ -NH-C(O)-d(ATACGTTAACGATCCTTCAC) (A)	6281.2	6282.0
25	<i>Oleyl</i> -NH-C(O)-d(ATACGTTAACGATCCTTCAC) (A)	6330.4	6330.2
26	(<i>Leu</i>) ₃ -NH-C(O)-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG (A)	7221.7	7222.4
27	<i>Chol</i> L ₆ -NH-C(O)-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG (A)	7394.2	7393.8
28	(<i>Leu</i>) ₃ -NH-C(O)-LSSL-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG (Г)	7549.6	7551.9
29	<i>Chol</i> L ₆ -NH-C(O)-LSSL-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG (Г)	7722.5	7722.8
30	<i>Chol</i> L ₆ -NH-C(O)-L ₁₂ -NHC(O)-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG (Б)	7620.5	7619.5
31	MBL ₆ -NHC(O)-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG (Б)	7114.3	7115.2
32	GlyL ₆ -NHC(O)-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG (Б)	7432.8	7433.7
33	FolL ₆ -NHC(O)-GGCUU ^m GAC ^m AAGUU ^m GU ^m AU ^m AU ^m GG (Б)	7403.8	7404.5

¹ В скобках указан Вариант синтеза (рис. 2.3.1). ² По данным LC-ESI- и MALDI-TOF-масс-спектрометрии. *Chol*- остаток холестерина; *Oleyl*-NH- остаток олеиламина; *Est*- остаток эстрона; *Toc*- остаток α-токоферола; *Fol*- остаток γ-фолата; *Gly*- остаток глицирретиновой кислоты; *MB*- остаток 4-метоксибензойной кислоты; (*Leu*)₃-NH- остаток трилейцина; *c-B*₁₂-NH- остаток closo-додекабората; CH=C-CH₂-NH- остаток пропаргиламина; *piperazin* - остаток пиперазина; *Tr-piperazin* - остаток пиперазинового производного тритильной спиновой метки; *LSSL* - -O-(CH₂)₆-S-S-(CH₂)₆-O-P(O)(OH)-; L₂ - -(CH₂)₂-; L₆ - -(CH₂)₆-; L₁₂ - -(CH₂)₁₂-; *Phn* - остаток N-(2-гидроксиэтил)феназиния; Cy3L - краситель Cy3 с 1,2,3-триазольным линкером (клик-реакция); N - рибонуклеотид; N^m - 2'-O-метилрибонуклеотид; d(N) - дезоксирибонуклеотид.

Предлагаемый подход позволяет, при необходимости, удлинять линкеры между олигонуклеотидом и ФМ путем нескольких последовательных твердофазных реакций активации/добавления с помощью DSC (рис. 2.3.2, Вариант В). Эта возможность была продемонстрирована при использовании 12-аминододекан-1-ола для получения конъюгата № 30.

Также предложенный метод позволяет получать конъюгаты, в которых олигонуклеотид и ФМ соединены деградируемыми связями (рис. 2.3.2, Вариант Г). Так, например, для введения восстанавливаемой дисульфидной связи на последней стадии олигонуклеотидного синтеза был использован коммерчески доступный SS-содержащий фосфитамид. Далее проводили активацию гидроксильной группы и получали конъюгаты siPHK с трилейцом или холестеринном (№ 28, 29). Такая SS-связь может быть восстановлена при помощи дитиотреитола или глутатиона. По аналогичной схеме, остаток холестерина был введен в siPHK посредством фотолabile линкера на основе 1-(2-нитрофенилэтан)-1,2-диола (Ахметова и др., *Биоорганическая химия*, 2022).

5'-Амино- и 5'-алкинил-модифицированные олигонуклеотиды являются хорошо известной платформой для получения различных конъюгатов и позволяют дальнейшее взаимодействие с: а) молекулами, содержащими электрофильные центры, например, N-(2-гидроксиэтил)феназиний хлорид (№ 16, 17) или активированные карбоксильные группы, например, с сукцинимидными эфирами различных соединений, или б) с азидосодержащими соединениями по реакции азид-алкинового циклоприсоединения ("клик"-химии), например, с азидом красителя цианинового ряда СуЗ (№ 18) (рис. 2.3.2, частный случай А'). Впоследствии этот вариант был распространен на получение аптамеров с бор-содержащим кластером по реакции азид-алкинового циклоприсоединения для применения в БНЗТ-терапии (Novopashina et al., *Int. J. Mol. Sci.* 2021 и 2023; Vorobyeva et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2021 и *Sib. Med. Rev.*, 2022; Новопашина и др., RU2786533C1, 2022).

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

2.4. Разработка твердофазного варианта синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов с биоактивными функциональными молекулами, введенными посредством кислотолabile фосфамидной (Р-N) связи

Еще одним представителем класса кислотолabile связей наряду с гидронами является фосфамидная Р-N-связь.

В литературе описано несколько методов получения конъюгатов нуклеотидов и олигонуклеотидов, содержащих Р-N-связь по концевым или межнауклеозидным фосфатам. Одним из самых распространенных и часто используемых вариантов синтеза

фосфамидной связи является реакция Аттертона-Тодда – взаимодействие диалкилфосфита с первичным амином в присутствии четыреххлористого углерода (*Corre et al., Beilstein J. Org. Chem., 2014*) или окисление Н-фосфонатной связи в присутствии элементарного иода с последующим взаимодействием с аминоксодержащими ФМ (*Froehler et al., Tetrahedron Lett., 1986*). Эти реакции используют, вводя модификацию в ходе твердофазного синтеза олигонуклеотидов. Еще одним вариантом получения такого рода модификаций олигонуклеотидов в твердофазном варианте является реакция Штаудингера (*Kupryushkin et al., Russ. Chem. Bull., 2015; Derzhalova et al., Appl. Sci., 2021*). Существует вариант твердофазного фосфотриэфирного подхода к синтезу 5'-амидофосфатных производных олигонуклеотидов ДНК и РНК (*Dovydenko et al., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2018*). Введение ФМ на 5'- или 3'-конец олигонуклеотида через Р-N-связь можно также проводить и в полностью деблокированный олигонуклеотид, активируя остаток 5'/3'-концевой фосфорной кислоты 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимидом в присутствии производных имидазола (*Jeong et al., Bioconjug. Chem., 2003; Wang et al., Bioconjug. Chem., 2012*) или используя окислительно-восстановительную пару трифенилфосфин/2,2'-дипиридилдисульфид ($\text{Ph}_3\text{P}/(\text{PyS})_2$) (*Zarytova et al., Nucleosides. Nucleotides, 1998*). Именно последний вариант был взят за основу для разработки описываемого подхода.

Основная схема предложенного в данной работе твердофазного подхода включает в себя шесть стадий (рис. 2.4.1): 1) введение фосфатной группы на 5'-конец олигонуклеотидной цепи в автоматическом варианте, 2) удаление диметокситритильной группы, 3) деблокирование концевого и межнуклеозидных фосфатов, 4) активация 5'-фосфатной группы защищенного носитель-связанного олигонуклеотида окислительно-восстановительной парой $\text{Ph}_3\text{P}/(\text{PyS})_2$ с последующим добавлением 4-диметиламинопиридина (DMAP) и образованием 5'-DMAP-интермедиата, 5) взаимодействие этого интермедиата с аминоксодержащей ФМ, 6) полное деблокирование полученного 5'-конъюгата [6].

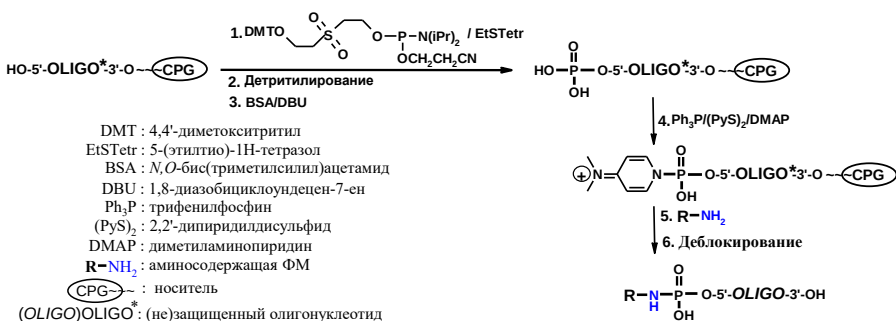


Рисунок 2.4.1. Общая схема синтеза 5'-конъюгатов олигонуклеотидов, содержащих кислоталабильную фосфамидную связь.

В качестве аминоксодержащих ФМ был использован ряд коммерчески доступных соединений (олеиламин, 1,6-диаминогексан, 3-аминопропан-1-ол, пропаргиламин,

пиренметиламин), а также аминокпроизводные холестерина (при взаимодействии коммерчески доступного хлорформината холестерина с алифатическим 1,6-гексан- диамином; выход 80%) и *p*-анисовой кислоты (активированное *N,N'*-дициклогексилкарбодимидом в присутствии 1-гидроксibenзотриазола производное *p*-анисовой кислоты *in situ* вводили в реакцию с моно *N*-Вос-защищенным гексаметилендиамином с последующим удалением Вос-защитной группы; выход 34 %). Строение соединений после хроматографического выделения подтверждали методом ¹H-ЯМР спектроскопии.

Оптимизация условий синтеза проводилась на модельном гептадезоксинуклеотиде. В качестве целевой последовательности была выбрана siРНК, направленная к мРНК гена MDR1. Также в литературе показано, что использование siРНК, в которых сенс-цепь разделена на два фрагмента, является перспективным подходом к подавлению экспрессии генов (*Bramsen et al., Nucleic Acids Res., 2007*). Ранее (*Новопашина и др., Биоорг. химия, 2008*) было показано, что при использовании реагентов Ph₃P/(PyS)₂/DMAP для активации 5'-фосфата полностью деблокированного олигонуклеотида («метод в растворе») возможно образование 5',5'-бисконъюгатов. В ходе данного исследования была поставлена задача по синтезу 5'-моно-конъюгатов сенс-цепи в виде рибонуклеотида и 5'-моно-конъюгатов фрагмента сенс-цепи в виде 2'-*O*-метилированного олигонуклеотида (табл. 2.4.1).

Таблица 2.4.1. Структуры 5'-конъюгатов олигонуклеотидов

N	Конъюгат, 5'-3'	
1	MB-NH- <i>L</i> ₆ -NH-p-d(TTTTTT)	<i>Chol</i> – остаток холестерина;
2	<i>Chol</i> -C(O)-NH- <i>L</i> ₆ -NH-p-d(TTTTTT)	<i>MB</i> – остаток <i>p</i> -анисовой кислоты;
3	<i>Oleyl</i> -NH-p-d(TTTTTT)	<i>Oleyl</i> -NH – остаток олеиламина;
4	CH≡C-CH ₂ -NH-p-d(TTTTTT)	<i>Pyr</i> – остаток пирена;
5	<i>Pyr</i> -CH ₂ -NH-p-d(TTTTTT)	CH≡C-CH ₂ -NH – остаток пропаргиламина;
6	<i>HOL</i> ₃ -NH-p-d(TTTTTT)	<i>L</i> ₃ – -(CH ₂) ₃ –;
7	<i>NH</i> ₂ <i>L</i> ₆ -NH-p-d(TTTTTT)	<i>L</i> ₆ – -(CH ₂) ₆ –;
8	<i>Biot</i> - <i>NHL</i> ₆ -NH-p-d(TTTTTT)	<i>FAM</i> -click – краситель FAM с 1,2,3-триазольным линкером;
9	<i>Oleyl</i> -NH-p-G ^m G ^m C ^m U ^m G ^m A ^m C ^m A ^m	<i>GalNAc</i> -click – остаток <i>N</i> -ацетилгалактозамина с 1,2,3-триазольным линкером;
10	<i>MB</i> -NH- <i>L</i> ₆ -NH-p-G ^m G ^m C ^m U ^m G ^m A ^m C ^m A ^m	<i>Biot</i> – остаток биотина;
11	CH≡C-CH ₂ -NH-p-G ^m G ^m C ^m U ^m G ^m A ^m C ^m A ^m	N – рибонуклеотид;
12	<i>FAM</i> -click-CH ₂ -NH-p-G ^m G ^m C ^m U ^m G ^m A ^m C ^m A ^m	N ^m – 2'- <i>O</i> -метилрибонуклеотид;
13	<i>MB</i> -NH- <i>L</i> ₆ -NH-p-GGCUUGACAAGUUGUAUAUUGG ^m	d(N) – дезоксинуклеотид
14	<i>Oleyl</i> -NH-p-GGCUUGACAAGUUGUAUAUUGG ^m	
15	<i>Chol</i> -C(O)-NH- <i>L</i> ₆ -NH-p-GGCUUGACAAGUUGUAUAUUGG ^m	
16	CH≡C-CH ₂ -NH-p-GGCUUGACAAGUUGUAUAUUGG ^m	
17	<i>GalNAc</i> -click-CH ₂ -NH-p-GGCUUGACAAGUUGUAUAUUGG ^m	

После введения 5'-фосфатной группировки в ходе последнего цикла автоматического синтеза проводили ее деблокирование (удаление остатка сульфонилдизтанола и цианозтильной защитной группы) последовательной обработкой *N,O*-бис-(триметилсилил)ацетамидом (BSA) и 1,8-дiazобисциклоундец-7-еном (DBU). Далее 5'-концевую фосфатную группу активировали смесью (Ph₃P/(PyS)₂/DMAP) и вводили в реакцию с аминоксодержащими ФМ. Было показано, что удаление активирующих агентов и обязательная трехкратная промывка носителя с присоединенным активированным

олигонуклеотидом перед добавлением аминоксодержащей ФМ приводит к получению исключительно моно-конъюгатов.

При использовании ряда стандартных реагентов и условий щелочного деблокирования для отщепления конъюгата от носителя и удаления защитных групп (см. раздел 1) Р-N-связь в составе конъюгатов стабильна. Однако в ходе экспериментов было показано, что обработка конъюгатов, содержащих фосфамидную связь, стандартной смесью для удаления 2'-O-TBDMS защитных групп (*N*-метил-2-пирролидинон/(C₂H₅)₃N/(C₂H₅)₃N·3HF, (1.5/0.7/1.0)) приводит к деструкции Р-N-звена с образованием исходного 5'-фосфатсодержащего олигонуклеотида. При использовании альтернативных условий 2'-деблокирования – обработка 1М раствором тетрабутиламмоний фторида в тетрагидрофуране – Р-N-связь остается интактной.

В ряде работ (*напр.*, Jeong et al., *Bioconjug. Chem.*, 2003) было показано, что фосфамидная связь между олигонуклеотидом и полиэтиленгликолем полностью расщеплялась при 37 °С в течение 5 ч при рН 4.7. Была исследована стабильность фосфамидной связи в составе синтезированных конъюгатов при различных рН. Схема гидролиза приведена на рисунке 2.4.2.А. Ранее полученные 5'-конъюгаты siPHK с *N*-(6-аминогексил)-4-метоксibenзамидом, олеиламином, холестерил-6-аминогексилкарбаматом и GalNAc (№ 13-15, 17) выдерживали в ацетатном буфере с рН 6.0, 5.2 и 4.5 при 37 °С в течение 1, 2, 4, 6 и 24 ч.

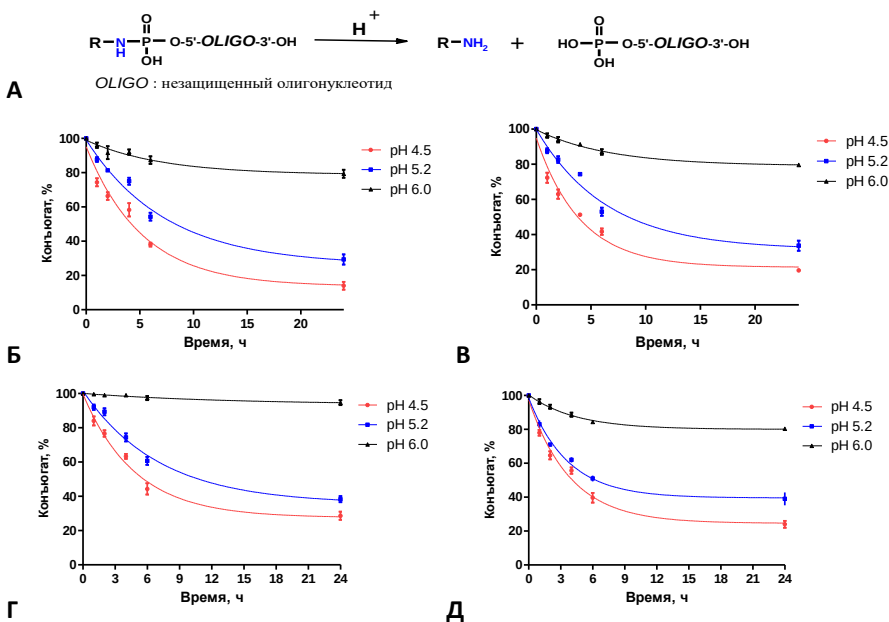


Рисунок 2.4.2. Схема гидролиза (А) и кинетические кривые расщепления Р-N-связи в конъюгатах (№ 13-15, 17, табл. 2.4.1) с *p*-анисовой кислотой (Б), холестерином (В), олеилом (Г) и GalNAc (Д) при различных значениях рН. Количественное определение полноразмерного конъюгата (% , ось Y) в зависимости от рН и времени инкубации. Результаты представляют собой среднее значение (±SD) по результатам трех независимых экспериментов.

На представленных графиках (рис. 2.4.2) видно, что за 24 ч при pH 6.0 деструкция Р-N-связи не превышает 20 %, а при $\text{pH} \leq 5.2$ более 50% олигонуклеотидного материала находится в исходной 5'-фосфорилированной форме. Наибольшая степень деструкции Р-N-связи при pH 4.5 наблюдалась для конъюгата siРНК с N-(6-аминогексил)-4-метоксибензамидом (около 85% за 24 ч, рис. 2.4.2.Б).

Обобщая данные, полученные в п.п. 2.3 и 2.4, можно заключить, что использование функциональных молекул, содержащих алифатическую аминогруппу, в рамках двух предложенных подходов открывает путь к созданию широкого спектра 5'-конъюгатов олигонуклеотидов в которых оба компонента сочетаются через линкеры, равные по длине, но принципиально различающиеся по стабильности. Эффективность конъюгирования для всех подходов, описанных в п.п. 2.1-2.4, близка к количественной. Показано, что общие выходы целевых конъюгатов (9-24 % в расчете на первое нуклеозидное звено, гомогенность подтверждена методом аналитического гель-электрофореза в денатурирующих условиях с последующим анализом с помощью LC-ESI- и MALDI-TOF-масс-спектрометрии) после препаративного выделения и нативных олигомеров аналогичной длины сопоставимы между собой, что подтверждает эффективность предложенных методов.

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

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

В работах Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот (ИХБФМ СО РАН) полученные по разработанным протоколам и методам олигорибонуклеотиды, их аналоги и конъюгаты были использованы: при разработке алгоритма адресной химической модификации siРНК, позволяющего получать siРНК, обладающие повышенной нуклеазоустойчивостью; в большом цикле работ, посвященных исследованию влияния структуры липофильных нативных и модифицированных малых интерферирующих РНК, их димерных и тримерных форм на их доставку, механизм действия и биологическую активность в т.ч. при хроническом воспалении и в опухолевых клетках различного происхождения; для идентификации и изучения селективного ингибитора

экспрессии Р-гликопротеина, который может быть использован для преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолей. В Институте Молекулярной Генетики, Микробиологии и Геномики (Страсбургский Университет/НЦНИ, г.Страсбург, Франция) с использованием антирепликативных РНК и их структурных аналогов были проведены комплексные исследования, направленные на доставку, импорт, а также влияние модификаций в антирепликативных РНК митохондрий клеток человека на изменение экспрессии отдельных генов в составе мтДНК, несущих патогенные мутации. В проектах Лаборатории химии РНК (ИХБФМ СО РАН) синтезированные малые интерферирующие и гидовые РНК, ДНК/РНК-аптамеры были использованы для оценки терапевтического потенциала наноконструкций на основе дендримеров в отношении опухолевых клеток, разработки способов специфической количественной детекции белковых биомаркеров различных заболеваний, изучения системы геномного редактирования CRISPR/Cas9, создания клеточно-специфических средств доставки для бор-нейтрон захватной терапии. При изучении структурных основ молекулярных взаимодействий, обеспечивающих инициацию и терминацию трансляции у млекопитающих, в Лаборатории структуры и функции рибосом (ИХБФМ СО РАН, в том числе в коллаборации с Институтом органической химии СО РАН) синтезированные siРНК и модифицированные синтетические аналоги мРНК были использованы для: выявления конформационных особенностей мРНК в различных типах комплексов 80S рибосом человека с помощью методов электронного парамагнитного резонанса; исследования функций рибосомного белка uS3 человека в составе 40S субчастиц рибосом, связанных с контролем качества мРНК; оценки влияния рибосомных белков на экспрессию генов на уровне трансляции.

Заключение

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

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Мещанинова М.И., Пышная И.А., Пышный Д.В. Рациональный синтез конъюгатов олигонуклеотидов с функциональными молекулами: от простых подходов к комплексным стратегиям. Успехи химии. 2026. Т.95. RCR5207. doi:10.59761/RCR5207 (обзорная статья).
2. Repkova M., Mazurkov O., Filippova E., Protsenko M., Mazurkova N., **Meschaninova M.**, Levina A., Zarytova V. Effect of modification of siRNA molecules delivered with aminopropylsilanol nanoparticles on suppression of A/H5N1 virus in cell culture. BBA - General Subjects. 2024. V.1868. 130727. doi:10.1016/j.bbagen.2024.130727
3. Bishani A., **Meschaninova M.I.**, Zenkova M.A., Chernolovskaya E.L. The Impact of Chemical Modifications on the Interferon-Inducing and Antiproliferative Activity of Short Double-Stranded Immunostimulating RNA. Molecules. 2024. V.29. 3225. doi:10.3390/molecules29133225
4. Novak D.D., Troitskaya O.S., Nushtaeva A.A., Zhilnikova M.V., Richter V.A., **Meschaninova M.I.**, Koval O.A. EGFR Suppression Inhibits the Sphere Formation of MCF7 Cells Overexpressing EGFR. Acta Naturae. 2023 V.15. P.59-69. doi: 10.32607/actanaturae.17857
5. Knauer N., **Meschaninova M.**, Muhammad S., Hänggi D., Majoral J.-P., Kahlert U.D., Kozlov V., Apartsin E.K. Effects of Dendrimer-microRNA Nanoformulations against Glioblastoma Stem Cells. Pharmaceutics. 2023. V.15. P.968. doi:10.3390/pharmaceutics15030968

6. Kropacheva N.O., Golyshkin A.A., Vorobyeva M.A., **Meschaninova M.I.** Convenient solid-phase attachment of small-molecule ligands to oligonucleotides via a biodegradable acid-labile P-N-bond. *Molecules*. 2023. V.28. P.1904. doi:10.3390/molecules28041904
7. Ochkasova A.S., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Graifer D.M., Karpova G.G. AP sites in various mRNA positions cross-link to the protein uS3 in the translating mammalian ribosome. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom*. 2021. V.1869. P.140698. doi:10.1016/j.bbapap.2021.140698
8. **Meschaninova M.I.**, Entelis N.S., Chernolovskaya E.L., Venyaminova A.G. A versatile solid-phase approach to the synthesis of oligonucleotide conjugates with biodegradable hydrazone linker. *Molecules*. 2021. V.26. P.2119. doi:10.3390/molecules26082119
9. Dovydenko I., **Meschaninova M.**, Heckel A.M., Tarassov I., Venyaminova A., Entelis N. Lipophilic conjugates for carrier-free delivery of RNA importable into human mitochondria // *Mitochondrial Medicine. Methods in Molecular Biology* / Eds. Weissig V., Edeas M. New York, NY: Humana, 2021. V.2277. P.49-67. doi:10.1007/978-1-0716-1270-5_4
10. Черников И.В., **Мещанинова М.И.**, Гладких Д.В., Венямина А.Г., Зенкова М.А., Власов В.В., Черноловская Е.Л. Взаимодействие липофильных конъюгатов модифицированных siРНК с гемопоэтическими клетками in vitro и in vivo // *Биоорганическая химия*. 2021. Т.47. С.195-207. doi:10.1134/S1068162021020072
11. Ахметова Е.А., Гольшев В.М., Вохтанцев И.П., **Мещанинова М.И.**, Венямина А.Г., Новопашина Д.С. Фотоактивируемая система CRISPR/Cas9. *Биоорганическая химия*. 2021. Т.47. С.276-286. doi:10.1134/S1068162021020023
12. Chernikov I.V., Meschaninova M.I., Chernolovskaya E.L. Preparation, determination of activity and biodistribution of cholesterol-containing nuclease-resistant siRNAs in vivo. *Methods in Molecular Biology*. 2020. V.2115. P.57-77. doi:10.1007/978-1-0716-0290-4_3
13. Chernikov I.V., Gladikh D.V., Karelina U.A., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Trimeric small interfering RNAs and their cholesterol-containing conjugates exhibit improved accumulation in tumors, but dramatically reduced silencing activity. *Molecules*. 2020. V.25. P.1877. doi:10.3390/molecules25081877
14. Ritter G.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Kisaretova P.E., Taranov O.S., Dubatolova T.D., Dolgova E.V., Potter E.A., Kirikovich S.S., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Romanenko M.V., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Kolchanov N.A., Shurdov M.A., Bogachev S.S. Characterization of biological peculiarities of the radioprotective activity of double-stranded RNA isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Radiat. Biol*. 2020. V.96. P.1173-1191. doi: 10.1080/09553002.2020.1793020
15. Malygin A.A., Krumkacheva O.A., Graifer D.M., Timofeev I.O., Ochkasova A.S., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Fedin M.V., Bowman M., Karpova G.G., Bagryanskaya E.G. Exploring the interactions of short RNAs with the human 40S ribosomal subunit near the mRNA entry site by EPR spectroscopy. *Nucleic Acids Res*. 2019. V.47. P.11850-11860. doi:10.1093/nar/gkz1039
16. **Meschaninova M.I.**, Novopashina D.S., Semikolenova O.A., Silnikov V.N., Venyaminova A.G. Novel convenient approach to the solid-phase synthesis of oligonucleotide conjugates. *Molecules*. 2019. V.24. P.4266. doi:10.3390/molecules24234266
17. Gusachenko O.N., Patutina O.A., Gvozdev V.A., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Incorporation of antisense oligonucleotides into lipophilic Concatemeric complexes provides their effective penetration into cells. *Russ. J. Bioorg. Chem*. 2019. V.45. P.739-748. doi:10.1134/S1068162019060177
18. Ochkasova A.S., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Ivanov A.V., Graifer D.M., Karpova G.G. The human ribosome can interact with the abasic site in mRNA via a specific peptide of the uS3 protein located near the mRNA entry channel. *Biochimie*. 2019. V.158. P.117-125. doi:10.1016/j.biochi.2018.12.015

19. Chernikov I.V., Gladkikh D.V., **Meschaninova M.I.**, Karelina U.A., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Fluorophore labeling affects the cellular accumulation and gene silencing activity of cholesterol-modified siRNAs in vitro. *Nucleic Acid Ther.* 2019. V.29. P.33-43. doi:10.1089/nat.2018.0745
20. Gvozdeva O.V., Gladkikh D.V., Chernikov I.V., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Nuclease-resistant 63-bp trimeric siRNAs simultaneously silence three different genes in tumor cells. *FEBS Lett.* 2018. V.592. P.122-129. doi:10.1002/1873-3468.12927
21. Кабилова Т.О., **Мещанинова М.И.**, Веняминова А.Г., Власов В.В., Зенкова М.А., Черноловская Е.Л. Влияние химических модификаций в составе иРНК на ее антипролиферативные и иммуностимулирующие свойства. *Биоорг. химия.* 2017. Т.43. С.59-67. doi:10.1134/S1068162017010046
22. Sharifulin D.E., Bartuli Y.S., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Graifer D.M., Karpova G.G. Exploring accessibility of structural elements of the mammalian 40S ribosomal mRNA entry channel at various steps of translation initiation. *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 2016. V.1864. P.1328-1338. DOI:10.1016/j.bbapap.2016.06.011
23. Tonin Y., Heckel A.M., Dovydenko I., **Meschaninova M.**, Comte C., Venyaminova A., Pyshnyi D., Tarassov I., Entelis N. Characterization of chemically modified oligonucleotides targeting a pathogenic mutation in human mitochondrial DNA. *Biochimie.* 2014. V.100. P.192-199. doi:10.1016/j.biochi.2013.08.020
24. Kabilova T.O., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Nikolin V.P., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Short double-stranded RNA with immunostimulatory activity: sequence dependence. *Nucleic Acid Ther.* 2012. V.22. P.196-204. doi:10.1089/nat.2011.0328
25. Petrova N.S., Chernikov I.V., **Meschaninova M.I.**, Dovydenko I.S., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Carrier-free cellular uptake and the gene-silencing activity of the lipophilic siRNAs is strongly affected by the length of the linker between siRNA and lipophilic group. *Nucleic Acids Res.* 2012. V.40. P.2330-2344. doi:10.1093/nar/gkr1002
26. Petrova N.S., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Silencing activity of 2'-O-methyl modified anti-MDR1 siRNAs with mismatches in the central part of the duplexes. *FEBS Lett.* 2011. V.585. P. 2352-2356. doi:10.1016/j.febslet.2011.06.003
27. Volkov A.A., Kruglova N.S., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect. *Oligonucleotides.* 2009. V.19. P.191-202. doi:10.1089/oli.2008.0162
28. Iglina A.A., **Meschaninova M.I.**, Venyaminova A.G. 5'-Lipophilic conjugates of oligonucleotides as components of cell delivery systems. *Nucleic acids symp. ser.* 2009. №53. P.121-122. doi:10.1093/nass/nrp061