

Методы синтеза олигонуклеотидов, содержащих реакционноспособные электрофильные группировки

А.В.Качалова, Е.М.Зубин, Т.С.Орещкая

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет
119992 Москва, Ленинские горы, факс (095) 939–3181

Обсуждены литературные данные по методам химического синтеза олигонуклеотидов, содержащих карбоксильную или альдегидную функциональную группировку на 5'-, 3'-конце или в середине цепи олигомера. Систематизированы известные методы, отмечены их преимущества и недостатки.
Библиография — 65 ссылок.

Оглавление

I. Введение	1173
II. Синтез олигонуклеотидов, содержащих 5'-концевую карбоксильную или альдегидную группу	1174
III. Синтез олигонуклеотидов, содержащих 3'-концевую карбоксильную или альдегидную группу	1178
IV. Синтез олигонуклеотидов, содержащих карбоксильную или альдегидную группу в середине цепи	1181
V. Заключение	1191

I. Введение

В настоящее время модифицированные олигонуклеотиды широко применяются в молекулярной биологии, при изучении закономерностей нуклеиново-белкового узнавания, в антисмысловой биотехнологии, а также при создании терапевтических препаратов для лечения различных вирусных и наследственных заболеваний. Чтобы решить эти задачи необходимо синтезировать конъюгаты олигонуклеотидов с другими соединениями (например, репортерными молекулами, интеркаляторами, биологически активными пептидами и ферментами), обладающими рядом уникальных свойств. В связи с этим актуальным становится получение одно- или двутяжевых молекул ДНК, имеющих в своем составе группировки, отличные по реакционной способности от функциональных групп природных ДНК. Введение новых реакционноспособных группировок в состав олигонуклеотидной цепи позволяет успешно синтезировать различные гибридные молекулы.

Существует большое число методов синтеза олигонуклеотидов, содержащих нуклеофильные группировки

(например, amino- или тиогруппы),¹ для введения которых в большинстве случаев используют коммерчески доступные реагенты. В то же время получение олигонуклеотидов, содержащих реакционноспособные электрофильные группы (карбоксильные или альдегидные), является достаточно сложной задачей. Объем работ по этой тематике весьма ограничен.[†] По-видимому, анализ и систематизация существующих литературных данных могли бы способствовать дальнейшему развитию методов синтеза олигонуклеотидов с электрофильными группировками.

Введение карбоксильной или альдегидной функции может быть осуществлено в любое заранее заданное положение синтетического фрагмента ДНК: по 5'-, 3'-концу или в середину цепи олигомера. Данный признак был выбран нами в качестве основополагающего при классификации методов получения модифицированных олигонуклеотидов.

Во всех обсуждаемых работах олигонуклеотиды были синтезированы автоматическим твердофазным амидофосфитным методом по стандартному регламенту.^{1,2} Мы не рассматриваем получение олигонуклеотидов, содержащих диальдегидную группировку, поскольку этой теме посвящен обзор³. За рамками настоящего обзора остались также стандартные методы выделения модифицированных олигонуклеотидов (обращенно-фазовая, ионообменная ВЭЖХ, электрофорез в полиакриламидном геле) и способы подтверждения строения промежуточных и целевых соединений, так как в абсолютном большинстве работ осуществлен корректный анализ с использованием спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии.

А.В.Качалова. Аспирантка кафедры химии природных соединений химического факультета МГУ. Телефон: (095) 939–3148, e-mail: ancha77@yandex.ru

Е.М.Зубин. Кандидат химических наук, научный сотрудник той же кафедры. Телефон: (095) 939–3148, e-mail: zubin@bioorg.chem.msu.ru

Т.С.Орещкая. Доктор химических наук, профессор той же кафедры. Телефон: (095) 939–5411, e-mail: oretskaya@belozersky.msu.ru

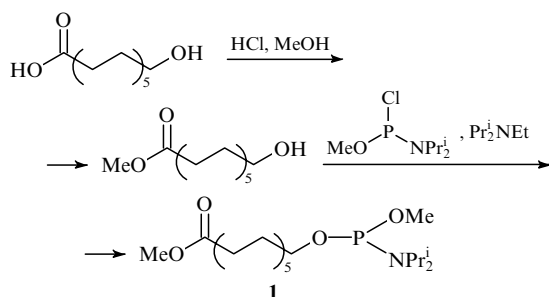
Область научных интересов авторов: синтез модифицированных нуклеозидов и их аналогов, автоматический твердофазный синтез модифицированных олигонуклеотидов, НК-белковые взаимодействия.

[†] Небольшая часть работ по синтезу 5'-карбоксил- и альдегидсодержащих олигонуклеотидов была кратко рассмотрена в обзоре¹, посвященном синтезу различных производных фрагментов нуклеиновых кислот.

II. Синтез олигонуклеотидов, содержащих 5'-концевую карбоксильную или альдегидную группу

Для введения карбоксильной группировки по 5'-концу олигонуклеотида обычно используют модифицированное звено ненуклеозидной природы, которое присоединяют к олигонуклеотидной цепи на последней стадии автоматического синтеза. При этом желательно, чтобы карбоксильная функция в ходе твердофазного синтеза была защищена, для чего ее превращают в сложный эфир.

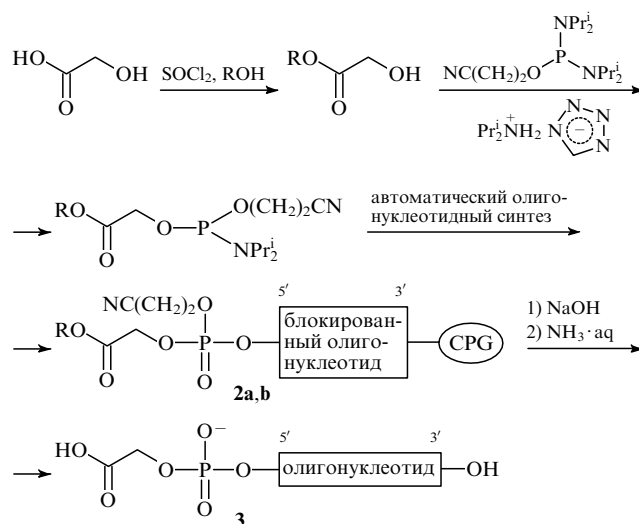
В работе⁴ описан метод получения карбоксилсодержащих олигонуклеотидов с использованием амидофосфитного производного метилового эфира 12-гидроксидекановой кислоты **1**, синтез которого проводили по приведенной ниже схеме.



Присоединение амидофосфита **1** к олигонуклеотидной цепи осуществляли в соответствии со стандартным регламентом автоматического олигонуклеотидного синтеза. 5'-Сложноэфирную группу гидролизовали водным раствором триметиламина ($\text{Me}_3\text{N}:\text{H}_2\text{O} = 3:1$, 37°C, 48 ч), после чего целевой олигонуклеотид деблокировали обработкой аммиком. Такая последовательность реакций была выбрана, поскольку при действии концентрированного водного раствора аммиака на сложный эфир происходит образование соответствующего амида.

Реакционную способность введенной карбоксильной группы подтверждали ее взаимодействием с аминами в присутствии 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида (DEC).⁴ Авторы отмечают, что при концентрации амина $5 \cdot 10^{-3}$ моль \cdot л⁻¹ и pH 4.0 в ходе конденсации происходит образование *N*-ацилмочевины. Предполагают, что причиной этого является протонирование свободной аминогруппы нуклеофила в кислой среде. Попытки избежать образования побочного продукта за счет увеличения концентрации амина до 0.1–0.5 моль \cdot л⁻¹ или повышения pH до 5.5–6.7 оказались неудачными. Проблему удалось решить путем добавления в реакционную смесь имидазола, который взаимодействует с *O*-ацилизмочевинной с образованием активного промежуточного соединения — имидазолида кислоты, реагирующего с амином. Быстрое образование имидазолида предотвращает протекание *O*→*N*-ацильной миграции. Таким способом удалось получить конъюгаты 5'-карбоксилсодержащего олигонуклеотида с аминами с количественными выходами.⁴

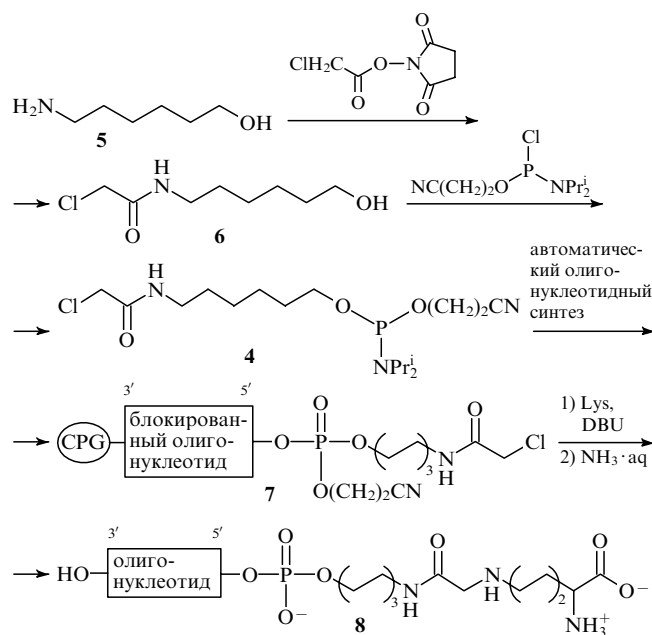
В работе⁵ описан метод синтеза модифицированных олигонуклеотидов **2a,b**, содержащих на 5'-концах сложноэфирные группы, постсинтетической обработкой которых 0.1 М NaOH (4 ч, 20°C), а затем концентрированным водным раствором аммиака (7 ч, 55°C) получен 5'-карбоксилсодержащий олигомер **3**.



R = Cl(CH₂)₂ (**2a**), CF₃CH₂ (**2b**); CPG — стекло с определенным размером пор.

Аналогичный метод синтеза 5'-карбоксилсодержащих олигонуклеотидов предложен Гузаевым и сотр.⁶ В данном случае в автоматический олигонуклеотидный синтез вводили амидофосфит **4** ненуклеозидной природы, полученный обработкой 6-аминогексанола (**5**) *N*-гидроксисукцинимидным эфиром хлоруксусной кислоты и последующим фосфитилированием соединения **6**. Авторы работы⁶ отмечают, что попытка синтезировать бромацетамидный аналог амидофосфита **4** приводит к образованию продуктов реакции Михаэлиса — Арбузова, что было показано с помощью спектроскопии ЯМР ³¹P. Наличие в целевом амидофосфите **4** как нуклеофильного, так и электрофильного реакционных центров делает его нестабильным при хранении, поэтому соединение **4** сразу же после получения вводили в автоматический олигонуклеотидный синтез.

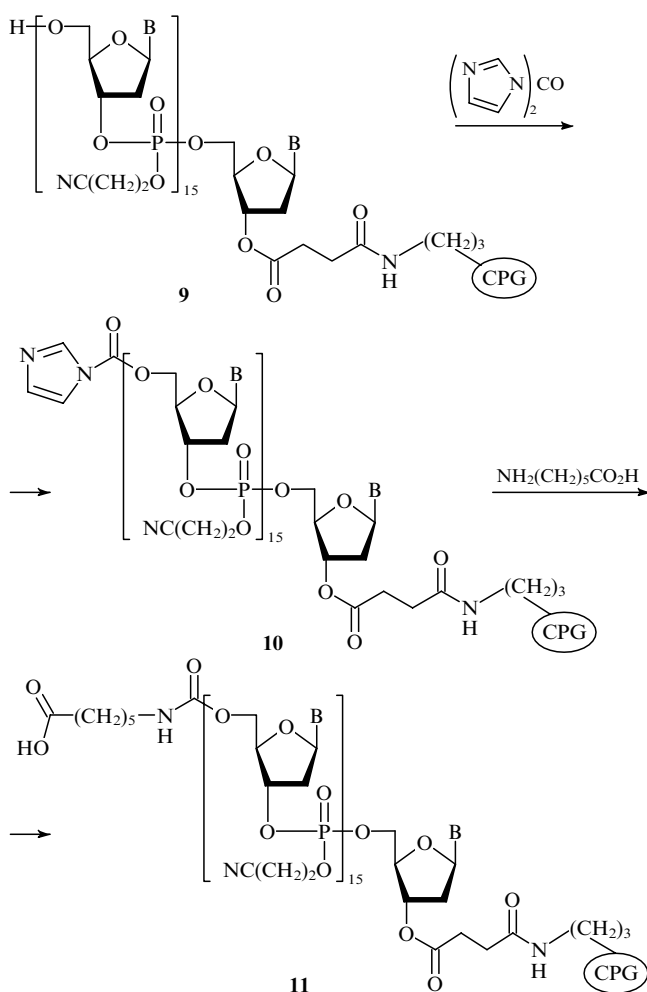
Постсинтетическая обработка модельных олигонуклеотидов **7** раствором лизина в присутствии основания — 1,8-дизабицикло[5.4.0]ундец-7-ена (DBU), — а затем концентрированным водным раствором аммиака позволила получить олигомеры **8** с 5'-концевой карбоксильной функцией. Следует отметить, что из производных **7** можно синте-



зировать модифицированные олигонуклеотиды, содержащие различные функциональные группировки.

Интересный метод получения олигонуклеотидов с 5'-концевой карбоксильной группой описан в работе⁷. Авторы предложили вводить карбоксильную функцию после завершения автоматического олигонуклеотидного синтеза.

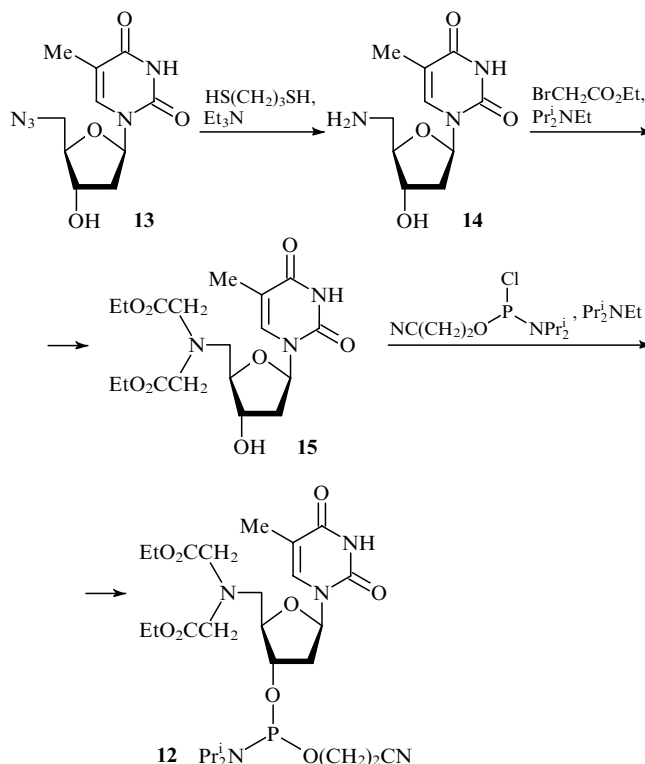
В данном случае 5'-концевую гидроксильную группу олигонуклеотида **9** активировали 1,1'-карбонилдимидазолом, после чего производное **10** вводили в реакцию с 6-аминогексановой кислотой в пиридине с образованием карбоксилсодержащего олигонуклеотида **11**.



B — гетероциклическое основание.

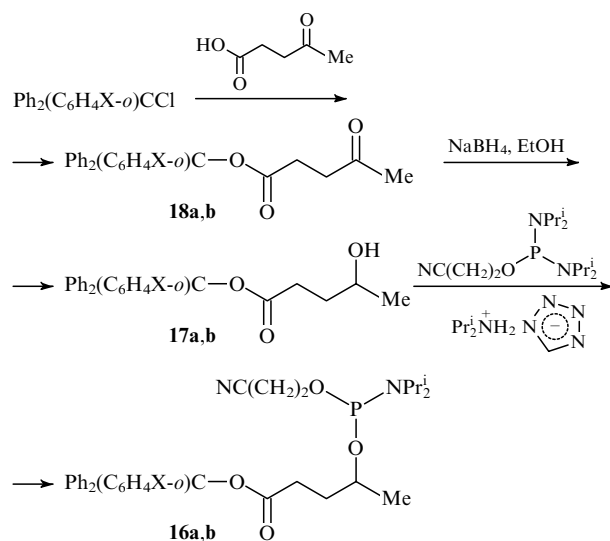
После отщепления соединения **11** от твердой фазы и деблокирования функциональных групп авторами работы⁷ было осуществлено присоединение к нему интеркалятора — дауномицина.

Оригинальный метод получения модифицированных олигонуклеотидов, содержащих на 5'-конце остаток иминокислоты, предложен авторами работы⁸. Амидофосфитное производное **12** синтезировали, используя в качестве исходного соединения 5'-азидо-5'-дезокситимидин (**13**). Восстановлением азида под действием пропан-1,3-дитиола получали нуклеозид **14** с 5'-аминогруппой, алкилирование которой этиловым эфиром бромуксусной кислоты и дальнейшее фосфитилирование производного **15** приводили к 5'-модифицированному амидофосфиту **12**. Полученное соединение вводили в стандартный автоматический олигонуклеотидный синтез, после завершения которого сложный эфир гидролизовали водным раствором гидроксида натрия.



Метод синтеза олигонуклеотидов с 5'-концевой карбоксильной функцией, описанный в работе⁹, основан на использовании модифицированного амидофосфитного производного **16a**, которое вводили в автоматический олигонуклеотидный синтез на последней стадии. В качестве защиты для карбоксильной функции были выбраны 2-хлортритильная и тритильная группы, достаточно часто применяющиеся в пептидном синтезе,¹⁰ которые могут быть удалены мягкой кислотной обработкой.

Исходные амидофосфиты **16a,b** получали фосфитилированием 2-хлортритилового (**17a**) и тритилового (**17b**) эфиров 4-гидроксивалериановой кислоты, образовавшихся при восстановлении соответствующих оксопроизводных **18a,b** боргидридом натрия, 2-цианэтил-*N,N,N',N'*-тетраизопропилдиамидофосфитом. Поскольку суммарный выход целевого соединения **16a** оказался гораздо выше, чем соединения **16b**, а



X = Cl (a), H (b).

также в связи с более высокой стабильностью 2-хлортритильной группы в условиях автоматического синтеза для получения модифицированных олигонуклеотидов **19** с 5'-концевой карбоксильной функцией в дальнейшем было использовано амидофосфитное производное **16a**. 5'-Концевую 2-хлортритильную защитную группировку удаляли в стандартных условиях. В образовавшемся целевом олигонуклеотиде **19** карбоксильную функцию активировали смесью 1-гидроксibenзотриазола (НОВТ) и гексафторфосфата *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилурия (НВТУ) (40 мин, 35°C). Активированные таким образом олигонуклеотиды были использованы авторами работы⁹ в твердофазном синтезе ряда конъюгатов модифицированных олигонуклеотидов с различными нуклеофильными компонентами, в том числе с флуоресцентными метками и короткими пептидами (схема 1).

Введение альдегидной функции по 5'-концу олигонуклеотида описано в работе⁴. 5'-Концевую сложноэфирную группу предварительно синтезированного олигомера **20** деблокировали водным раствором триметиламина и полученное соединение **21** вводили в реакцию с 3-аминопропан-1,2-диолам в присутствии DEC и имидазола с образованием вицинального диола **22**. Последний является предшественником альдегида, который генерируется в результате окисления диола **22** периодатом натрия (схема 2).

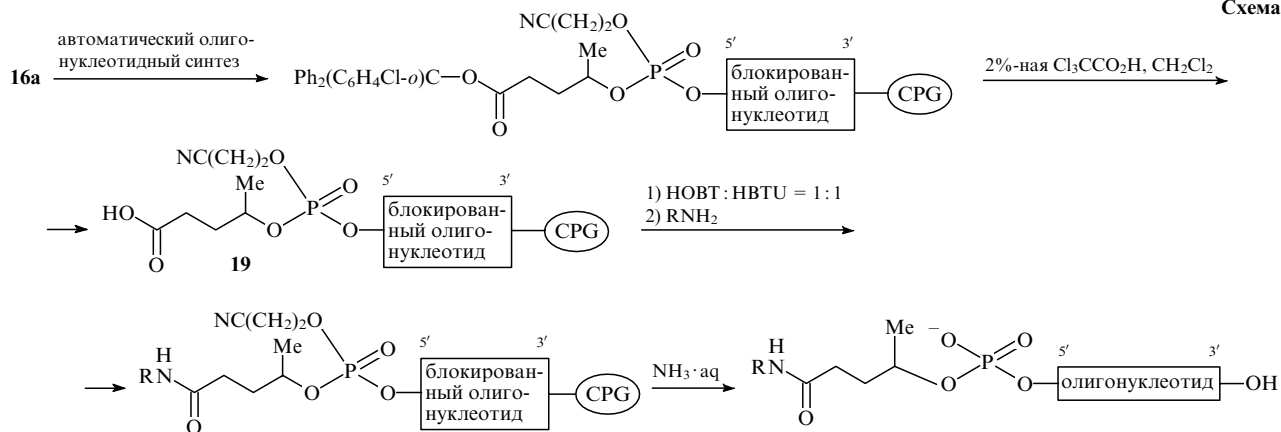
Авторы работы⁴ отмечают, что окисление вицинального диола **22** следует проводить непосредственно перед дальнейшей модификацией олигонуклеотида **23**, так как альдегидная группа может реагировать с аминогруппами гетероциклических оснований. Реакционную способность введенной альдегидной функции подтверждали взаимодействием олигонуклеотида **23** с гидразидом биотина с последующим восстановлением полученного ацилгидразона цианборгидридом натрия.

Введение альдегидной группы по 5'-концу олигонуклеотида можно осуществить с использованием другого подхода, не требующего предварительного получения карбоксилсодержащего олигомера. Для этого в олигонуклеотидную цепь на последней стадии автоматического синтеза включают амидофосфитное производное альдегидсодержащего нуклеозида (или звена ненуклеозидной природы) либо его предшественника. Очевидно, что в первом случае карбонильная группа должна быть блокирована. Блокирование осуществляют для предотвращения побочных реакций как в процессе самого синтеза, так и в процессе постсинтетических обработок. К настоящему времени предложена лишь одна защитная группа — 1,3-ди(*m*-хлорфенил)имидазолидиновая, — удовлетворяющая требованиям, которые предъявляются к защитным группам в автоматическом олигонуклеотидном синтезе,¹¹ однако она не получила широкого распространения.

Проблем, связанных с протеканием побочных реакций по альдегидной группе, можно избежать, введя в олигонуклеотидную цепь не само альдегидсодержащее звено, а его предшественник — вицинальный диол. Так, авторы работы¹² для получения олигонуклеотидов, содержащих альдегидную функцию на 5'-конце, первоначально синтезировали амидофосфитное производное **24**.

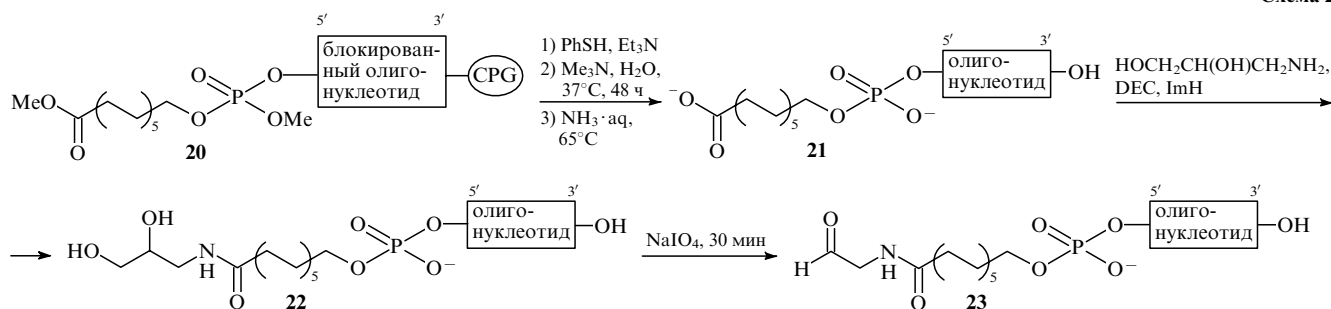
В качестве исходного соединения в синтезе амидофосфита **24** использовали спирт **25**. Соединение **25** превращали в *трет*-бутилдиметилсилиловый эфир **26**, который окисляли каталитическими количествами тетраоксида осмия в присутствии *N*-оксида *N*-метилморфолина до вицинального диола **27**. После бензоилирования диола **27** снимали *трет*-бутилдиметилсилильную защиту с помощью тетрабутиламмонийфторида, затем фосфитилировали соединение **28**.

Схема 1

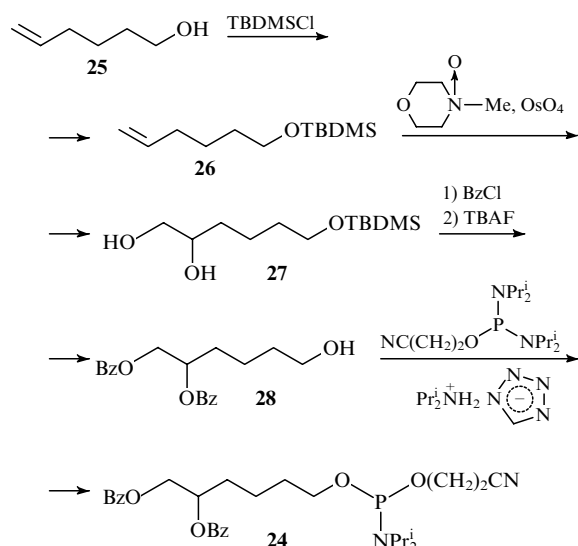


R — остаток аминов, аминокислот, пептидов.

Схема 2



ImH — имидазол.

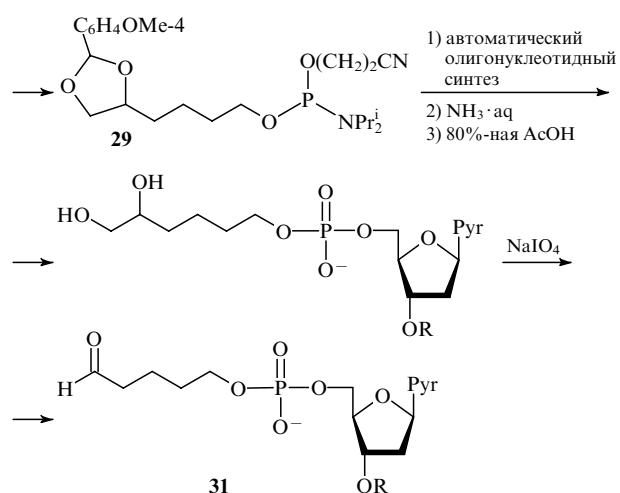
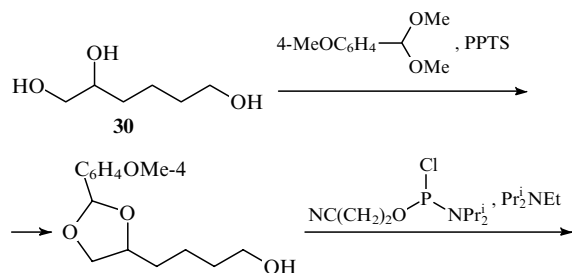


TBDMS = Bu^tMe₂Si, TBAF = Bu₄F⁺F⁻.

Полученное амидофосфитное производное **24** вводили в автоматический олигонуклеотидный синтез, после окончания которого удаляли защиты концентрированным водным раствором аммиака. Окисление *виц*-диольных групп в составе полученных олигомеров периодатом натрия так же, как и в работе ⁴, проводили непосредственно перед дальнейшими превращениями альдегидной функции.¹²

Метод синтеза олигонуклеотидов с 5'-концевой альдегидной группой, предложенный Форже с сотр.,¹³ также предполагает введение модифицированного амидофосфита **29** в автоматический синтез на последней стадии. Авторы отмечают, что выбранная ими двухстадийная схема получения соединения **29** является более простой и удобной по сравнению с предложенной в работе ¹².

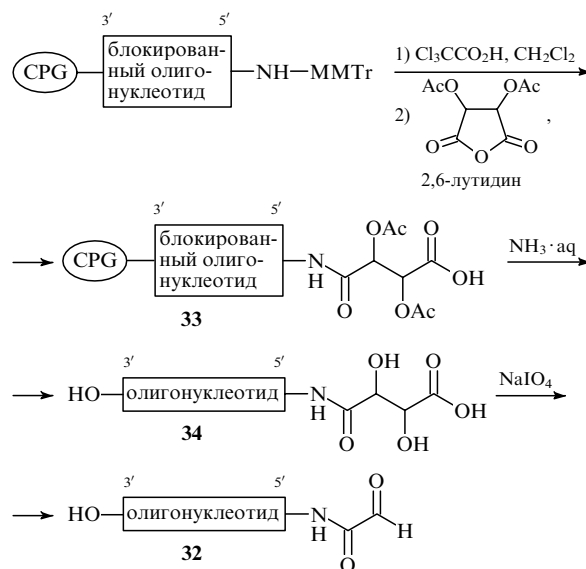
виц-Диольный фрагмент коммерчески доступного 1,2,6-гексантиола (**30**) селективно блокировали 4-метоксibenзильденовой защитной группой под действием диметилацетата 4-метоксibenзальдегида в присутствии каталитических количеств *n*-толуолсульфоната пиридиния (PPTS). Данная защитная группировка остается стабильной в условиях автоматического олигонуклеотидного синтеза и деблокируется 80%-ным водным раствором уксусной кислоты в течение часа. Кроме того, гидрофобные свойства этой защитной группы позволяют использовать ее в качестве аналога диметокситрилитильной группировки при выделении целевых олигомеров в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. На последней стадии синтеза обработка деблокированных олигонуклеотидов 50-кратным избытком периодата натрия (30 мин, 20°C) позволила получить модифицированные олигонуклеотиды **31**, содержащие альдегидную функцию на 5'-конце. Синтезирован ряд конъюгатов олигонуклеотидов **31** с пептидами¹³ и сахарами,¹⁴ содержащими аминooksигруппы.



Pyr — пиримидиновое гетероциклическое основание,
R — фрагмент олигонуклеотидной цепи.

В работе ¹⁵ предложен оригинальный метод синтеза олигонуклеотидов **32**, содержащих на 5'-конце остаток амида глиоксильной кислоты. Данная функциональная группа без активации вступает в реакции с гидразинами, гидроксилами и ω-аминотиолами, однако, в отличие от альдегидной функции, остается стабильной при хранении.

Для получения модифицированных олигонуклеотидов **32** на последней стадии автоматического синтеза в олигомерную цепь вводили коммерчески доступный амидофосфит, содержащий линкер с блокированной аминогруппой. Монокситрилитильную защиту удаляли раствором трихлоруксусной кислоты в хлористом метиле и свободную аминогруппу ацилировали ангидридом диацетилвинной кислоты в присутствии лутидина. В образовавшемся модифицированном олигонуклеотиде **33** ацетильные группы деблокировали концентрированным водным раствором аммиака, при этом амидная связь оставалась стабильной в условиях аммонолиза. С помощью окислительного расщепления вицинального диола **34** периодатом натрия (1.7 экв. NaIO₄, pH 6.6) получали модифицированные олигомеры **32** с 5'-концевой глиоксиламидной группой, которые были далее использованы для получения олигонуклеотидопептидных конъюгатов.

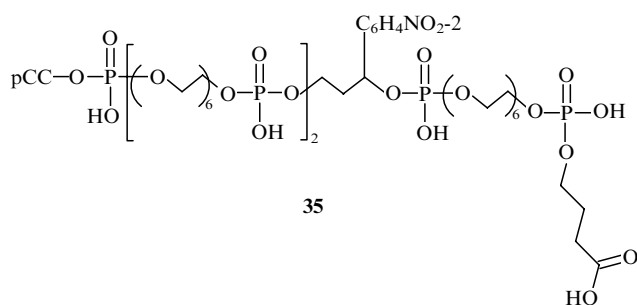


MMTr = (4-MeOC₆H₄)Ph₂C.

III. Синтез олигонуклеотидов, содержащих 3'-концевую карбоксильную или альдегидную группу

В настоящее время синтез олигонуклеотидов с 3'-концевой карбоксильной или альдегидной функцией чаще всего также осуществляют путем введения дополнительного звена нуклеозидной природы. Существуют два различных подхода к получению модифицированных по 3'-концу олигонуклеотидов. Согласно одному из них, первоначально к полимерному носителю присоединяют фрагмент, содержащий блокированную гидроксильную группу. После проведения олигонуклеотидного синтеза в ходе химического или фотолитического расщепления ковалентной связи между полимером и линкером на 3'-конце олигонуклеотида возникает реакционноспособная электрофильная группировка. Другой вариант предполагает введение карбоксильной или карбонильной функции уже после отщепления синтезированного олигонуклеотида от полимерного носителя. В целом методы получения олигонуклеотидов с 3'-концевыми реакционноспособными электрофильными группировками обладают существенным недостатком — в обоих случаях принцип введения функциональной группы не позволяет проводить дальнейшие взаимодействия с нуклеофильным компонентом на твердой фазе.

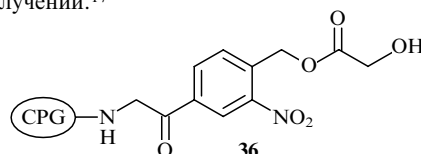
Авторы работы¹⁶ синтезировали динуклеотид **35**, содержащий на 3'-конце фотолабильную *o*-нитрофенильную группу и карбоксильную функцию, которая в дальнейшем использовалась для присоединения аминов.



После завершения твердофазного синтеза динуклеотид, иммобилизованный на полимере посредством сложноэфирной связи, обрабатывали 33%-ным водным раствором триэтиламина (60°C, 12 ч) для отщепления от носителя, а затем концентрированным аммиаком с целью удаления защитных групп. Концевая карбоксильная группа может быть использована для присоединения к олигонуклеотиду репортерных молекул, которые за счет наличия фотолабильного фрагмента можно избирательно отщеплять.

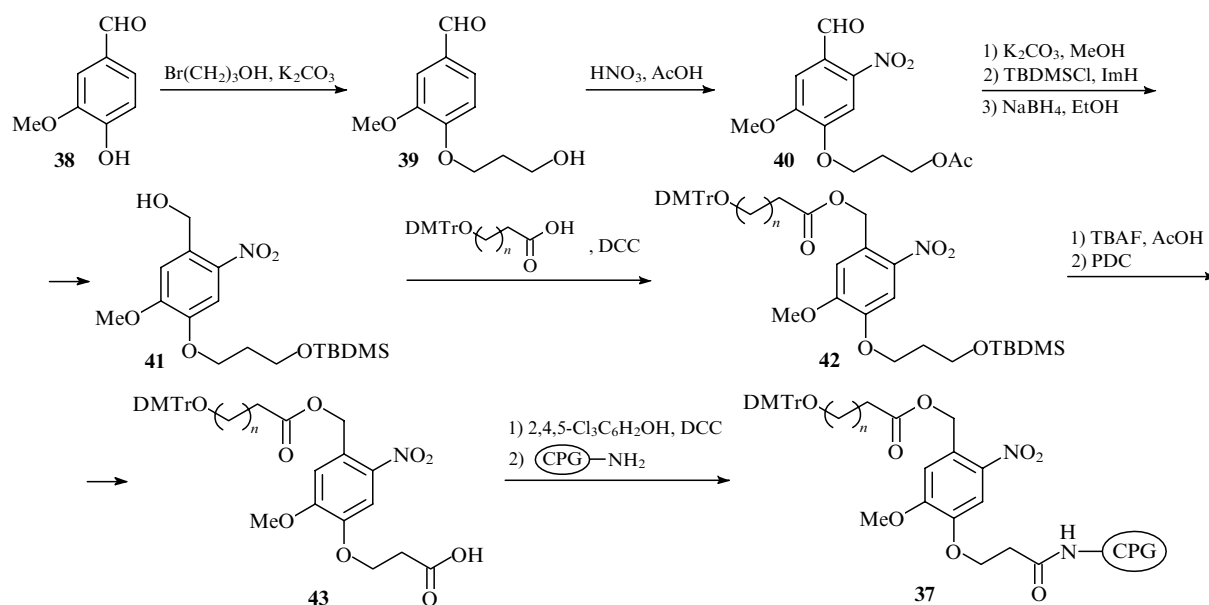
Во многих случаях при синтезе конъюгатов нуклеотидов с пептидами важное значение приобретает возможность селективного отщепления олигонуклеотида от полимерного носителя без одновременного удаления всех защитных групп. Для достижения этой цели Гринберг с сотр.^{17–19} предложили использовать полимерные носители, модифицированные фотолабильными группировками.

Первоначально для синтеза карбоксилсодержащих олигонуклеотидов был использован подход, при котором первое нуклеозидное звено присоединяли к полимеру **36** через фотолабильный *o*-нитробензильный линкер. На последней стадии синтеза олигонуклеотиды отщепляли от полимера под действием света с длиной волны ~400 нм. Выход модифицированных олигомеров составил не более 62%, что объясняется, по-видимому, деструкцией целевого продукта при облучении.¹⁷



Для уменьшения времени фотолиза авторы работы¹⁸ использовали для получения олигонуклеотидов полимер **37** с линкером переменной длины между первым нуклеозидным звеном и фотолабильной группой. Исходным соединением в синтезе полимерного носителя **37** являлся ванилин (**38**) (схема 3). На первой стадии ванилин алкилировали 3-бромпропанолом, а затем нитровали интермедиат **39** в ледяной уксусной кислоте, при этом одновременно происходило его *O*-ацетилирование с образованием производного **40**. Удаление ацетильной и введение *tert*-бутилдиметилсилильной

Схема 3



DMTr = (4-MeOC₆H₄)₂PhC, $n = 1-4$, PDC — дихромат пиридиния, DCC =

защиты с дальнейшим восстановлением формильной группы до гидроксиметильной приводили к замещенному бензильному спирту **41**. Конденсацией соединения **41** с соответствующей блокированной гидроксикарбоновой кислотой в присутствии дициклогексилкарбодиимида получали производное **42**, в котором одну из защищенных гидроксильных групп в результате селективного деблокирования и последующего окисления дихроматом пиридиния превращали в карбоксильную.

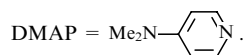
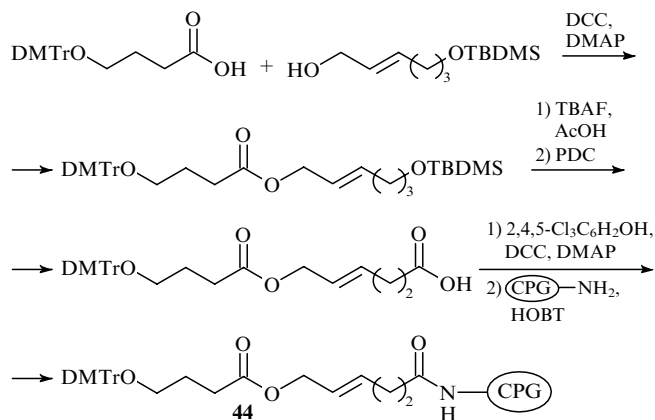
Иммобилизацию полученного соединения **43** на полимерном носителе осуществляли методом активированных трихлорфениловых эфиров на последней стадии синтеза. Чтобы минимизировать образование возможных побочных продуктов, непрореагировавшие аминогруппы полимера ацетилировали.

Использование полимерного носителя **37** позволило добиться количественных выходов целевых олигонуклеотидов с карбоксильной функцией на 3'-конце. Выход модифицированного олигонуклеотида определяли как отношение количества модифицированного олигомера, полученного после фотолиза и деблокирования концентрированным водным раствором аммиака, к количеству такого же олигомера, полученного после аммиачной обработки без предварительного облучения.

Полученные олигонуклеотиды без удаления защитных групп далее применяли для синтеза конъюгатов с пептидами и флуоресцентными метками.¹⁹ Реакции проводили в органической среде, карбоксильные группы активировали смесью НОВТ и НВТУ (НВТУ:НОВТ:пептид = 1:1:5) в присутствии диизопропилэтиламина. Выходы конъюгатов составили 85–100%.

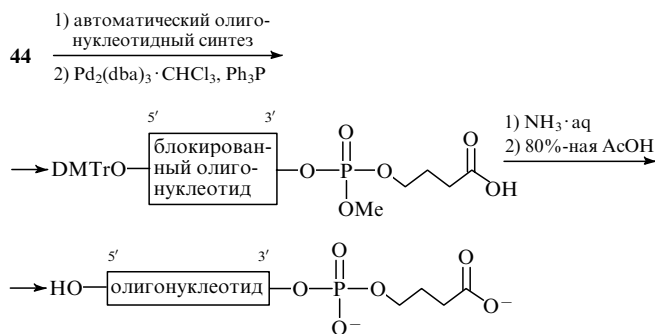
В работе²⁰ для синтеза олигонуклеотидов с 3'-концевой карбоксильной группой было предложено использовать полимерный носитель **44** с линкерным звеном, содержащим аллиловый эфир, который селективно расщепляется под действием палладиевого катализатора.²¹ Это свойство позволяет удалять модифицированный олигонуклеотид с полимерного носителя без деблокирования функциональных групп.

Синтез модифицированного полимера **44** осуществляли по приведенной ниже схеме.



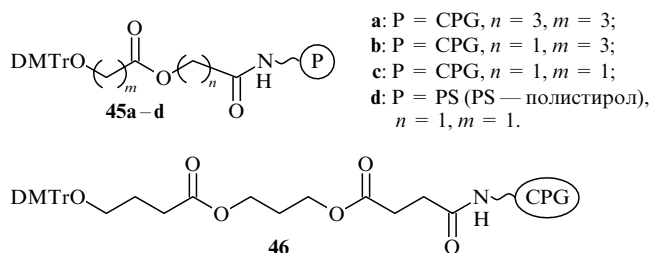
Использование полимерного носителя **44** предполагает изменение стандартного регламента автоматического синтеза. На стадии окисления межнуклеотидных фосфитных групп вместо раствора иода в смеси пиридин–вода, способного вызывать иодирование двойной связи, авторы работы²⁰ применили *трет*-бутилпероксид. Кроме того, для защиты межнуклеотидных фосфатных групп использовали метильную группировку вместо β -цианэтильной. Это связано с тем, что

при расщеплении сложноэфирной связи между олигонуклеотидом и полимерным носителем действием трис(дибензилиденацетон)дипалладия(0) и трифенилфосфина в смеси *n*-бутиламина и 1.2 М муравьиной кислоты при 55°C β -цианэтильная защитная группировка отщепляется полностью за 1 ч, в то время как удаление метильной группы в тех же условиях протекает незначительно (10% за 7 ч). Этим методом авторы работы²⁰ синтезировали ряд модифицированных олигонуклеотидов.

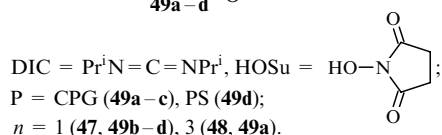
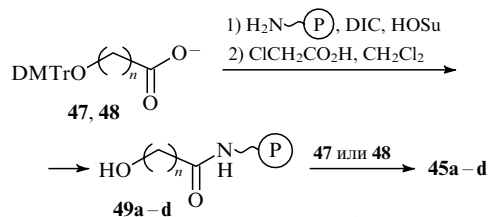


dba — дибензилиденацетон.

Поскольку функциональные группировки вводят на 3'-конец олигонуклеотида за счет расщепления сложноэфирной связи между твердой фазой и олигомером, к полимерным носителям предъявляются достаточно жесткие требования в отношении стабильности и реакционной способности сложноэфирного фрагмента. Для выявления полимерного носителя, который наилучшим образом отвечает указанным требованиям, авторами работ^{22, 23} была синтезирована серия гомологичных полимеров **45a–d** и **46**.

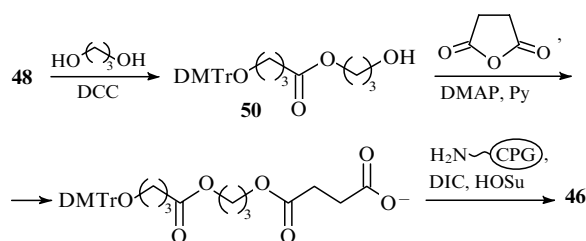


Полимерные носители **45a–d** получали взаимодействием блокированных диметокситрильной защитной группой гликолевой (**47**) и 4-гидроксимасляной кислот (**48**) с аминогруппами полимера в присутствии *N,N'*-диизопропилкарбодиимида и *N*-гидроксисукцинимид. После детритилирования полимеры **49a–d** вводили в реакцию с защищенными кислотами **47** и **48** в присутствии 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлорида и каталитических количеств *N*-метилимидазола. При использовании в качестве исходного носителя полистирола активацию карбоксильной группы в соединении

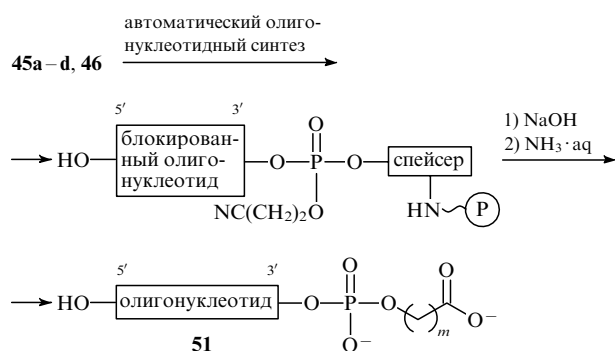


47 проводили под действием карбодиимида и *N*-гидроксисукцинимидом.

Модифицированный полимерный носитель **46** был получен этерификацией защищенной 4-гидроксимасляной кислоты **48** пропан-1,3-дионом в присутствии DCC с образованием соединения **50**, которое ацилировали янтарным ангидридом и иммобилизовали на твердой фазе карбодиимидным методом.



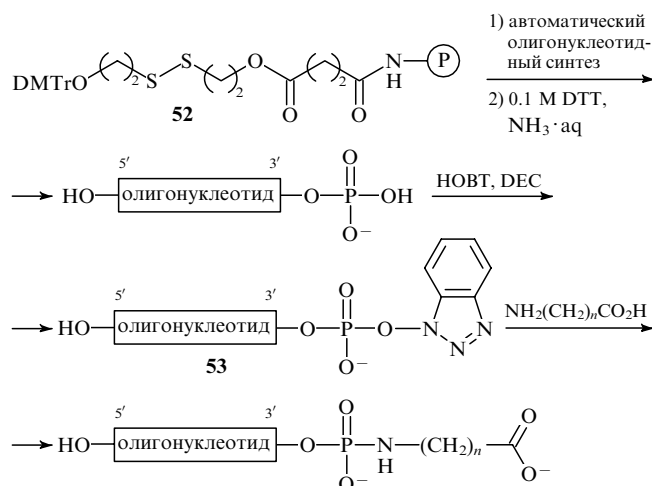
Полимерные носители **45a–d** и **46** были использованы для синтеза олигонуклеотидов **51**, содержащих 3'-концевую карбоксильную группу, амидофосфитным методом. Отщепление олигомеров от твердой фазы и деблокирование межнуклеотидных фосфатов проводили действием 0.1 М водного раствора гидроксида натрия или 0.5 М водного раствора DBU, удаление защит гетероциклических оснований достигалось дальнейшей обработкой концентрированным водным раствором аммиака.



$m = 1, 3$.

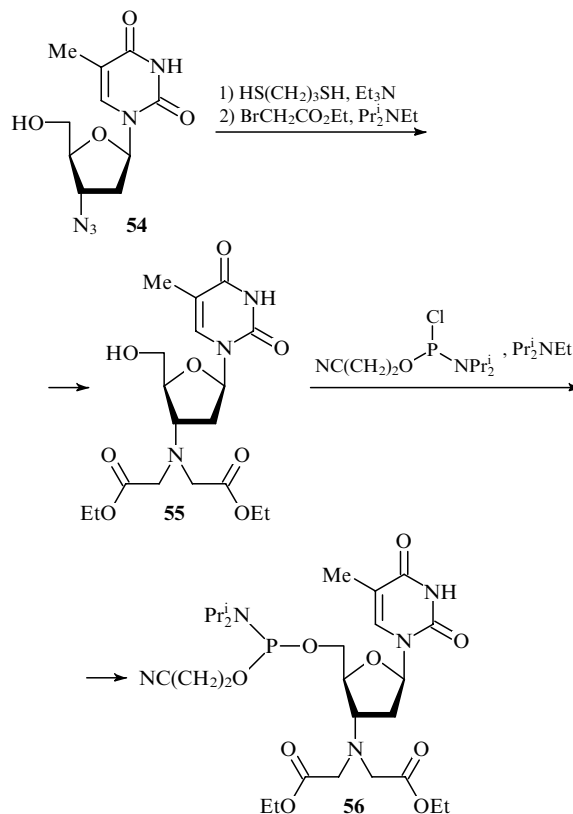
Для получения конъюгатов модифицированных олигонуклеотидов **51** с α,ω -диаминоалканами олигомеры, иммобилизованные на модифицированных носителях, обрабатывали раствором соответствующего аминокислотного компонента. Однако действие таких реагентов на олигодезоксирибонуклеотиды сопровождается переаминированием *N*-блокированных остатков цитидина. Поэтому авторы работы²³ предварительно селективно удаляли бензоильные защитные группы гетероциклических оснований цитозина и аденина раствором гидразина в уксусной кислоте. Было показано, что в этих условиях олигонуклеотиды остаются связанными с полимерными носителями.

В работе⁷ 3'-концевую карбоксильную функцию вводили в олигонуклеотид после завершения автоматического синтеза. Отщепление целевого продукта с 3'-концевой фосфатной группой от модифицированного полимера **52** происходило под действием 0.1 М раствора дитиотрейта (DTT) в концентрированном водном растворе аммиака за счет разрыва дисульфидной связи и последующей внутримолекулярной атаки образующегося сульфид-иона по атому углерода. Карбоксильную функцию вводили, действуя ω -аминокарбоновой кислотой на активированный деблокированный 3'-фосфорилированный олигонуклеотид **53**.



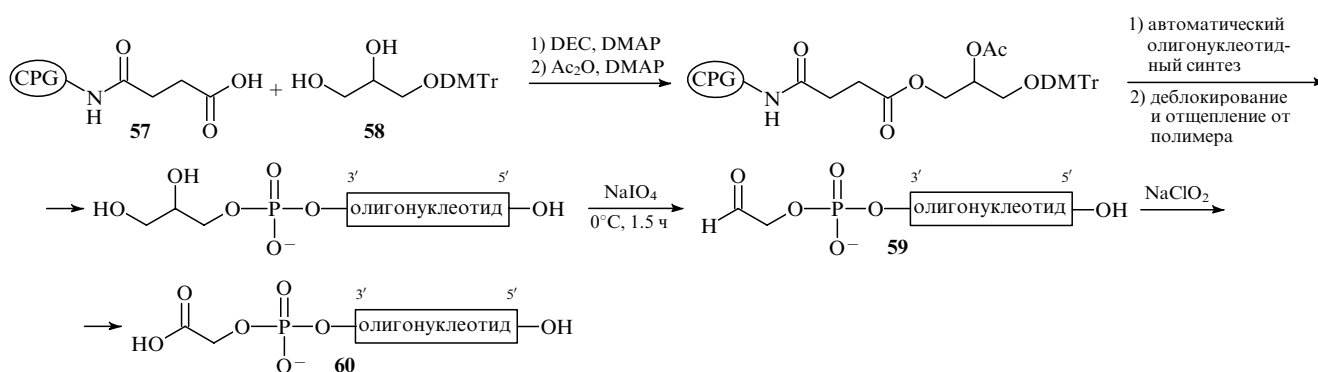
\textcircled{P} -NH—аминопропилфрактозил-500, $n = 5, 10$.

В работе⁸ описан синтез модифицированных олигонуклеотидов, содержащих на 3'-конце остаток иминодиуксусной кислоты. Такие соединения могут связывать ионы металлов, которые стабилизируют работу некоторых белков. В качестве исходного нуклеозидного компонента использовали 3'-азидо-3'-дезокситимидин (**54**), который превращали в 3'-амино-3'-дезокситимидин и алкилировали двумя эквивалентами этилового эфира бромуксусной кислоты. Образовавшийся продукт **55** превращали в модифицированное амидофосфитное производное **56**, которое вводили в олигонуклеотидный синтез на последней стадии. Нарастивание цепи осуществляли от 5'-конца олигомера к 3'-концу. После окончания синтеза карбоксильные группы целевых олигонуклеотидов деблокировали водным раствором гидроксида натрия.



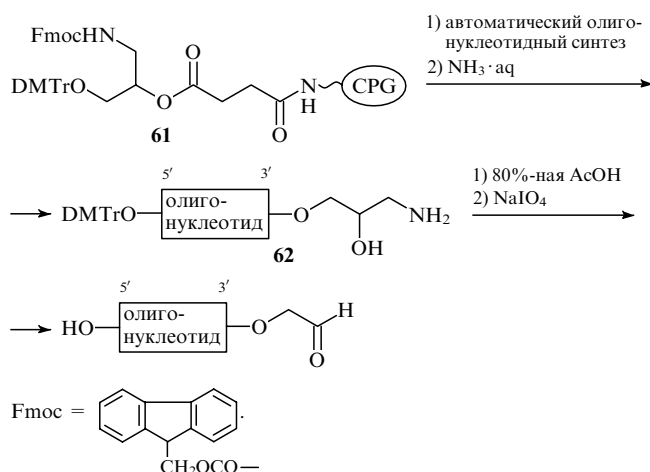
Синтез олигонуклеотидов, содержащих на 3'-конце альдегидную функцию, описан в публикации²⁴. К полимерному

Схема 4



носителю **57** действием монозамещенного глицерина **58** присоединяли линкерное звено и вводили модифицированный полимерный носитель в автоматический олигонуклеотидный синтез. После удаления защит и отщепления от полимера олигонуклеотида, содержащий фрагмент с вицинальной диольной группировкой, окисляли периодатом натрия с целью синтеза модифицированных олигомеров **59**. После обработки олигонуклеотидов **59** хлоритом натрия получили олигонуклеотиды **60**, содержащие на 3'-конце карбоксильную группу (схема 4).

В работе²⁵ предложен оригинальный метод введения альдегидной функции по 3'-концу олигонуклеотида с использованием в автоматическом синтезе коммерчески доступного полимерного носителя **61**.²⁶



Аммонолиз сложноэфирной связи между полимером и синтезированным олигонуклеотидом приводит к образованию олигомера **62**, содержащего на 3'-конце фрагмент α -аминоспирта. Последующее удаление диметокситритильной группировки и окислительное расщепление с помощью периодата натрия позволило получить олигонуклеотиды с 3'-концевой альдегидной группой.

Авторами работы²⁵ также были получены конъюгаты синтезированных олигонуклеотидов с аминоксипроизводными ряда пептидов. Реакции проводили в водном растворе, используя трехкратные избытки аминоксикомпонентов (pH 4.5, 2 ч). Выходы конъюгатов составили ~50%.

IV. Синтез олигонуклеотидов, содержащих карбоксильную или альдегидную группу в середине цепи

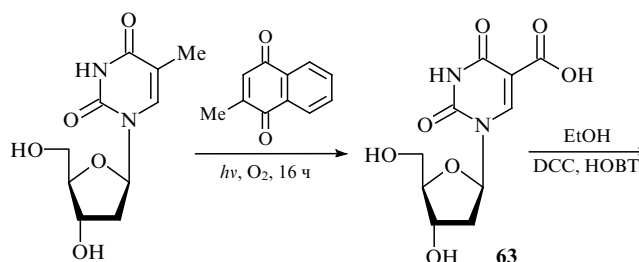
Олигонуклеотиды, содержащие электрофильную группу в середине цепи, наиболее предпочтительны для использова-

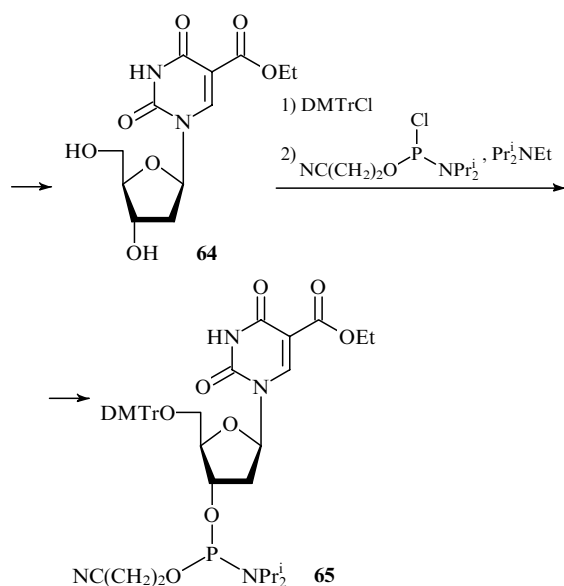
ния в молекулярно-биологических исследованиях. Такой тип модификации представляется наиболее перспективным, поскольку оставляет свободными концы олигомерной цепи, что позволяет вводить радиоактивную или флуоресцентную метку по 5'-концу, а также осуществлять дальнейшие превращения функциональной группировки на полимерном носителе, если ее можно селективно деблокировать. Активная функция может быть введена в любое заранее заданное положение олигонуклеотидной цепи: в гетероциклическое основание, 2'-положение углеводного фрагмента или по межу-нуклеотидной фосфатной группе. Наличие в цепи реакционно-способной функциональной группировки влияет на стабильность ДНК-дуплексов, образованных модифицированным олигомером и комплементарной НК-матрицей, о чем можно судить по изменению температуры плавления таких дуплексов по сравнению с температурами плавления немодифицированных аналогов.

1. Олигонуклеотиды, содержащие карбоксильную или альдегидную группу в гетероциклическом основании

Получение олигонуклеотидов, содержащих реакционно-способную электрофильную группировку в гетероциклическом основании, предполагает введение в автоматический олигонуклеотидный синтез модифицированного амидофосфитного производного, в котором карбоксильная или альдегидная группа либо блокирована, либо может образоваться при постсинтетической обработке олигомера. Наиболее легко модифицировать метильную группу тимидина. Так, авторы работы²⁷ синтезировали модифицированные олигонуклеотиды, содержащие 5-карбокси-2'-дезокситуридин **63**.

Замену метильной группы тимидина на карбоксильную производили окислением 2-метил-1,4-нафтохиноном (менадином) на воздухе при облучении светом с длиной волны 350 нм в течение 16 ч. Этерификацию карбоксильной группы в соединении **63** осуществляли в абсолютном этаноле в присутствии карбодимида и 1-гидроксibenзотриазола без предварительной защиты гидроксильных групп углеводного остатка. Полученное соединение **64** превращали в амидофосфитное производное **65**, которое встраивали в олигонуклеотидную цепь в процессе автоматического синтеза.



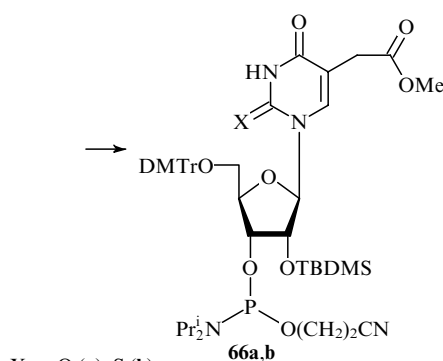
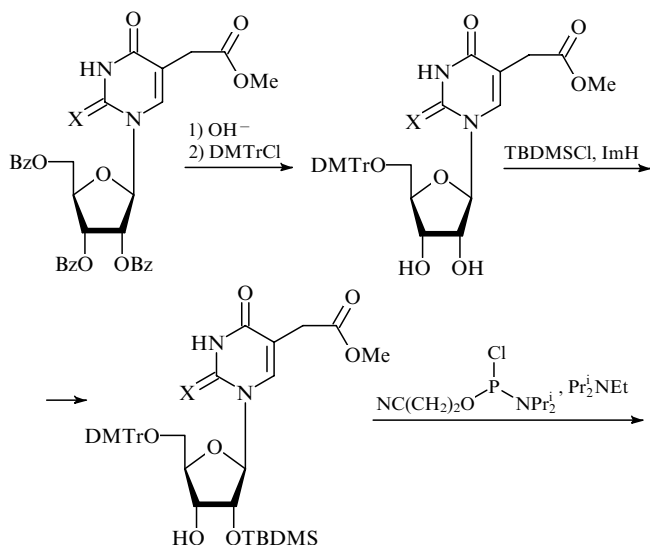


Гидролиз этилового эфира 5-карбоксии-2'-дезоксидеоксиуридина одновременно с удалением остальных защитных групп и отщеплением целевого продукта от твердой фазы проводили обработкой 0.2 М раствором гидроксида натрия в метаноле.

Для исследования взаимосвязи между структурой и биологическими свойствами антикодона домена tRNA^{lys} *E. coli* Дэвисом и сотр.^{28, 29} осуществлен синтез модифицированных фрагментов РНК, содержащих заместители с карбоксильной группой в положении 5 уридина или в положении 6 (у аминогруппы) аденозина.

В работе²⁸ описано получение модифицированных олигорибонуклеотидов, содержащих 5-метоксикарбонилметилуридин или 2-тио-5-метоксикарбонилметилуридин. Используемые для синтеза амидофосфитов **66a,b** исходные нуклеозиды получали гликозилированием по Форбрюгену³⁰ соответствующих дисилильных производных 5-метоксикарбонилметилуридина и 5-метоксикарбонилметил-2-тиоуридина действием 1-*O*-ацетил-2,3,5-три-*O*-бензоил-β-D-рибофуранозы. Последующие превращения образовавшихся рибонуклеозидов осуществляли по стандартным методикам получения амидофосфитных производных.

Соединения **66a,b** были включены в олигорибонуклеотидную цепь. Синтезированные олигомеры деблокировали 10%-ным раствором DBU в метаноле (12 ч, 25°C) и Et₃N · 3 HF, причем при обработке DBU происходило удале-



X = O (a), S (b).

ние защиты введенной карбоксильной функции. Строение модифицированных олигорибонуклеотидов подтверждено методами масс-спектрометрии и спектроскопии ЯМР ¹H. Авторы работы²⁸ обращают внимание на тот факт, что введение в фрагмент РНК остатков 5-метоксикарбонилметилуридина и 2-тио-5-метоксикарбонилметилуридина практически не влияет на термическую стабильность РНК-шпильки.

Той же группой американских исследователей описан синтез олигорибонуклеотидов, содержащих модифицированный нуклеозид **67**.²⁹ Целевое амидофосфитное производное **68**, содержащее блокированные гидроксильные и карбоксильную функции, было синтезировано исходя из аденозина (**69**) (схема 5). Ацетилированный аденозин реагировал с этилхлоркарбонатом с образованием нуклеозида **70**. Для одновременного введения карбоксильной и вторичной гидроксильной групп на соединение **70** действовали L-треонином. Для блокирования введенных функциональных групп были выбраны триметилсилилэтильная и *трет*-бутилдиметилсилильная защиты, которые могут быть удалены с помощью Et₃N · 3 HF после автоматического синтеза.

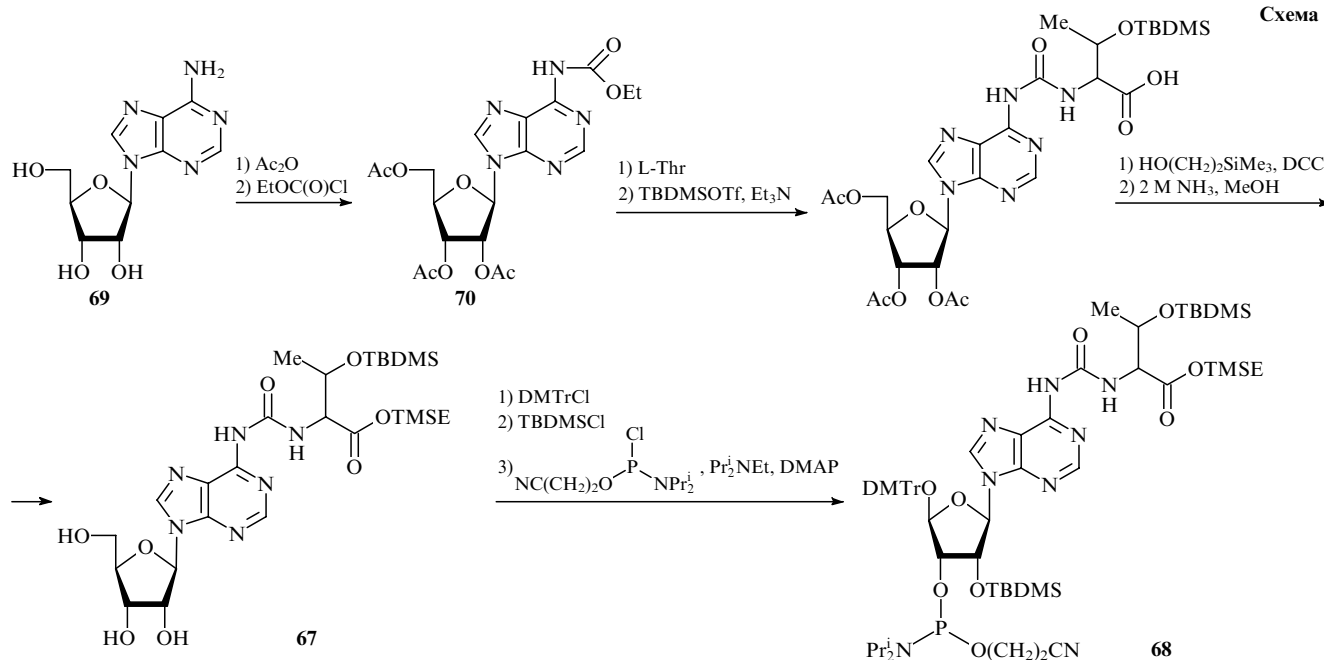
Амидофосфитное производное **68** было использовано авторами работы²⁹ для синтеза модифицированной олигорибонуклеотидной последовательности фрагмента tRNA^{lys} *E. coli*.

Интересный метод синтеза олигодезоксирибонуклеотидов, содержащих остатки 5-метоксикарбонилметилуридина, описан в работах^{31, 32}. Ключевой стадией получения модифицированного амидофосфитного производного 5-метоксикарбонилметил-2-дезоксидеоксиуридина **71** является конденсация диметил-2-бромметилфумарата (**72**) и арабиноаминооксазолина **73**, синтезированного из D-арабинозы под действием цианамида и 6 М водного раствора аммиака (схема 6). Обработка образовавшегося *O*2',2'-ангидро-5-метоксикарбонилметилуридина (**74**) уксусным ангидридом в уксусной кислоте при кипячении приводит к раскрытию ангидроцикла. Ацетильные защиты с гидроксильных групп удаляют раствором аммиака в метаноле. Образовавшийся модифицированный нуклеозид **75** может быть использован в качестве исходного соединения для синтеза олигорибонуклеотидов.

Раскрытие ангидроцикла в соединении **74** действием бромистого водорода в трифторуксусной кислоте или ацетилбромидом в ацетонитриле происходит с образованием 2'-бром-2'-дезоксидеокси-3',5'-ди-*O*-ацетил-5-метоксикарбонилметилуридина (**76**), восстановление которого водородом на палладии или гидридом трибутилолова в присутствии азобутиронитрила дает соединение **77**. Дальнейшие превращения нуклеозида **77** в амидофосфит **71** проводили по стандартным методикам.

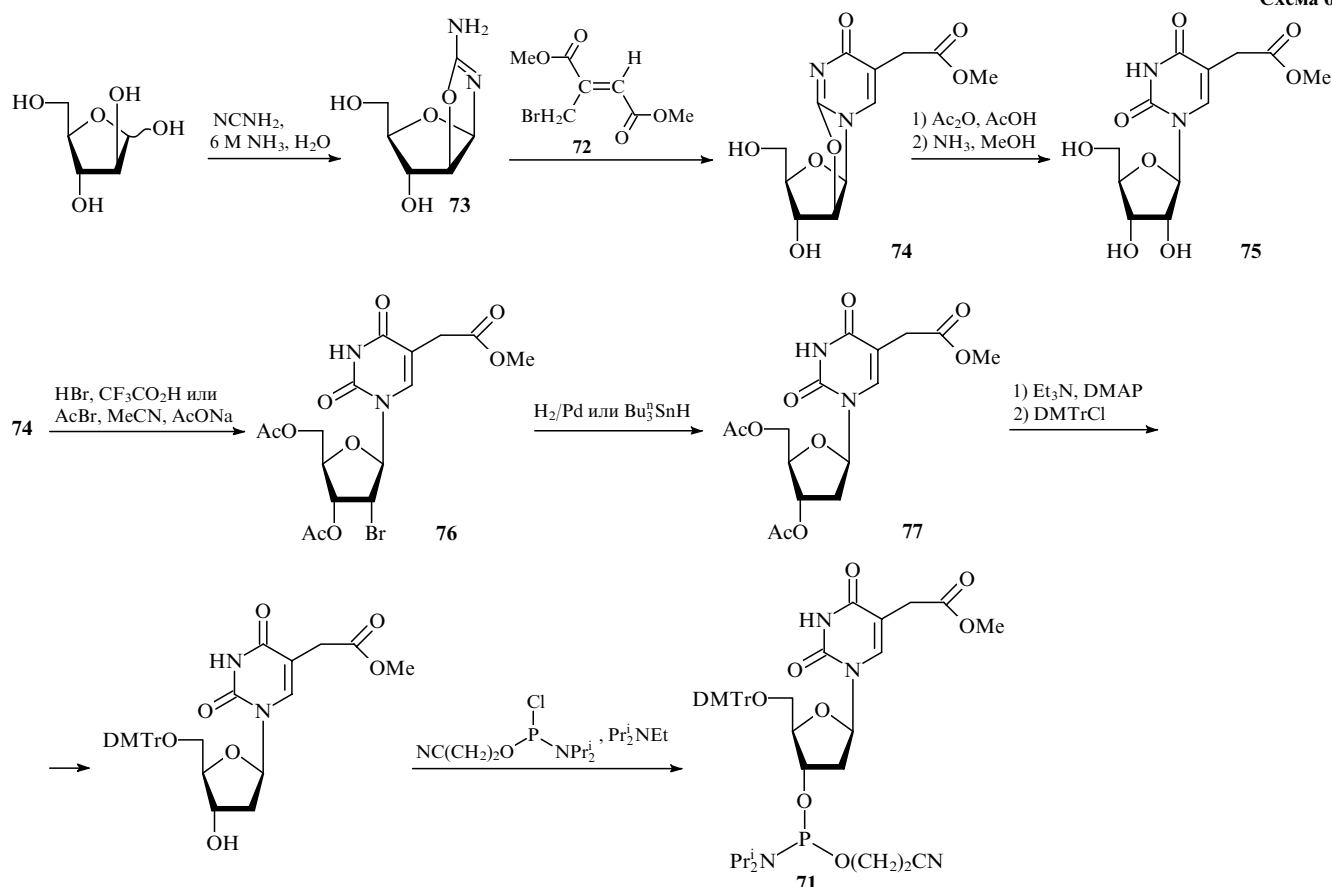
С использованием амидофосфитного производного **71** авторами работы³² были синтезированы олигонуклеотиды, содержащие заместители с защищенной карбоксильной группой в положении 5 гетероциклического основания. Наличие модифицированного звена в олигонуклеотидной цепи подтверждали ВЭЖХ-анализом продуктов ферментативного

Схема 5



Thr = NH₂CH(CO₂H)CH(OH)Me, Tf = CF₃SO₂, TMSE = Me₃Si(CH₂)₂.

Схема 6



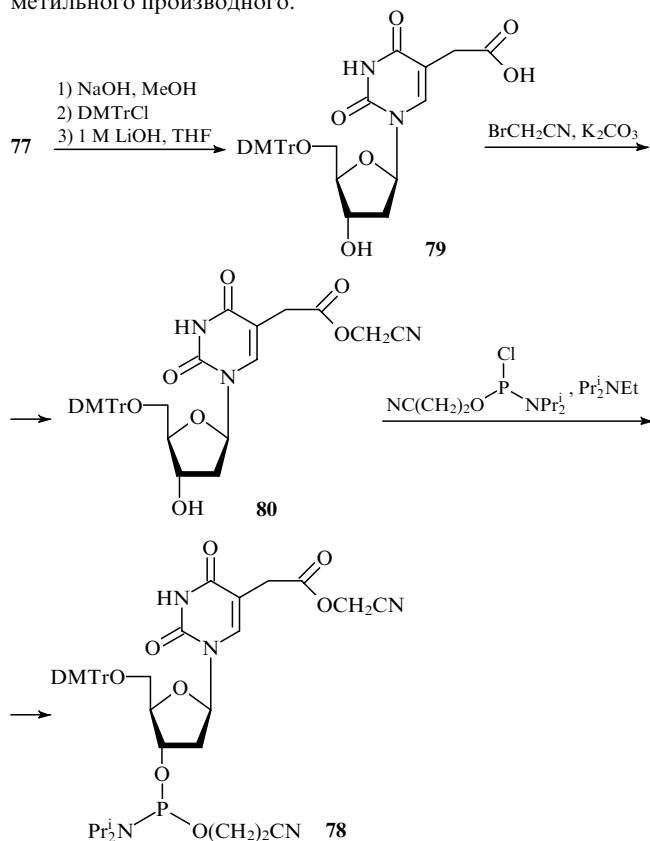
гидролиза под действием фосфодиэстеразы змеиного яда и щелочной фосфатазы.

Для получения соответствующих амидов такие олигонуклеотиды, иммобилизованные на твердой фазе, обрабатывали 50%-ными растворами диаминов в этаноле при комнатной температуре. Однако авторы работы³² отмечают, что 5-метоксикарбонилметильная группа в положении

5 является не очень активной, поэтому время реакции с диаминами составляет 12 ч.

С целью сокращения продолжительности реакции с диаминами та же группа японских ученых предложила использовать модифицированные олигонуклеотиды, в которых карбоксильная группа у заместителя в положении 5 уридина блокирована в виде цианметилового эфира.³³

Целевой амидофосфит **78** получен исходя из диацетильного производного **77**. Ключевой стадией синтеза является этерификация свободной карбоксильной функции нуклеозида **79** бромацетонитрилом в присутствии карбоната калия в гексаметилфосфотриамиде (НМРА). Выход продукта **80** составил 70%. Увеличение времени реакции и использование смеси хлорацетонитрила и триэтиламина приводит к снижению выхода эфира **80** до 30% за счет образования *N*³-цианметильного производного.

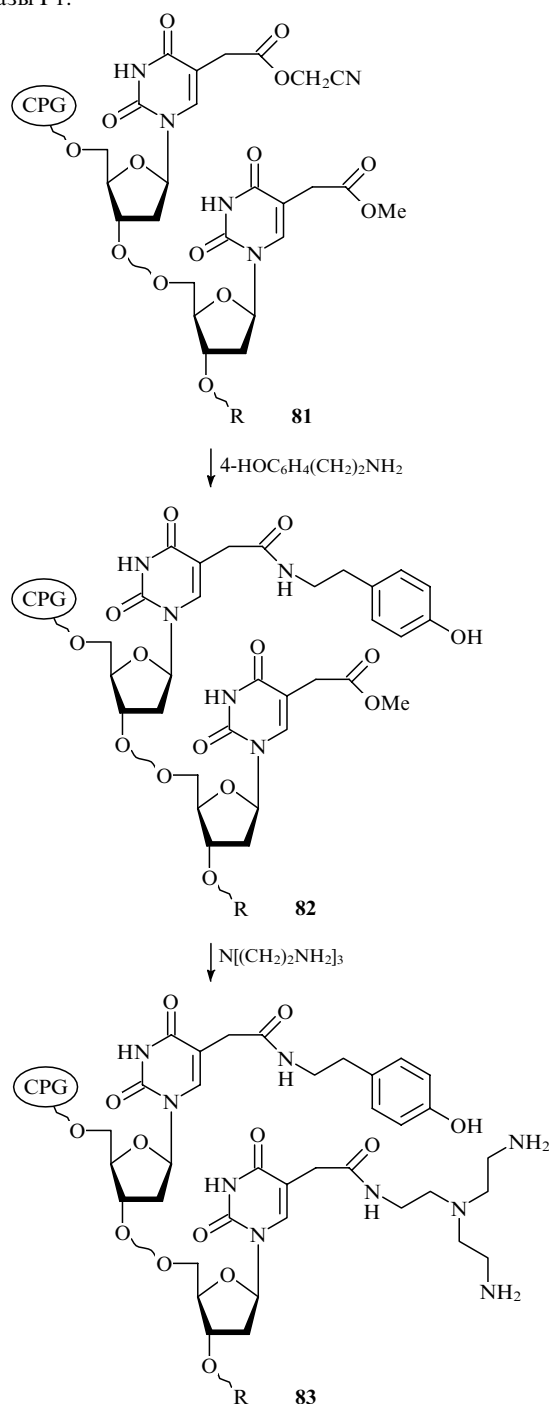


Стратегия синтеза олигомеров с цианметилированной карбоксильной группой в середине цепи аналогична описанной в работе³². Наличие модифицированного звена подтверждали ферментативным гидролизом под действием нуклеазы P1 и щелочной фосфатазы. При изучении аминолиза полученных олигонуклеотидов было показано, что цианметильный эфир является более реакционноспособным, чем метильный, и использование олигонуклеотидов данного типа позволяет сократить время реакции до 1 ч, а концентрацию аминок компонента — до 0.6–1.0 моль·л⁻¹. Однако реакция с тирамином проходила количественно лишь за пять дней, что можно объяснить плохой растворимостью этого соединения в органических растворителях и низким значением *pK_a* его аминогруппы. Было найдено, что добавление в реакционную смесь каталитических количеств триазола существенно увеличивает скорость аминолиза.

Различие в реакционной способности метилового и цианметилового эфиров было использовано для синтеза конъюгатов олигонуклеотидов с двумя разными аминок компонентами.³⁴ С этой целью в автоматический олигонуклеотидный синтез были вовлечены одновременно амидофосфитные производные **71** и **78**. Таким путем были получены олигонуклеотиды **81**, содержащие остатки как 5-метоксикарбонил-, так и 5-цианметоксикарбонилметилуридина.

Реакцию с двумя разными аминок компонентами осуществляли следующим образом. Первоначально олигонуклеотид **81**, иммобилизованный на твердой фазе, обрабатывали тирамином в присутствии триазола (20°C, 3 сут.), при этом

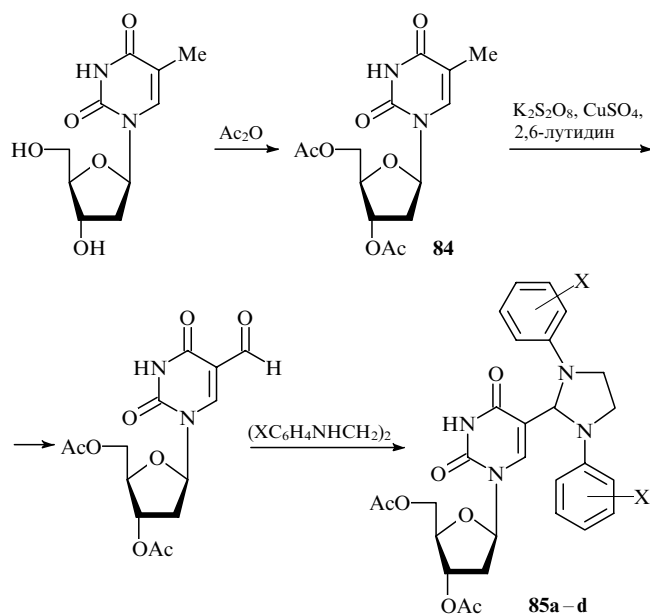
тирамин селективно взаимодействовал с цианметильным эфиром. После отмывки полимера к полученному олигонуклеотиду **82** добавляли 50%-ный раствор трис(2-аминоэтил)амин в этаноле, при этом происходил полный аминолиз с образованием производного **83**. Наличие двух различных амидных группировок подтверждали ферментативным гидролизом выделенного олигонуклеотида под действием фосфодиэстеразы змеиного яда, щелочной фосфатазы и нуклеазы P1.



R — фрагмент блокированной олигонуклеотидной цепи.

В основе методов синтеза олигонуклеотидов, содержащих альдегидную функцию в гетероциклическом основании, чаще всего лежит мягкое окисление метильной группы тимина. Так, в публикациях^{11,35} описано получение модифицированных олигомеров, содержащих остатки 5-формил-2'-

дезоксигуанидина. Ключевой стадией синтеза является окисление метильной группы блокированного тимидина **84** до формильной действием персульфата калия в присутствии сульфата меди и 2,6-лутидина (выход продукта окисления — 52%). Для блокирования альдегидной функции предложено использовать 1,3-дифенилимидазолиновую защитную группировку,^{36, 37} которая стабильна в щелочных условиях и удаляется при обработке кислотой. Вводя в бензольные кольца *N,N'*-бис(фенил)этилендиамина различные электроноакцепторные заместители, можно изменять *pK* аминогрупп и тем самым регулировать легкость отщепления защитной группировки под действием кислоты.



X = H (a), 4-F (b), 4-Cl (c), 3-Cl (d).

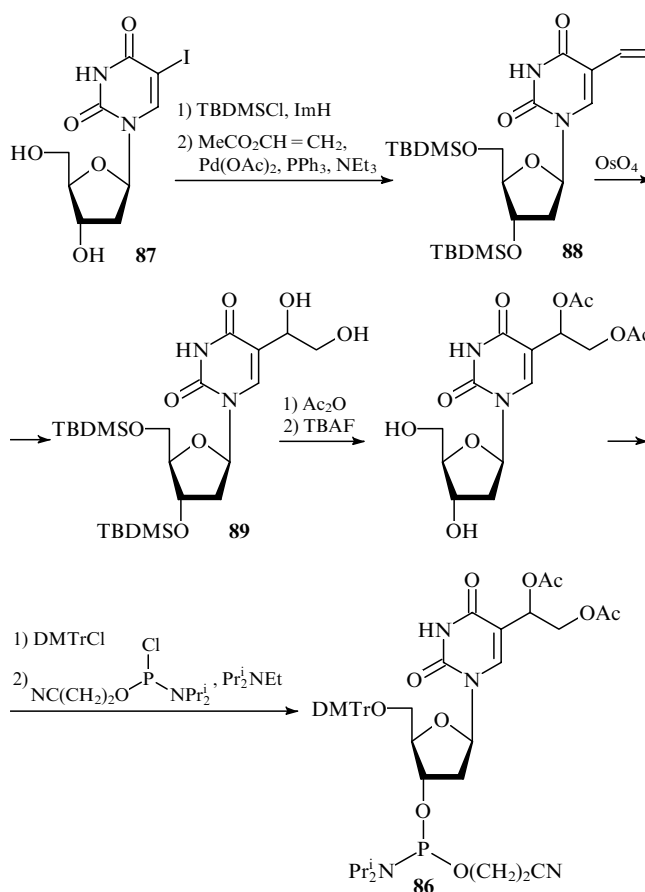
Изучена стабильность модифицированных нуклеозидов **85a–d** в кислой среде. Показано, что в условиях отщепления 5'-диметокситритильной защитной группировки (3%-ная трихлоруксусная кислота в хлористом метиле, 25°C) дифенилимидазолиновые защитные группы не сохраняются. При уменьшении концентрации трихлоруксусной кислоты до 1% удается предотвратить деблокирование введенной карбонильной функции в соединении **85d**, которое было выбрано для получения амидофосфитного производного и дальнейшего синтеза олигонуклеотидов. Бис(3-хлорфенил)-имидазолиновую защиту удаляли на последней стадии синтеза 80%-ным водным раствором уксусной кислоты. Присутствие альдегидной функции в модифицированных олигонуклеотидах подтверждали ферментативным гидролизом смесью фосфодиэстеразы змеиного яда и щелочной фосфатазы.

Другой метод получения олигонуклеотидов, содержащих остатки 5-формил-2'-дезоксигуанидина, описан в работе³⁸. В этом случае в автоматический нуклеотидный синтез вводили амидофосфит **86**. Карбонильную функцию генерировали постсинтетической обработкой олигонуклеотида, содержащего фрагмент с *виц*-диольной группировкой, периодатом натрия.

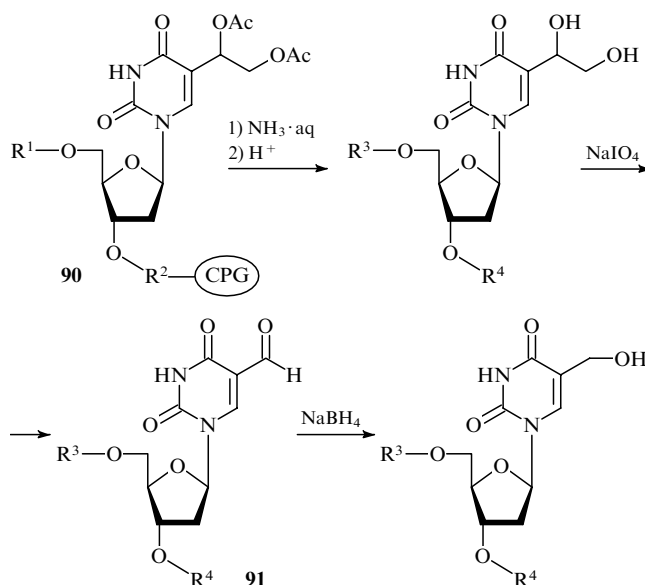
В качестве исходного нуклеозида для синтеза амидофосфита **86** авторы работы³⁸ использовали 5-йод-2'-дезоксигуанидин (**87**), который превращали в винильное производное **88** реакцией с винилацетатом в присутствии каталитических количеств ацетата палладия и трифенилфосфина (схема 7). Винильный фрагмент окисляли тетраоксидом осмия в присутствии *N*-оксида *N*-метилморфолина, и образовавшуюся *виц*-диольную группировку в положении 5 соединения **89**

блокировали ацетильной защитой. Амидофосфит **86** вводили в автоматический олигонуклеотидный синтез.

Схема 7



Полученные модифицированные олигомеры **90** обрабатывали концентрированным водным раствором аммиака для удаления ацетильных защитных группировок и отщепления от твердой фазы, после чего окисляли *виц*-диольную группировку периодатом натрия (50 экв. NaIO₄, 1 мин, 0°C). Для косвенного подтверждения наличия карбонильной функ-



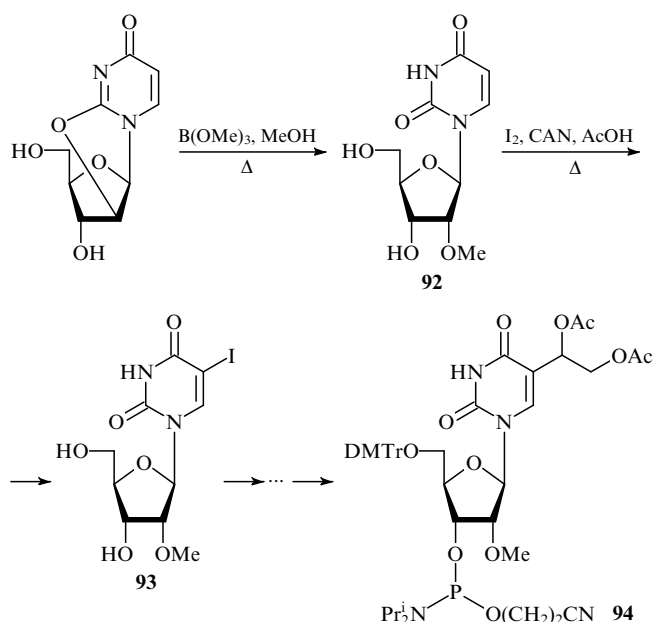
R¹, R² — фрагменты блокированной олигонуклеотидной цепи;
R³, R⁴ — фрагменты деблокированной олигонуклеотидной цепи.

ции в составе олигонуклеотидной цепи соединение **91** восстанавливали боргидридом натрия.

Авторами работы³⁸ было изучено влияние введенной в гетероциклическое основание альдегидной функции на термическую стабильность дуплексов, образованных олигомером **91** и комплементарным ему природным олигонуклеотидом. Показано, что наличие формильной группы понижает температуру плавления 12-звенного гетерогенного дуплекса на 4.1°C, а 6-звенного дуплекса — на 5.8°C по сравнению с температурами плавления немодифицированных аналогов.

Амидофосфитное производное **86** также было использовано для синтеза олигонуклеотидной последовательности, содержащей сайт узнавания фактора транскрипции NFκB.³⁹ Как известно,⁴⁰ 5-формуридин способен образовывать ковалентную связь с ε-аминогруппой остатка лизина. Соединение **86** было синтезировано по схеме, аналогичной приведенной в работе³⁸, за исключением стадии введения винильного фрагмента в производное **87**. В данном случае вместо винилацетата использовали трибутилвинилолово в присутствии каталитических количеств комплекса $\text{Pd}(\text{MeCN})_2\text{Cl}_2$, что позволило повысить выход соединения **88** с 68 до 80%.³⁹

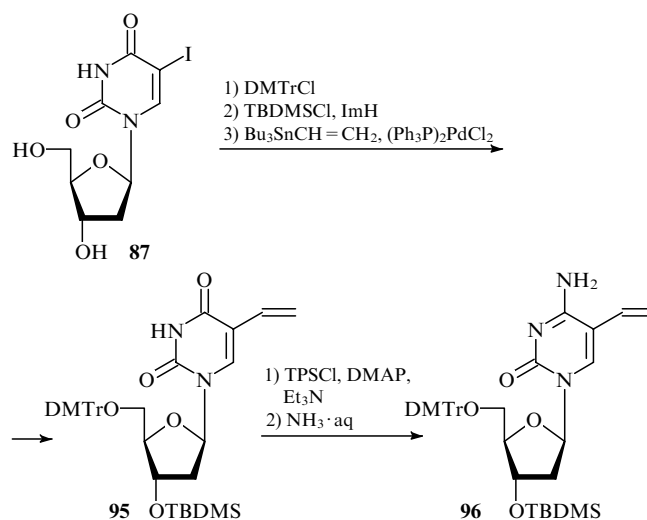
Для изучения ковалентного связывания модифицированных олигонуклеотидов с фактором транскрипции NFκB группой ученых³⁹ были синтезированы олигомеры, содержащие остатки 5-формил-2'-*O*-метилуридина. Исходным соединением являлся коммерчески доступный *O*²,2'-ангидроуридин, ангидроцикл в котором раскрывали триметилборатом. Иодирование полученного производного **92** дает модифицированный нуклеозид **93**, который далее превращали в амидофосфитное производное **94** в соответствии со схемой 7.



После окончания автоматического олигонуклеотидного синтеза и полного деблокирования функциональных групп *виц*-диольную группировку окисляли периодатом натрия. Показано,³⁹ что введение формильной группы практически не влияет на связывание модифицированного олигомера с фактором транскрипции.

Описанный выше подход использовали также для синтеза олигонуклеотидов, содержащих 5-формил-2'-дезокситидин.⁴¹ Винильный остаток в С(5)-положение гетероциклического основания **87** вводили, действуя на предванительно блокированный нуклеозид смесью трибутилвинилолово и бис(трифенилфосфин)дихлорпалладия, что позволило существенно уменьшить время реакции (с 16 до 1.5 ч), а также

повысить выход продукта **95** до 80%. Модифицированный 2'-дезокситидин **96** получали из блокированного уридина **95** активацией 4-оксогруппы 2,4,6-триизопропилбензолсульфонилхлоридом и последующим взаимодействием промежуточного соединения с аммиаком. В соединении **96** окисляли винильную группу, одновременно защищали экзоциклическую аминогруппу и гидроксильные функции образовавшегося *виц*-диола и селективно деблокировали 3'-гидроксильную группу. Образовавшийся нуклеозид затем использовали для получения соответствующего амидофосфитного производного, которое встраивали в олигонуклеотидную цепь.



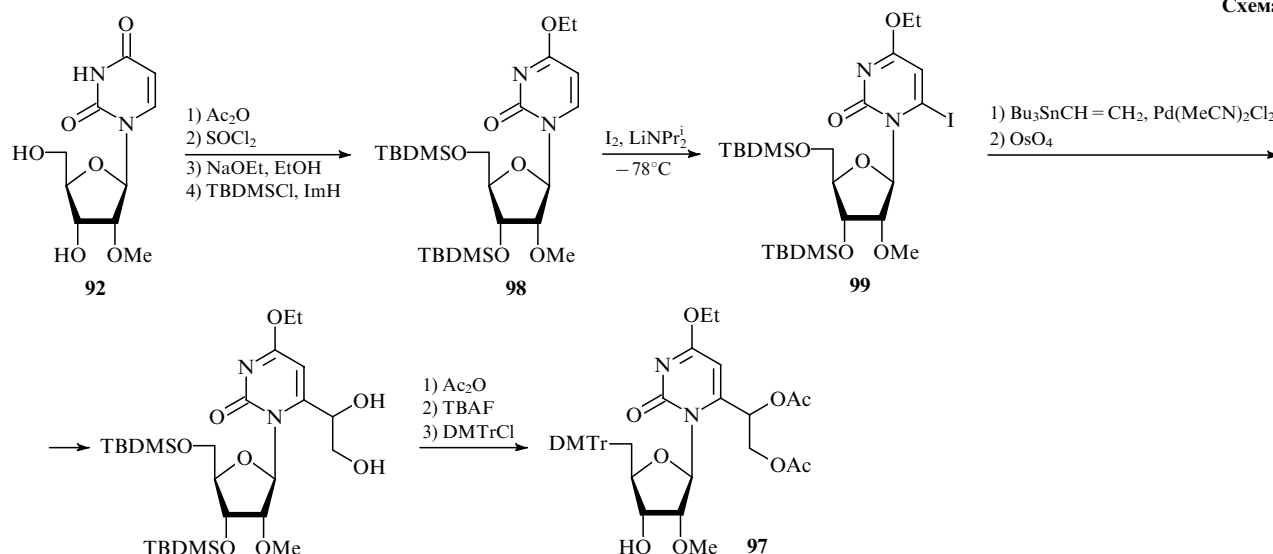
После деблокирования олигонуклеотидов и окислительного расщепления *виц*-диольной группировки периодатом натрия были определены некоторые физико-химические параметры синтезированных олигомеров: pK_a остатка 5-формил-2'-дезокситидина и температуры плавления ДНК-дуплексов, образованных модифицированными олигонуклеотидами и комплементарной им НК-матрицей. Показано,⁴¹ что введение карбонильной функции практически не оказывает влияния на термическую стабильность модифицированного дуплекса.

Для исследования ДНК-связывающего домена протоонкогена *c-myc* были синтезированы олигомеры, содержащие 6-формил-2'-*O*-метилцитидиновые фрагменты.⁴² Учитывая тот факт, что 6-(1,2-диацетоксиэтил)-2'-дезокситидин нестабилен даже при комнатной температуре,³⁸ авторы работы⁴² использовали его блокированный аналог — 1-[2-оксо-4-этоксиг-6-(1,2-диацетоксиэтил)-1,2-дигидропиримидил]-2'-*O*-метил-5'-*O*-диметокситрилит-β-*D*-рибофуранозид (**97**) — в качестве соединения-предшественника 6-формил-2'-*O*-метилцитидина.

Исходным соединением в синтезе нуклеозида **97** служил 2'-*O*-метилуридин (**92**), в котором сначала ацилировали гидроксильные группы углеводного остатка, а затем активировали 4-оксогруппу тионилхлоридом (схема 8). Последующее действие на защищенный 2'-*O*-метилуридин раствора этилата натрия в этиловом спирте и *трет*-бутилдиметилсилилхлорида приводило к производному **98**. Обработкой нуклеозида **98** иодом в присутствии диизопропиламина при -78°C был получен соответствующий защищенный 6-иодуридин **99**. Введение винильного фрагмента в производное **99** и его последующее окисление тетраоксидом осмия в присутствии *N*-оксида *N*-метилморфолина осуществляли по схеме, описанной в работе³⁸.

После ацетилирования гидроксильных групп, удаления *трет*-бутилдиметилсилильной и введения диметокситри-

Схема 8



тильной защиты соединение **97** было использовано для получения соответствующего амидофосфитного производного, которое встраивали в олигонуклеотидную цепь в процессе автоматического синтеза. Стандартные постсинтетические обработки и окисление периодатом натрия приводили к получению целевых олигомеров, содержащих 6-формил-2'-O-метилцитидин.

Авторы работы⁴² показали, что введение одного модифицированного звена в олигонуклеотид понижает температуру плавления 23-звенного ДНК-дуплекса по сравнению с природным аналогом на 6°C .

Оригинальный метод синтеза олигонуклеотидов, содержащих альдегидную функцию в положении 8 дезоксиаденозина, описан в работе⁴³. Авторы предложили вводить в автоматический синтез амидофосфитное производное соединения **100**, содержащего пент-4-енилтиогруппу, которое получали исходя из тиола **101** (схема 9).⁴⁴ Окисление двойной связи введенного пент-4-енильного остатка проводили после окончания синтеза олигонуклеотида тетраоксидом осмия в присутствии пероксида водорода и *N*-оксида *N*-метилморфолина в темноте при 25°C . В этих условиях не происходит разрушения модифицированного олигомера и побочного

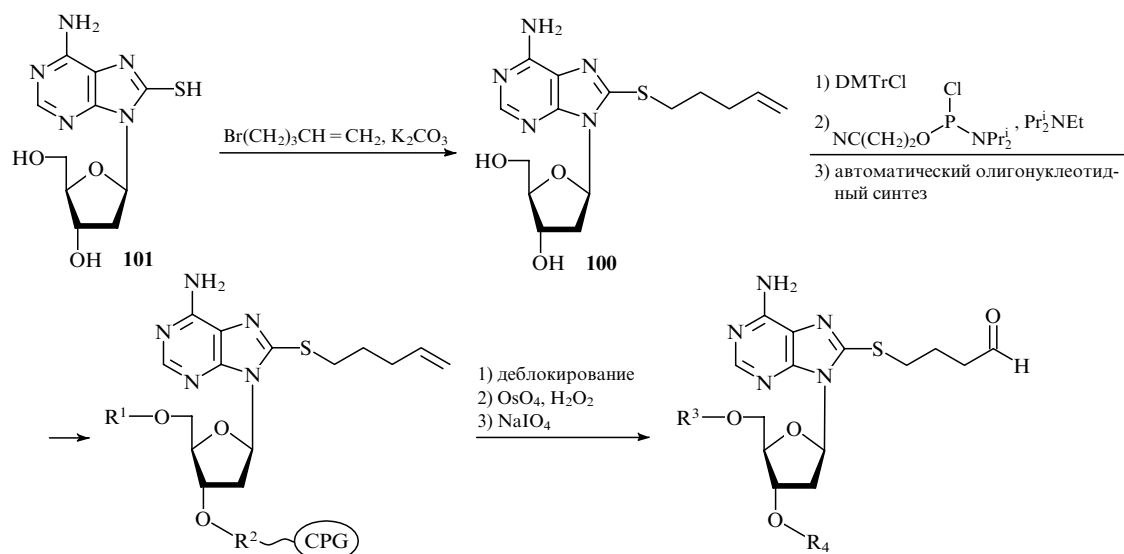
окисления серы. Образовавшаяся *вин*-диольная группировка окислением периодатом натрия (100 экв.) была превращена в альдегидную функцию, наличие которой подтверждено реакциями модифицированного олигонуклеотида с аминокислотами и данными спектроскопии ЯМР ^1H .

Авторами работы⁴⁵ получены конъюгаты модифицированных олигонуклеотидов с флуоресцентными метками и показано, что введение одного гетероциклического основания с альдегидной функцией, локализованной на линкере C-3, понижает температуру плавления 11-звенного ДНК-дуплекса на 14°C .

2. Олигонуклеотиды, содержащие карбоксильную или альдегидную группу в составе звена ненуклеотидной природы

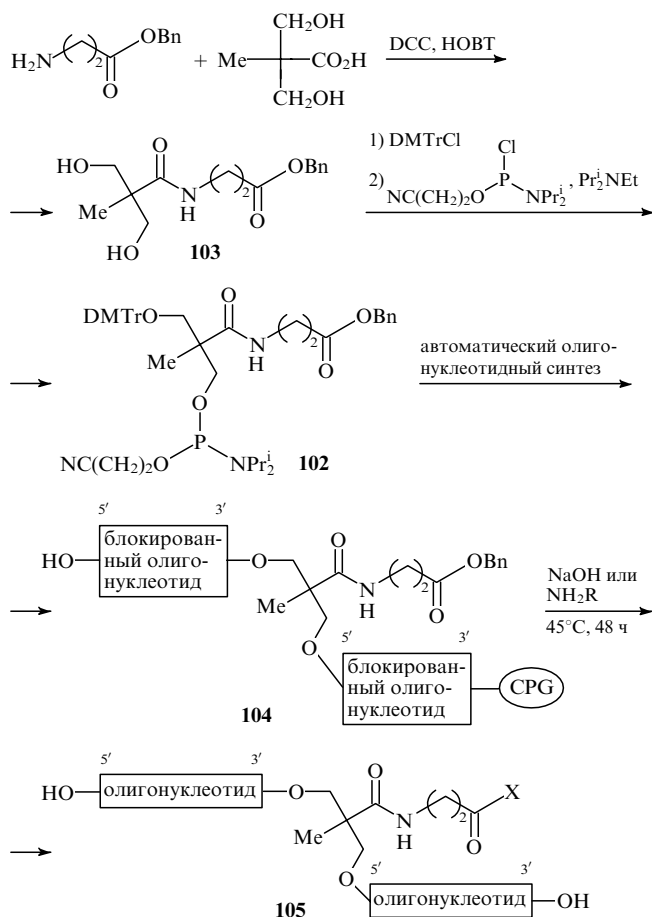
Эндо с соавт.⁴⁶ получили амидофосфит **102** ненуклеозидной природы, содержащий блокированную карбоксильную группу, который можно вводить в середину цепи или на 5'-конец олигонуклеотида. Ключевой стадией синтеза соединения **102** является конденсация бензильного эфира 4-аминомасляной кислоты и 2,2-бис(гидроксиметил)пропионовой

Схема 9



R^1 , R^2 — фрагменты блокированной олигонуклеотидной цепи; R^3 , R^4 — фрагменты деблокированной олигонуклеотидной цепи.

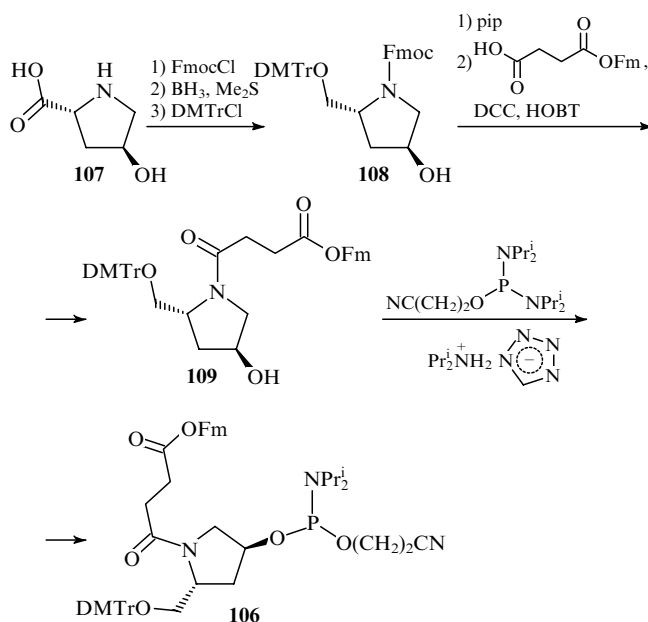
кислоты в присутствии DCC и HOBT с образованием соединения **103**. В результате блокирования одной первичной гидроксильной группы диола **103** эквимольным количеством диметокситриэтилхлорида и фосфитилирования второй был получен амидофосфит **102**, который использовали для синтеза модельных олигонуклеотидов **104**, содержащих блокированную карбоксильную функцию в середине цепи. Твердофазным методом были синтезированы конъюгаты модифицированных олигомеров **104** с различными аминами и диаминами. Показано,⁴⁶ что при обработке олигонуклеотида **104**, иммобилизованного на полимерном носителе, раствором алкиламина в органической среде происходит количественное образование конъюгата **105** ($X = \text{NHR}$).



$X = \text{OH}$ или NHR .

Другой метод введения блокированной карбоксильной функции в состав олигонуклеотида предложен Гебертом и сотр.⁴⁷ Ими были синтезированы модельные динуклеозидфосфаты с использованием амидофосфитного производного **106**.

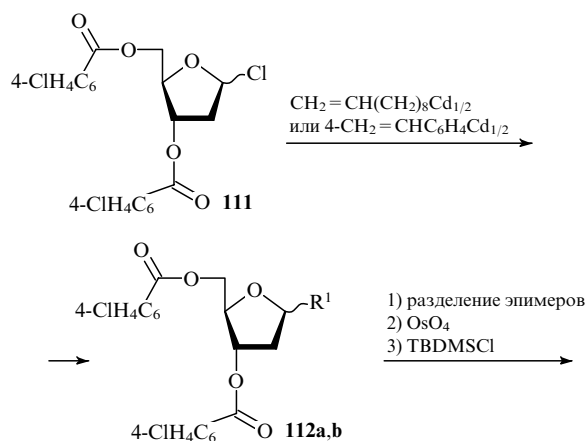
Исходным соединением в синтезе амидофосфита **106** явился 4-гидрокси-L-пролин (**107**), в котором сначала защищали amino- и карбоксильную функции. Деблокирование аминогруппы в полученном соединении **108** пиперидином и последующее ацилирование монофлуоренилметилловым эфиром янтарной кислоты под действием DCC и HOBT привели к амиду **109**. После этого производное **109** фосфитилировали с образованием целевого амидофосфита **106**, который вводили в олигонуклеотидный синтез. Выход олигонуклеотида на стадии присоединения модифицированного звена составил 97%.

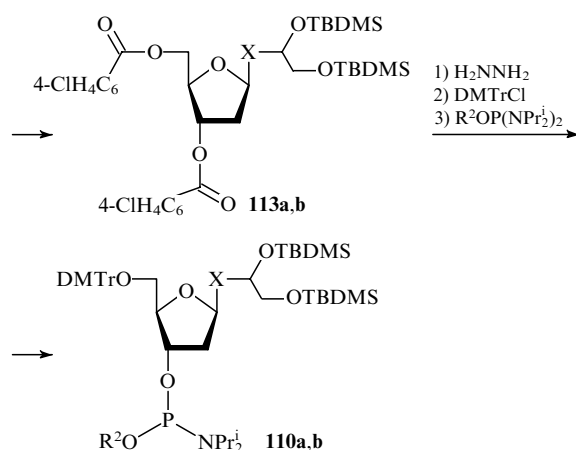


Fm — флуоренилметил, pip — пиперидин.

Используя другие ацилирующие агенты для обработки соединения **108** с предварительно деблокированной аминогруппой, авторы работы⁴⁷ получили динуклеозидфосфаты, содержащие функциональные группировки различной природы.

Введение альдегидной функции в олигонуклеотидную цепь было осуществлено группой бельгийских ученых.^{48, 49} В автоматическом синтезе использовали амидофосфиты **110a, b** ненуклеозидной природы, содержащие *виц*-диоольный фрагмент. Амидофосфитное производное **110a** получали исходя из коммерчески доступного дезоксирибофуранозилхлорида **111**. Введение деп-9-енильного фрагмента осуществляли действием соответствующего кадмийорганического соединения,⁵⁰ после чего проводили разделение эпимеров **112a** ($R:S = 65:35$). Несмотря на более высокий выход *R*-эпимера, для дальнейшей модификации был выбран *S*-эпимер, так как его конфигурация соответствовала β -конфигурации аномерного центра природных нуклеозидов. Вследствие этого модифицированные олигонуклеотиды, синтезированные с использованием *S*-эпимера, способны образовывать стабильные дуплексы с мРНК. *S*-Эпимер **112a** окисляли тетраоксидом осмия в присутствии *N*-оксида *N*-метилморфолина и в полученном *виц*-диоольном производном блокировали гидроксигруппы *трет*-бутилдиметилсилильной защитой с образованием производного **113a**.





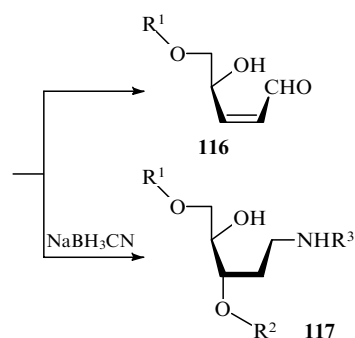
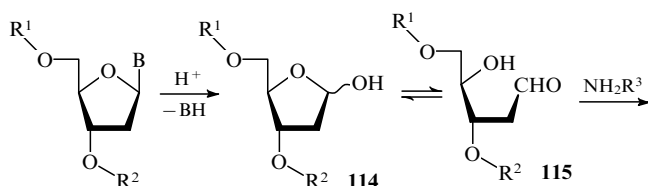
$R^1 = (\text{CH}_2)_8\text{CH}=\text{CH}_2$ (**112a**), $\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}=\text{CH}_2$ (**112b**);
 $R^2 = (\text{CH}_2)_2\text{CN}$ (**110a**), Me (**110b**);
 $X = (\text{CH}_2)_8$ (**110a**, **113a**), $4\text{-C}_6\text{H}_4$ (**110b**, **113b**).

Соединение **113b** было получено аналогично. В этом соединении блокированная *виц*-диольная группировка локализована в пара-положении бензольного кольца, которое использовали как аналог гетероциклического основания нуклеозида. Удаление *n*-хлорбензоильных и селективное введение диметокситрилитильных защитных групп, а также последующее фосфитилирование соединений **113a,b** приводило к амидофосфитным производным **110a,b**, которые вводили в автоматический олигонуклеотидный синтез.

После деблокирования модифицированных олигонуклеотидов *виц*-диольные группировки окисляли периодатом натрия. Карбонилсодержащие олигонуклеотиды использовались авторами работ^{48, 49} для синтеза конъюгатов с биотином и флуоресцентными метками.

3. Олигонуклеотиды, содержащие альдегидную группу в составе апуринового сайта

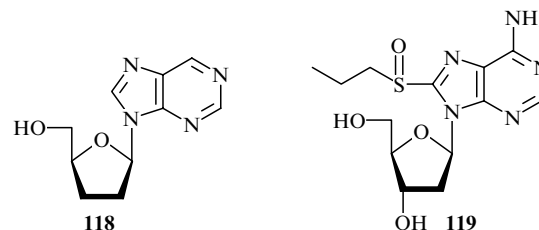
Более простой и, как следствие, часто используемый метод введения альдегидной функции в олигонуклеотидную цепь — формирование апуринового (АП) сайта. Отщепление пуринового гетероциклического основания происходит в результате действия сильных кислот (HCl , HCOOH) на олигонуклеотид. Апуриновый фрагмент в олигомерной цепи существует в виде трех таутомеров: α - и β -аномерных форм дезоксирибофуранозы **114** (соотношение 1 : 1) и альдегидсодержащей структуры **115** (~1%).^{51, 52} При добавлении к АП-содержащему олигонуклеотиду амина в зависимости от природы и концентрации последнего происходит либо расщепление цепи за счет β -элиминирования 3'-фосфата с образованием производного **116**,^{51, 53–55} либо присоединение соответствующего амина с образованием основания Шиффа, которое при обработке цианоборгидридом натрия (pH 5.0) восстанавливается до конъюгата **117**.^{51, 52, 56, 57}



B — пуриновое гетероциклическое основание;
 R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

Важную роль при формировании АП-сайта играет скорость кислотного гидролиза *N*-гликозидной связи, которая зависит от pH реакционной среды. Известно,⁵⁸ что в ряду природных нуклеозидов наибольшая константа скорости апуринизации ($7.3 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$) наблюдается для 2'-дезоксиаденозина. Время полупревращения при обработке 2'-дезоксиаденозина 30 мМ HCl при 37°C составляет 9.5 мин. Чаще всего для проведения апуринизации олигонуклеотид обрабатывают 80%-ной муравьиной кислотой (20°C, 30 мин) или 0.2 М соляной кислотой (37°C, 90 мин).⁵⁶

Чтобы избежать жестких кислотных условий, авторы работы⁵¹ предложили использовать для создания АП-сайта неприродный аналог аденозина — дидезоксинебуларин (**118**). Константа скорости апуринизации такого звена в составе олигонуклеотидной цепи при обработке 30 мМ HCl (37°C, 13 мин) составляет $23.7 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$, а время полупревращения — 2.9 мин. Однако отсутствие 3'-гидроксильной группы в структуре мономерного звена **118** делает невозможным его использование для формирования АП-сайта в середине цепи.



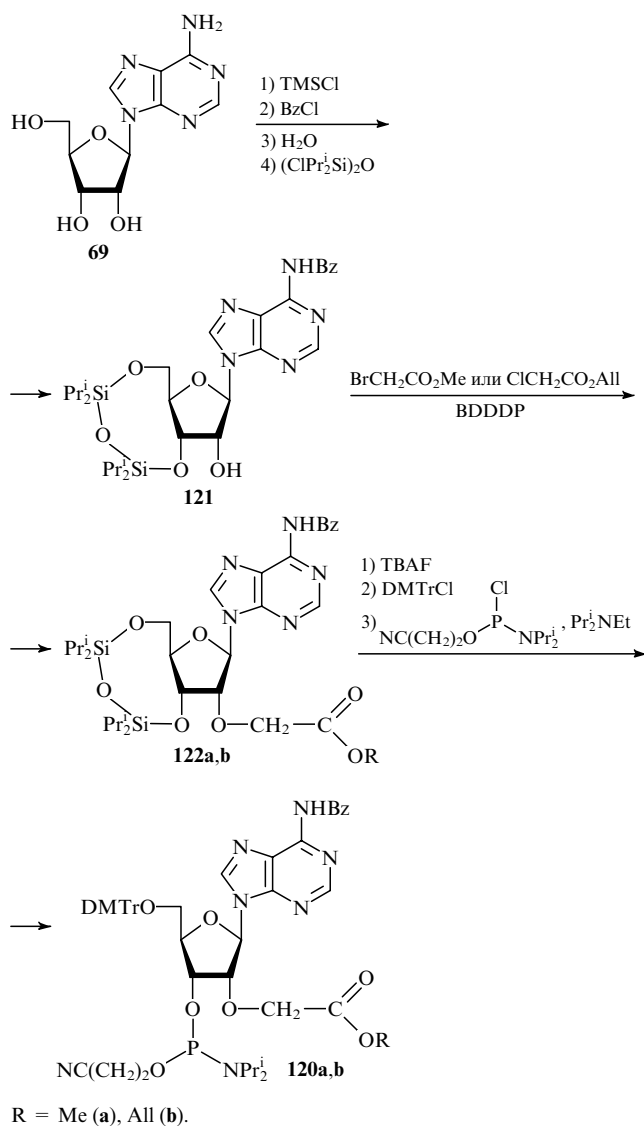
В работе⁵⁷ описан синтез олигонуклеотидов, содержащих остатки 8-пропилсульфинил-2'-дезоксиаденозина **119**, который был получен окислением соответствующего сульфида.⁴⁴ Апуринизацию такого фрагмента проводили при pH 3 (65°C), после чего получали конъюгаты модифицированных олигонуклеотидов с флуоресцентными метками.

4. Олигонуклеотиды, содержащие карбоксильную или альдегидную группу в 2'-положении углеводного фрагмента

Модификация 2'-положения в большинстве случаев не вызывает значительной дестабилизации ДНК-дуплекса. Однако необходимо отметить, что синтез олигонуклеотидов, содержащих реакционноспособную группировку в углеводном остатке, является наиболее трудоемким в исполнении и требует подбора ортогональной системы защитных групп.

Очевидно, что в процессе автоматического синтеза 2'-карбоксильную группу необходимо блокировать. Чаще всего для этой цели используют метиловый эфир, который удаляют водным или метанольным раствором гидроксида натрия.

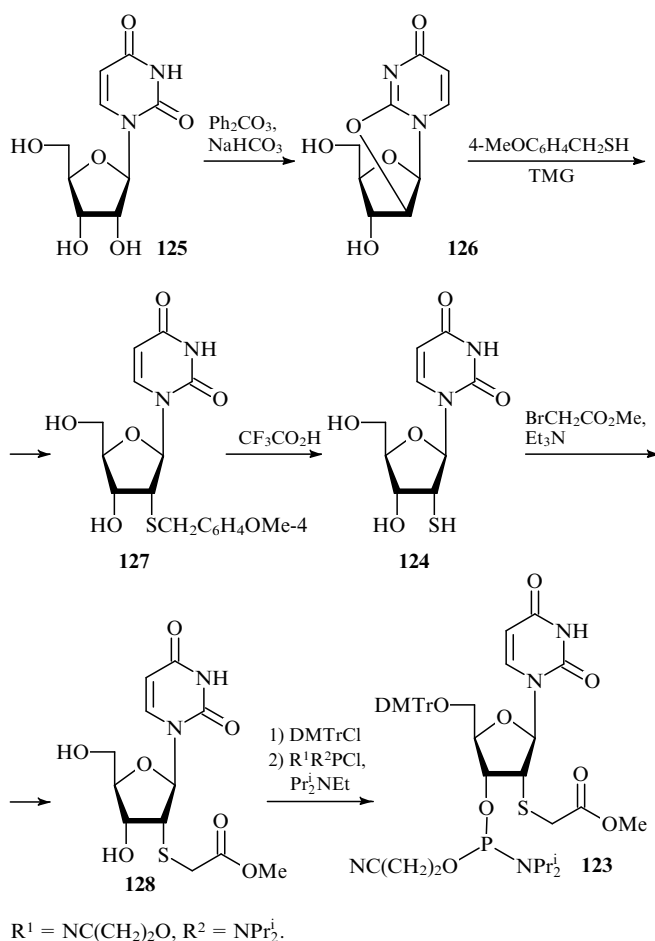
Авторами работы⁵⁹ синтезированы модифицированные олигонуклеотиды, содержащие 2'-*O*-карбоксиметильную группу, блокированную метиловым или аллиловым эфиром. Последний может быть селективно удален действием комплекса Pd(0) в присутствии морфолина, что позволяет осуществлять дальнейшие превращения карбоксиметильной группы на твердой фазе в органической среде. Модифицированные амидофосфитные производные **120a,b** были синтезированы исходя из аденозина (**69**). Ключевой стадией синтеза является алкилирование 2'-положения углеводного фрагмента блокированного аденозина **121** метиловым эфиром бромуксусной кислоты или аллиловым эфиром хлоруксусной кислоты в присутствии сильного органического основания — *tert*-бутилимино-2-диэтиламино-1,3-диметилпергидро-1,3,2-дизафосфорина (BDDDP).⁶⁰ Использование в качестве основания гидридов щелочных металлов^{61,62} имеет ряд недостатков — образование побочных продуктов, достаточно низкие выходы ($\leq 18\%$) — и значительно ограничивает выбор защитных групп. Алкилирование, проводимое в присутствии BDDDP, приводит к образованию целевых соединений **122a,b** с выходами 35–40%. Деблокирование 3'- и 5'-гидроксильных групп, избирательное введение диметокситритильной защиты и дальнейшее фосфитирование нуклеозидов **122a,b** дает амидофосфитные производные **120a,b**, которые встраивают в олигонуклеотидную цепь в процессе автоматического синтеза.



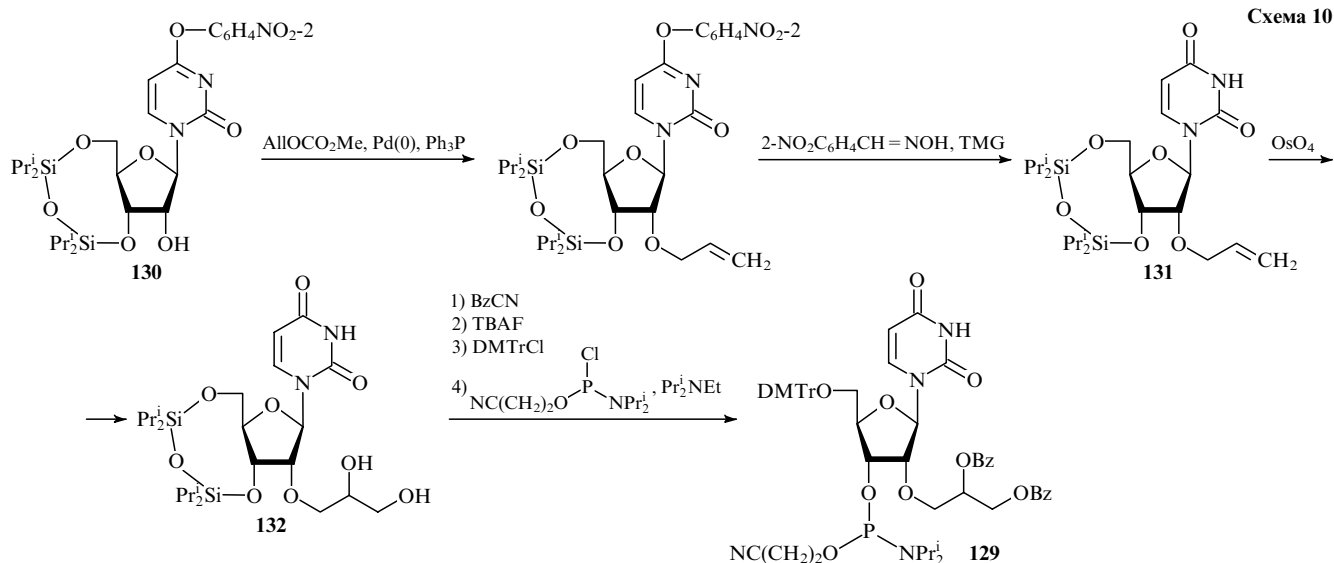
После окончания синтеза метиловый эфир омыляют 2 М раствором гидроксида натрия (20°C, 30 мин), а аллиловый — селективно удаляют действием тетракис(трифенилфосфин)-палладия в присутствии морфолина. Реакционную способность введенной 2'-*O*-карбоксийной функции подтверждали взаимодействием с этилендиамином в водной среде в присутствии водорастворимого карбодиимида.

Оригинальный метод получения олигонуклеотидов, содержащих 2'-карбоксиметилтиогруппу, предложен в работе⁶³. В автоматический олигонуклеотидный синтез вводили амидофосфитное производное 2'-метоксикарбонилметилтио-2'-дезоксисуридина **123**, которое получали исходя из 2'-меркапто-2'-дезоксисуридина (**124**).

Синтез 2'-меркапто-2'-дезоксисуридина (**125**) осуществляли из уридина **125** через циклический нуклеозид **126** путем размыкания ангидроцикла 4-метокситолуолтиолом в присутствии тетраметилгуанидина (TMG) с последующей обработкой производного **127** трифторуксусной кислотой. Алкилирование соединения **124** проводили метиловым эфиром бромуксусной кислоты без предварительного блокирования гетероциклического основания и углевода. Выход 2'-метоксикарбонилметилтио-2'-дезоксисуридина (**128**) составил 73%, реакция сопровождалась образованием незначительных количеств побочного продукта — *N*³-алкилированного нуклеозида.⁶³



Выход модельного динуклеозидфосфата dU*pT (dU* — модифицированное дезоксиуридиновое звено) на стадии присоединения модифицированного звена **123** составил 60–70%. Авторы объясняют этот факт возможными стерическими затруднениями, вызванными наличием в 2'-положении достаточно объемного заместителя. Твердофазным методом



были синтезированы конъюгаты модельного соединения dU*pT с алифатическими аминами с выходом 50%.

Получены также 15-звенные 2'-модифицированные олигонуклеотиды гетерогенного состава, наличие модифицированного звена в которых подтверждено ферментативным гидролизом смесью фосфодиэстеразы змеиного яда и щелочной фосфатазы.

Метод синтеза олигонуклеотидов, содержащих альдегидную функцию в 2'-положении углеводного фрагмента, предложен авторами работ^{59, 64}. В качестве модифицированного звена использовали амидофосфитное производное **129**, содержащее блокированный *виц*-диольный фрагмент. Ключевыми стадиями синтеза соединения **129** являются алкилирование 2'-положения блокированного уридина **130** аллилметилкарбонатом в присутствии Pd(0) и трифенилфосфина и последующее окисление соединения **131** тетраоксидом осмия в присутствии *N*-оксида *N*-метилморфолина с образованием производного **132**. Авторам удалось подобрать условия, при которых окисление 2'-*O*-аллилового эфира происходит селективно, не затрагивая двойную связь гетероциклического основания. Гидроксильные группы *виц*-диольного фрагмента модифицированного уридина **132** блокировали бензоильной защитой (схема 10).

Амидофосфитное производное **129** использовали в синтезе модифицированных олигонуклеотидов. Бензоильные защитные группы 2'-*виц*-диольного фрагмента удаляли в процессе стандартных постсинтетических обработок, а альдегидную функцию генерировали действием периодата натрия. Были получены модельные конъюгаты модифицированных олигонуклеотидов с 2,4-динитрофенилгидразином, метиловым эфиром метионина⁶⁴ и рядом соединений, имеющих в своем составе аминокси-, гидразино-, гидразидо- или 1,2-аминотиольную функцию.⁶⁵

V. Заключение

В настоящее время получение конъюгатов олигонуклеотидов с различными молекулами представляется перспективным для направленного изменения физико-химических и субстратных свойств фрагментов нуклеиновых кислот, что является необходимым условием для использования последних в молекулярно-биологических и медицинских исследованиях. Оптимальным можно считать вариант синтеза конъюгатов, при котором реакционноспособная группировка в составе олигонуклеотида избирательно реагирует с лигандом, в то время как другие функциональные группы

обеих молекул остаются незатронутыми. К таким реакциям относятся взаимодействия карбоксильной или альдегидной групп модифицированных олигонуклеотидов с аминсоединениями.

Для создания конъюгатов с амидной связью необходимо осуществлять активацию карбоксильной группы. Выбор реагента для активации зависит в том числе и от того, в какой среде проводится реакция. В водных растворах чаще всего используют водорастворимый карбодимид, в органической среде предпочитают конденсирующие реагенты на основе фосфониевых или урониевых солей. Каждый из этих вариантов имеет свои недостатки. В первом случае гетероциклические фрагменты нуклеиновых кислот могут реагировать с карбодимидом по поляризованной двойной связи C=N. Во втором случае при проведении конъюгации в органических средах возникают проблемы с растворимостью реагирующих молекул. В связи с этим достаточно часто молекулу-лиганд присоединяют к олигонуклеотиду, иммобилизованному на нерастворимом полимерном носителе. Однако дальнейшая обработка конъюгата аммиаком или щелочью, необходимая для расщепления связи между олигонуклеотидом и полимером и деблокирования функциональных групп, может привести к деструкции ненуклеотидной части гибридной молекулы.

В случае использования олигонуклеотидов, содержащих альдегидную функцию, нет необходимости в дополнительной активации электрофильной группировки, реакцию можно проводить в водно-органической среде, что помогает решить проблему растворимости реагирующих молекул. Неоспоримым достоинством олигонуклеотидов с альдегидной группой является возможность применения для создания конъюгатов не только аминов, но и гидразинов, гидразидов, гидроксиламинов, а также соединений, содержащих 1,2-аминотиольную группировку. Поэтому применение модифицированных олигонуклеотидов с альдегидной функцией является предпочтительным, что подтверждает интенсивный рост числа публикаций по данной тематике.

Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику НИИ физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ им. М.В.Ломоносова к.х.н. Е.А.Романовой за помощь при подготовке настоящего обзора.

Работа выполнена в рамках программы «Ведущие научные школы» (проект № 00-15-97944) и при финансовой поддержке Wellcome Trust (грант 057361).

Литература

1. S.L.Beaucage, D.E.Bergstrom, G.D.Glick, R.A.Jones. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. Wiley, New York, 2000
2. *Oligonucleotides and Analogues. A Practical Approach*. (Ed. F.Eckstein). Oxford University Press, Oxford, 1991
3. О.М.Грищенко, Е.С.Громова. *Успехи химии*, **68**, 267 (1999)
4. J.N.Kremsky, J.L.Wooters, J.P.Dougherty, R.E.Meyers, M.Collins, E.L.Brown. *Nucl. Acids Res.*, **15**, 2891 (1987)
5. J.Hovinen, A.Guzaev, A.Azhayev, H.Lonnberg. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2745 (1994)
6. A.Guzaev, M.Manoharan. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 3671 (1998)
7. M.Gottikh, U.Asseline, N.T.Thuong. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 6657 (1990)
8. M.D.Jonklaas, R.R.Kane. *Tetrahedron Lett.*, **41**, 4035 (2000)
9. A.V.Kachalova, D.A.Stetsenko, E.A.Romanova, V.N.Tashlitsky, M.J.Gait, T.S.Oretskaya. *Helv. Chim. Acta*, **85**, 2409 (2002)
10. P.Athanassopoulos, K.Barlos, D.Gatos, O.Hatzi, C.Tsavara. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 5645 (1995)
11. A.Matsuda, M.Inada, H.Nara, E.Ohtsuka, A.Ono. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **3**, 2751 (1993)
12. D.S.Jones, J.P.Hachman, S.A.Osgood, M.S.Hayag, P.A.Barstad, G.M.Iverson, S.M.Coutts. *Bioconjugate Chem.*, **5**, 390 (1994)
13. D.Forget, D.Boturny, E.Defrancq, J.Lhomme, P.Dumy. *Chem. Eur. J.*, **7**, 3976 (2001)
14. D.Forget, O.Renaudet, E.Defrancq, P.Dumy. *Tetrahedron Lett.*, **42**, 7829 (2001)
15. N.Ollivier, Ch.Olivier, C.Gouyette, T.Huynh-Dinh, H.Gras-Masse, O.Melnyk. *Tetrahedron Lett.*, **43**, 997 (2002)
16. F.Hausch, A.Jaschke. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 6157 (1998)
17. M.M.Greenberg. *Tetrahedron*, **51**, 29 (1995)
18. D.J.Yoo, M.M.Greenberg. *J. Org. Chem.*, **60**, 3358 (1995)
19. J.D.Kahl, M.M.Greenberg. *J. Org. Chem.*, **64**, 507 (1999)
20. T.J.Matray, D.J.Yoo, D.L.McMinn, M.M.Greenberg. *Bioconjugate Chem.*, **8**, 99 (1997)
21. F.Guibé. *Tetrahedron*, **54**, 2967 (1998)
22. J.Hovinen, A.Guzaev, A.Azhayev, H.Lonnberg. *Tetrahedron Lett.*, **34**, 8169 (1993)
23. J.Hovinen, A.Guzaev, A.Azhayev, H.Lonnberg. *Tetrahedron*, **50**, 7203 (1994)
24. H.Urata, M.Akagi. *Tetrahedron Lett.*, **34**, 4015 (1993)
25. D.Forget, O.Renaudet, D.Boturny, E.Defrancq, P.Dumy. *Tetrahedron Lett.*, **42**, 9171 (2001)
26. P.S.Nelson, M.Kent, S.Muthini. *Nucl. Acids Res.*, **23**, 6253 (1992)
27. T.Berthod, Y.Petillot, A.Guy, J.Cadet, D.Molko. *J. Org. Chem.*, **61**, 6075 (1996)
28. A.C.Bajji, D.R.Davis. *Org. Lett.*, **2**, 3865 (2000)
29. M.Sundaram, P.F.Crain, D.R.Davis. *J. Org. Chem.*, **65**, 5609 (2000)
30. H.Vorbruggen, P.Strehlke. *Chem. Ber.*, **106**, 3039 (1973)
31. H.Sawai, A.Nakamura, S.Sekiguchi, K.Yumoto, M.Endoh, H.Ozaki. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1997 (1994)
32. K.Shinozuka, A.Umeda, T.Aoki, H.Sawai. *Nucleosides Nucleotides*, **17**, 291 (1998)
33. S.Kohgo, K.Shinozuka, H.Ozaki, H.Sawai. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 4067 (1998)
34. K.Shinozuka, S.Kohgo, H.Ozaki, H.Sawai. *Chem. Commun.*, 59 (2000)
35. A.Ono, T.Okamoto, M.Inada, H.Nara, A.Matsuda. *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 2231 (1994)
36. H.W.Wanzlick, W.Loche. *Chem. Ber.*, **86**, 1463 (1953)
37. R.S.Ranganathan, G.H.Jones, J.G.Moffat. *J. Org. Chem.*, **39**, 290 (1974)
38. H.Sugiyama, S.Matsuda, K.Kino, Q.-M.Zhang, S.Yonei, I.Saito. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 9067 (1996)
39. A.Kittaka, C.Horii, T.Kuze, T.Asakura, K.Ito, K.Nakamura, T.Miyasaka, J.Inoue. *Synlett*, (Special Issue), 869 (1999)
40. H.Kasai, A.Iida, Z.Yamaizumi, S.Nishimura, H.Tanooka. *Mutation Res.*, **243**, 249 (1990)
41. N.Karino, Y.Ueno, A.Matsuda. *Nucl. Acids Res.*, **29**, 2456 (2001)
42. A.Kittaka, T.Kuze, M.Amano, H.Tanaka, T.Miyasaka, K.Hirose, T.Yoshida, A.Sarai, T.Yasukawa, S.Ishii. *Nucleosides Nucleotides*, **18**, 2769 (1999)
43. E.Trevisiol, A.Renard, E.Defrancq, J.Lhomme. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 8687 (1997)
44. A.Laayoun, J.-L.Decout, E.Defrancq, J.Lhomme. *Tetrahedron Lett.*, **35**, 4991 (1994)
45. E.Trevisiol, A.Renard, E.Defrancq, J.Lhomme. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **19**, 1427 (2000)
46. M.Endo, Y.Saga, M.Komiyama. *Tetrahedron Lett.*, **35**, 5879 (1994)
47. N.Hebert, P.W.Davis, E.L.DeBaets, O.L.Acevedo. *Tetrahedron Lett.*, **35**, 9509 (1994)
48. M.Dechamps, E.Sonveaux. *Nucleosides Nucleotides*, **17**, 697 (1998)
49. J.-M.Tilquin, M.Dechamps, E.Sonveaux. *Bioconjugate Chem.*, **12**, 451 (2001)
50. P.Francois, P.Muzzin, M.Dechamps, E.Sonveaux. *New J. Chem.*, **18**, 649 (1994)
51. J.-J.Vasseur, D.Peoc'h, B.Rayner, J.-L.Imbach. *Nucleosides Nucleotides*, **10**, 107 (1991)
52. M.Manoharan, L.K.Andrade, V.Mohan, S.M.Freier, P.D.Cook. *Nucleosides Nucleotides*, **16**, 1741 (1997)
53. J.-J.Vasseur, B.Rayner, J.-L.Imbach, S.Verma, J.A.Mc Closkey, M.Lee, D.K.Chang, J.W.Lown. *J. Org. Chem.*, **52**, 4994 (1987)
54. J.-J.Vasseur, B.Rayner, J.-L.Imbach. *J. Heterocycl. Chem.*, **25**, 389 (1988)
55. J.R.Bertrand, J.-J.Vasseur, A.Gouyette, B.Rayner, J.-L.Imbach, C.Paoletti, C.Malvy. *J. Biol. Chem.*, **264**, 14172 (1989)
56. D.Proudnikov, A.Mirzabekov. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 4535 (1996)
57. D.Boturny, E.Defrancq, V.Ducros, C.Fontaine, J.Lhomme. *Nucleosides Nucleotides*, **16**, 2069 (1997)
58. V.Nair. *Nucleosides Nucleotides*, **8**, 699 (1989)
59. A.V.Kachalova, T.S.Zatsepin, E.A.Romanova, D.A.Stetsenko, M.J.Gait, T.S.Oretskaya. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **19** (Special Issue), 1693 (2000)
60. R.Schwesinger. *Chimia*, **39**, 269 (1985)
61. C.J.Guinosso, G.D.Hoke, S.Frier, J.F.Martin, D.J.Escker, C.K.Mirabelli, S.T.Crooke, P.D.Cook. *Nucleosides Nucleotides*, **10**, 259 (1991)
62. T.H.Keller, R.Haner. *Helv. Chim. Acta*, **76**, 884 (1993)
63. H.Ozaki, S.Momiyama, K.Yokotsuka, H.Sawai. *Tetrahedron Lett.*, **42**, 677 (2001)
64. Т.С.Зацепин, А.В.Качалова, Е.А.Романова, Д.А.Стеценко, М.Дж.Гейт, Т.С.Орецкая. *Биоорг. химия*, **27**, 45 (2001)
65. Т.С.Затсепин, Д.А.Стетсенко, А.А.Арзуманов, Е.А.Романова, М.Дж.Гейт, Т.С.Орецкая. *Bioconjugate Chem.*, **13**, 822 (2002)

METHODS OF SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES CONTAINING REACTIVE ELECTROPHILIC GROUPS

A.V.Kachalova, E.M.Zubin, T.S.Oretskaya

*Department of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University
Leninskie Gory, 119992 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)939-3181*

Data concerning the methods of chemical synthesis of modified oligonucleotides containing carboxyl or aldehyde functions at the 5'- or 3'-termini or inside the oligomer chain are discussed. The known methods are systematized and their advantages and drawbacks are noted.

Bibliography — 65 references.

Received 20th June 2002