

Нуклеозиды и олигонуклеотиды с реакционноспособными группами при C(2')-атоме: синтез и применение

Т.С.Зацепин, Е.А.Романова, Т.С.Орецкая

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Химический факультет
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского
119992 Москва, Ленинские горы, факс (095)939–3181

Систематизированы известные методы синтеза 2'-функционализированных нуклеозидов и конъюгатов на их основе. Рассмотрено применение модифицированных по 2'-положению нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов.

Библиография — 451 ссылка.

Оглавление

I. Введение	757
II. Синтез модифицированных нуклеозидов с реакционноспособными группами в 2'-положении	758
III. Синтез конъюгатов на основе 2'-модифицированных нуклеозидов и олигонуклеотидов	766
IV. Применение нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов, содержащих реакционноспособные группы в 2'-положении	779
V. Заключение	785

I. Введение

На современном этапе развития молекулярной биологии и медицины невозможно обойтись без синтетических, в том числе модифицированных, олигонуклеотидов. В последнее десятилетие возрастает интерес к использованию олигонуклеотидов и их производных в качестве потенциальных терапевтических средств, которые так или иначе влияют на внутриклеточные превращения нуклеиновых кислот (НК). Предполагается также применение олигонуклеотидов в антисмысловой¹ и антигенной биотехнологии.² Не менее перспективными направлениями являются использование рибозимов³ и аптамеров на основе НК,⁴ а также РНК-интерференция.^{5,6}

Обработка фрагментов природных НК различными химическими реагентами приводит, как правило, к статистическим внутрицепочечным или концевым модификациям. Более универсальным методом является включение модифи-

цированного звена в заранее заданное положение олигомерной цепи в процессе олигонуклеотидного синтеза. При этом реакционноспособные группы могут быть введены в гетероциклическое основание, межнауклеотидную фосфатную группу или углеводный фрагмент. Очевидно, что модифицированные соответствующим образом нуклеиновые кислоты должны сохранять способность к комплементарным взаимодействиям. В связи с этим модификация функциональных групп, участвующих в комплементарных взаимодействиях, нежелательна, поскольку значительно дестабилизирует НК-дуплекс, образованный модифицированным олигомером и комплементарной НК-матрицей.^{7,8} Оптимальное направление модификации гетероциклических оснований — по C(5)-атому пиримидиновых^{9,10} и C(7)-(см.¹¹) или C(8)-атому¹² пуриновых нуклеозидов, что связано прежде всего с минимальными нарушениями структуры полученных модифицированных фрагментов НК. Введение заместителей по межнауклеотидной фосфатной группе приводит к образованию хирального центра и, следовательно, к возможности существования двух стереоизомеров. Модификация по C(2')-атому нуклеозидов представляется наиболее перспективной, так как при включении модифицированного таким образом звена в состав олигонуклеотида искажения в структуре ДНК-дуплекса оказываются минимальными. Кроме того, введение реакционноспособной группы в 2'-положение позволяет получать нуклеозиды как с C(2')-экзо-, так и с C(2')-эндо-конформацией углеводного остатка, а также «направлять» заместитель как в малую, так и в большую бороздку спирали НК-дуплекса.¹³ Задача синтеза 2'-модифицированных олигонуклеотидов сводится к получению амидофосфитного производного нуклеозида, содержащего блокированную реакционноспособную группу, с последующим включением полученного звена в олигонуклеотидную цепь в процессе автоматического синтеза.

Т.С.Зацепин. Аспирант кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ. Телефон: (095)939–3148, e-mail: tsz@yandex.ru

Е.А.Романова. Кандидат химических наук, старший научный сотрудник НИИ ФХБ. Телефон: (095)939–3148, e-mail: romanova@belozersky.msu.ru

Т.С.Орецкая. Доктор химических наук, профессор кафедры химии природных соединений Химического факультета МГУ. 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.

Дата поступления 19 декабря 2003 г.

В данном обзоре проанализированы публикации по синтезу нуклеозидов, содержащих в 2'-положении реакционноспособную группу, которая может быть связана с C(2')-атомом непосредственно или через линкеры различной природы. При этом основное внимание уделено таким производным, которые могут быть встроены в олигонуклеотидную цепь. К реакционноспособным группировкам мы будем относить группы, которые отличаются по реакционной способности от функциональных групп природных нуклеозидов. Нами не рассматриваются модифицированные нуклеозиды, содержащие простую или двойную C—C-связь при C(2')-атоме, поскольку, за редким исключением, эти нуклеозиды не являются потенциальными объектами для конъюгации с другими соединениями и дальнейших превращений.

В обзоре обсуждается также применение нуклеозидов и олигонуклеотидов с реакционноспособными группами при C(2')-атоме.

II. Синтез модифицированных нуклеозидов с реакционноспособными группами в 2'-положении

На сегодняшний день существует большое число методов синтеза нуклеозидов, содержащих нуклеофильные (амино- или тиогруппы), а также электрофильные (карбоксильные, альдегидные и др.) группы в 2'-положении.

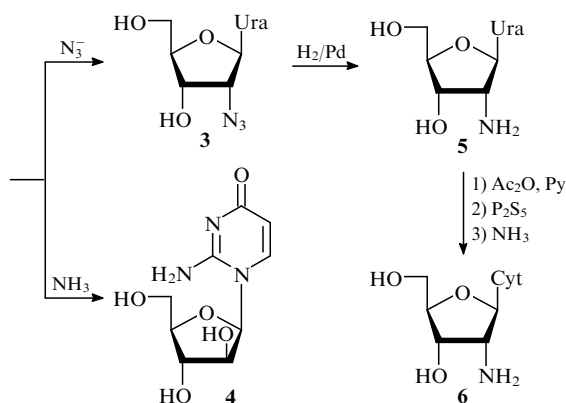
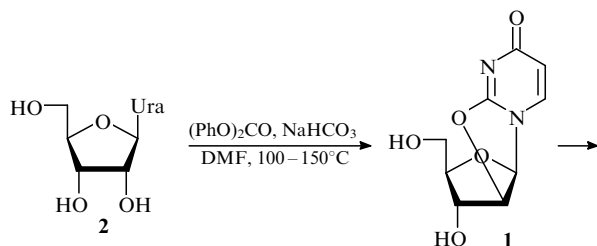
1. Синтез нуклеозидов, содержащих нуклеофильные группы

а. Синтез 2'-амино-2'-дезоксинуклеозидов

Наиболее распространенный путь введения аминогруппы в 2'-положение нуклеозида — это нуклеофильное замещение при C(2')-атоме активированного производного нуклеозида под действием азид-иона с последующим восстановлением азидогруппы в углеводном фрагменте, представлен в обзоре¹⁴. Здесь мы рассмотрим только те работы, которые не были упомянуты в обзоре¹⁴ или были рассмотрены кратко.

Для синтеза пиримидиновых 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозидов наиболее часто в качестве активированного производного используют *O*²,2'-ангидроуридин (**1**). Существует ряд методов получения ангидронуклеозида **1**, из которых чаще всего применяют реакцию уридина (**2**) с дифенилкарбонатом в присутствии гидрокарбоната натрия в качестве основания.^{15, 16} При взаимодействии соединения **1** со слабым нуклеофилом — азид-ионом — образуется 2'-замещенный нуклеозид **3**. В случае более сильного нуклеофильного реагента — аммиака — реакция протекает по гетероциклическому основанию с образованием арабиноизоцитидина (**4**).

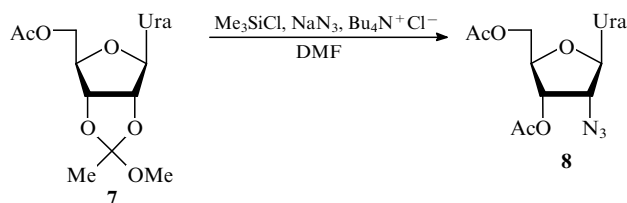
При восстановлении 2'-азидо-2'-деоксиуридина (**3**) получен 2'-амино-2'-деоксиуридин (**5**) с выходом 50%.¹⁷ Последующая модификация соединения **5** по гетероциклическому основанию приводит к аналогичному производному цитидина **6**.



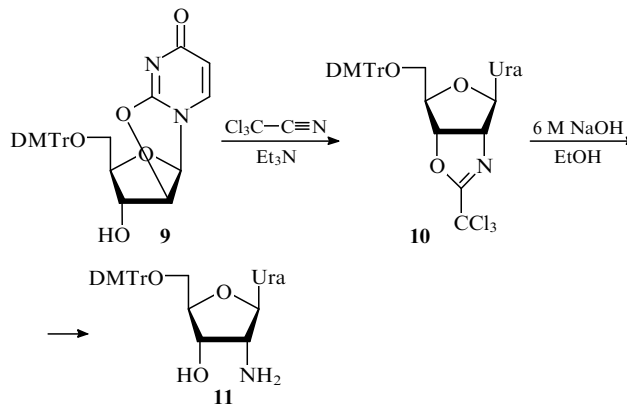
Позже описан похожий метод синтеза пиримидиновых 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозидов исходя из 5'-*O*-тритил- (см.¹⁸) и 3',5'-ди-*O*-бензоил-*O*²,2'-ангидроуридина.¹⁹ В последнем случае происходило частичное удаление защитной группы с 3'-гидроксильной функции.

Выход соединения **3** можно повысить до 70%, генерируя азид лития *in situ* взаимодействием фторида лития с триметилсилилазидом.^{20, 21} Присутствие в реакционной смеси тетраметилэтилендиамина способствует повышению растворимости азид лития в ДМФА за счет комплексообразования с ионами лития, что позволяет увеличить выход азидопродукта **3** до 80%. Аналогичный эффект был достигнут при использовании системы Me₃SiN₃—KF—18-краун-6.²⁰

5'-*O*-Ацетил-2',3'-*O*-(1-метоксиэтилиден)уридин (**7**) может быть использован в качестве исходного соединения при получении защищенного азидоуридина **8**.²² Генерация ангидроуридина происходит *in situ*. Нуклеофильное замещение под действием азид натрия в присутствии Me₃SiCl и Bu₄NCl приводит к соединению **8** с выходом 80%.

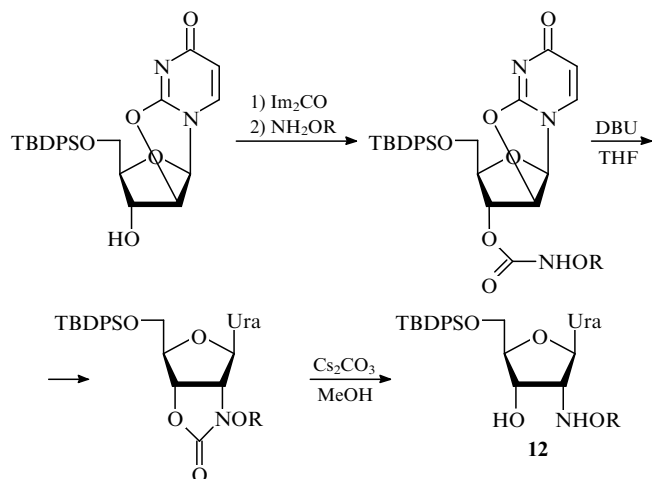


Авторы работы²³ предложили альтернативный подход к синтезу 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозидов. Реакция 5'-защищенного ангидроуридина **9** с трихлорацетонитрилом приводит к образованию циклического трихлорацетимида **10**, последующий гидролиз которого спиртовым раствором щелочи дает целевой 2'-амино-2'-деоксиуридин **11**.

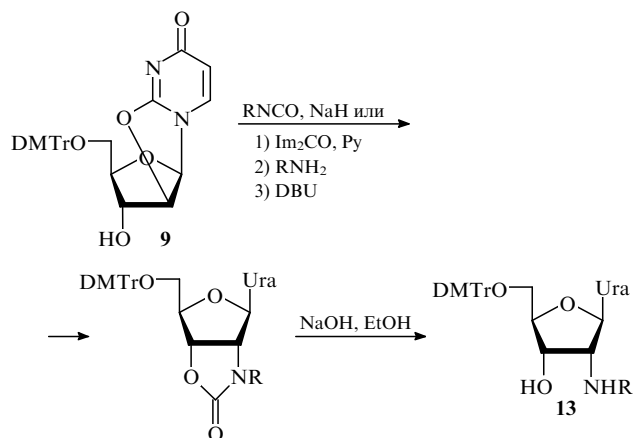


DMTr = (4-MeOC₆H₄)₂PhC.

Применение подобной методологии позволило получить пиримидиновые 2'-алкоксиаминонуклеозиды **12**,^{24,25} 2'-алкиламинонуклеозиды **13**,^{26,27} а также 2'-гидроксиаминонуклеозиды.^{28–30} Использование *трет*-бутилдифенилсилильной защитной группы для 5'-гидроксильной функции позволяет получить хорошо кристаллизующиеся продукты.

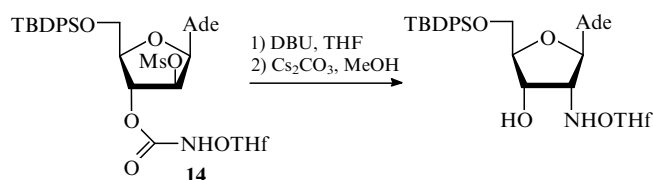


TBDPS = Bu^tPh₂Si; Im — имидазолил; R = Me, Et, Bn, (CH₂)₂OH; DBU — 1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундец-7-ен.



R = Et, (CH₂)₇Me, 2-PyCH₂, 2-Py(CH₂)₂.

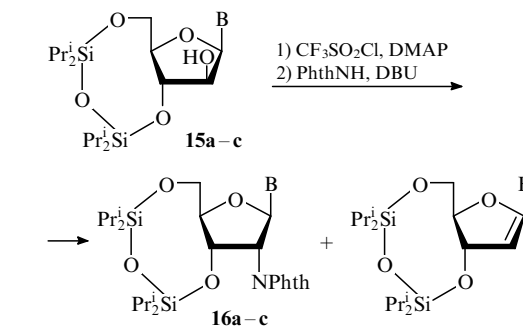
Исходя из метилированного арабиноаденозина **14**, аналогичным способом получен 5'-*O*-трет-бутилдифенилсилил-2'-тетрагидрофуранилоксиамино-2'-дезоксаденозин.²⁹



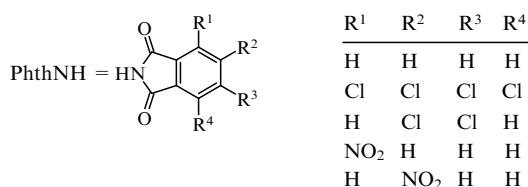
Ms = MeSO₂, Thf — тетрагидрофуранил.

Недавно Бейгельман с соавт.³¹ предложил экономичную схему синтеза защищенных 2'-амино-2'-деоксирибонуклеозидов. Исходные арабинонуклеозиды **15a–c**, в которых 3'- и 5'-ОН-группы блокированы тетраизопропилдисиоксановой (TIPDS) защитой,³² активировали действием трифторметансульфохлорида. Нуклеофильное замещение трифлатной группировки в полученных производных под действием

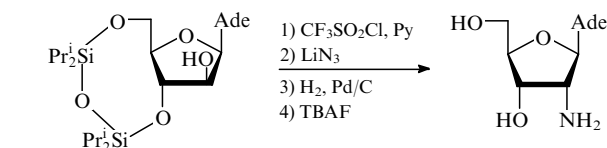
фталимидов, содержащих различные заместители в бензольном кольце, приводило к 2'-фталимидо-2'-дезоксинуклеозидам **16a–c** с выходами 35–70%. Наилучшим нуклеофильным агентом оказался 4,5-дихлорфталимид — при его применении не наблюдалось образование побочных продуктов — 2'-дезоксид-1',2'-дидегидронуклеозидов. Данный подход является препаративным и универсальным для синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов.



B = Ura (a), Ade^{Bz} (b), Cyt^{Ac} (c); DMAP = 4-Me₂NPy;



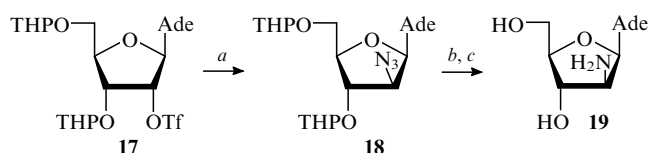
Сходная идеология реализована в работах^{33,34}. В данном случае полученный на первой стадии трифлат защищенного арабиноаденозина вводили в реакцию с азидом лития, после чего восстанавливали азидогруппу.



TBAF = Bu₄N⁺F[–].

Для получения 2'-амино-2'-деоксиарабинонуклеозидов используют нуклеофильное замещение 2'-*O*-сульфонильных групп в соответствующих производных рибонуклеозидов, которое также протекает с обращением конфигурации при C(2')-атоме. Из нуклеозидов указанного типа синтетически более доступны пуриновые.

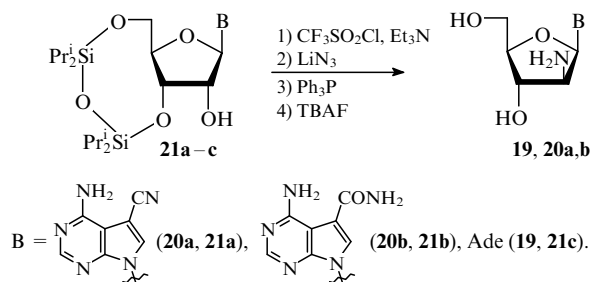
В работе³⁵ из 3',5'-ди-*O*-тетрагидропиранил-2'-*O*-трифторметилсульфонил-аденозина (**17**) синтезирован 2'-азидо-2'-дезоксид-β-D-арабиноаденозин **18**, который после удаления защитных групп восстанавливали в целевой нуклеозид **19**.



THP — тетрагидропиранил, Tf = CF₃SO₂.

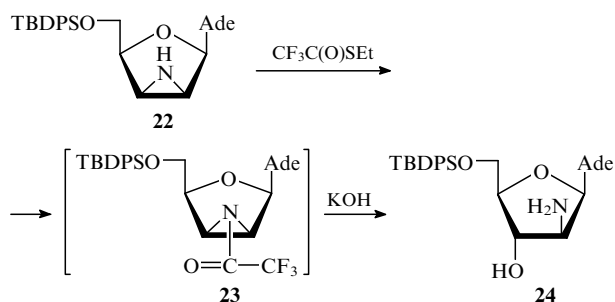
a — NaN₃; b — H⁺; c — Ph₃P, H₂O.

Эта же стратегия использована для получения 2'-амино-2'-дезоксид-β-D-арабиноаденозина (**19**)³⁶ и его аналогов **20a,b**³⁷ из блокированных рибонуклеозидов **21a–c**.

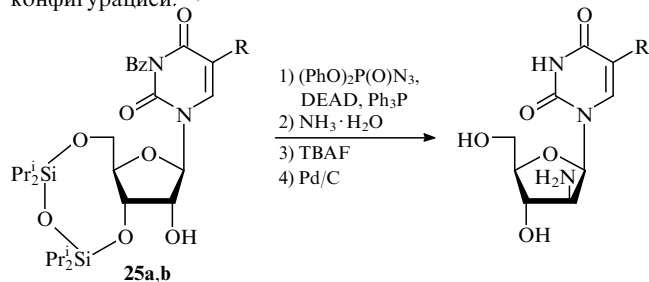


Необходимо отметить, что 2'-*O*-тозилное производное аденозина под действием нуклеофильных агентов в ДМФА претерпевает разрыв гликозидной связи, приводящий к высвобождению аденина.³⁸ В работе³⁹ нуклеофильное замещение тозилксогруппы под действием NaN_3 в гексаметилфосфорамиде хотя и было реализовано, однако с невысокими выходами (46 и 11% для 2'-*O*-(*n*-толуолсульфонил)аденозина и -гуанозина соответственно).

В работе⁴⁰ предложена схема получения 2'-амино-2'-дезоксарабиноаденозина из производного β -D-ликоаденозина **22**. Раскрытие азиридинового кольца в *N*-трифторацетильном производном **23** протекало практически regioнаправленно, и выход соединения **24** составил 49%.

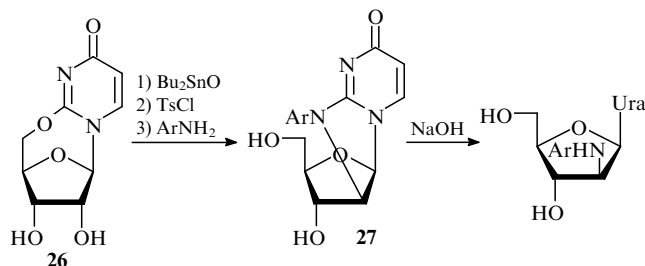


Пиримидиновые 2'-амино-2'-дезоксарабинонуклеозиды синтетически менее доступны и впервые были получены лишь в 1989 г. взаимодействием защищенных рибовуридина **25a** и риботимидина **25b** с дифенилфосфоразидом в присутствии диэтилазидкарбоксилата (DEAD) и трифенилфосфина с последующим восстановлением азидогруппы. Наличие бензильной защиты при N^3 -атоме гетероциклического основания необходимо для предотвращения замыкания $O^2,2'$ -ангидроцикла, приводящего к 2'-аминопроизводным с рибон конфигурацией.^{41, 42}



$\text{R} = \text{H}$ (a), Me (b).

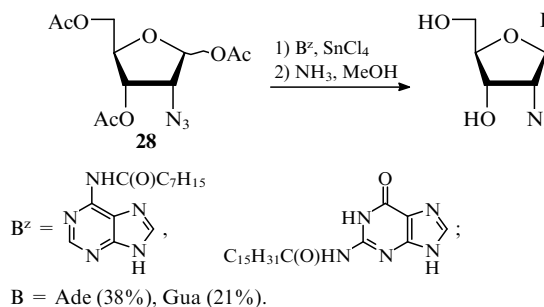
В работе⁴³ предложена оригинальная схема синтеза 2'-ариламино-2'-дезокс- β -D-арабиноуридин из $O^2,5'$ -ангидропроизводного **26**. При селективном тозилровании 2'-гидроксильной группы и последующей обработке ароматическими аминами получались трициклические соединения **27**, которые затем гидролизовали водным раствором щелочи. В случае использования алифатических аминов промежуточные трициклические соединения претерпевали деградацию.



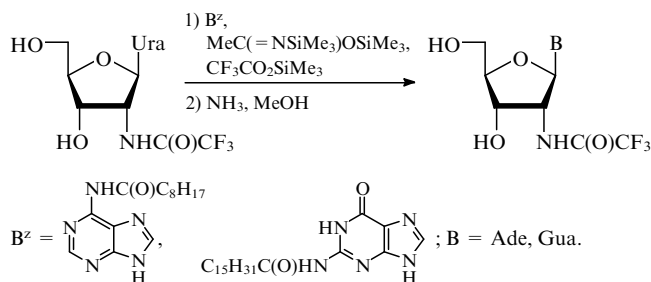
$\text{Ts} = 4\text{-MeC}_6\text{H}_4\text{SO}_2$; $\text{Ar} = \text{Ph}, 4\text{-MeC}_6\text{H}_4$.

Описан также синтез 2'-амино-2'-дезоксиаденозина из 9-(2,3-ангидро-D-ликофуранозил)аденина.⁴⁴

Во всех описанных выше методах синтеза 2'-амино-2'-дезоксинуклеозидов введение аминогруппы осуществляли модификацией активированных производных готовых нуклеозидов. Альтернативная стратегия заключается в реакции гликозилирования гетероциклических оснований предварительно модифицированными сахарами. Первые попытки получения 2'-амино-2'-дезоксипроизводных пуриновых нуклеозидов из D-альтрозы⁴⁵ и глюкозамина⁴⁶ оказались неудачными. Успех был достигнут при гликозилировании пуринов защищенной 2-азидо-2-дезоксирибозой **28**, однако реакция приводила к смеси α - и β -аномеров целевых 2'-азидо-2'-дезоксирибонуклеозидов (в случае гуанозина образуются 7- и 9-изомеры).⁴⁷



Позднее для получения пуриновых 2'-амино-2'-дезоксинуклеозидов была использована реакция трансгликозилирования защищенных аденина и гуанина 2'-трифторацетамидо-2'-дезоксирибонуклеозидом.⁴⁸



Конденсацией 3-*O*-ацетил-5-*O*-бензоил-2-азидо-2-дезоксид-арабинофуранозилхлорида, полученного многостадийным синтезом из D-глюкозы, с силилированным цитозином был получен 1-(2-азидо-2-дезокс- β -D-арабинофуранозил)-цитозин с выходом 37%. В этом случае также наблюдалось образование α -аномера, выход которого составил 10%.⁴¹

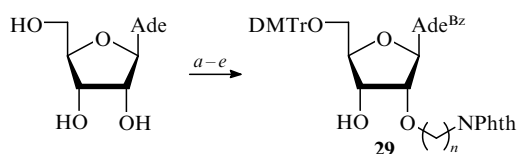
На сегодняшний день известны примеры химико-ферментативного синтеза модифицированных нуклеозидов, сочетающего методы классического органического синтеза с использованием ферментов⁴⁹ и клеточных культур.⁵⁰ Известно,^{51, 52} что 2'-амино-2'-дезоксиаденозин продуцируется бактериями *Actinomadura*. Описано трансгликозилирование

гипоксантина⁵³ и аденина⁵⁴ 2'-амино-2'-дезоксигуанидином в клеточной культуре *Ervinia herbicola* со степенью превращения до 50%. Использование аденозиндезаминазы позволило превратить 2'-амино-2'-деокси-β-D-арабиноаденозин в соответствующее производное инозина.⁵⁵

6. Синтез 2'-O-аминоалкилнуклеозидов

Синтез 2'-O-аминоалкилнуклеозидов можно рассматривать как частный случай алкилирования 2'-гидроксильной группы. Методы получения 2'-O-алкилнуклеозидов описаны ранее в обзоре⁵⁶. В данном параграфе особое внимание будет уделено введению и защите аминофункции.

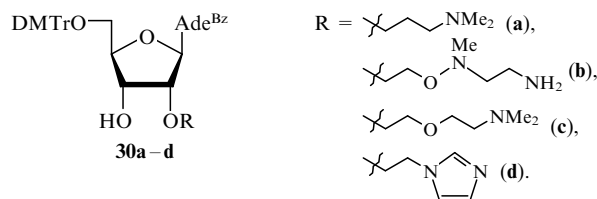
Первые 2'-O-аминоалкилнуклеозиды **29** были получены в 1991 г. Куком и сотр.⁵⁷ В работах^{57–61} свободный аденозин алкилировали фталимидоалкилбромидом в присутствии гидроксида натрия.



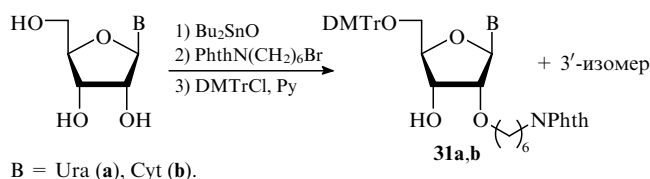
a — PhthN(CH₂)_nBr, NaH, DMF; *b* — Me₃SiCl, Py; *c* — BzCl; *d* — NH₄OH; *e* — DMTrCl, Py; *n* = 2–6.

При этом образуется смесь 2'- и 3'-изомеров, которые могут быть разделены только после бензоилирования экзотической аминогруппы аденина и тритилирования 5'-гидроксильной группы. Хотя общий выход нуклеозидов **29** невысок (10–20%), достоинством этого метода является отсутствие необходимости использовать дорогостоящие реагенты для введения защитных групп и проводить многократное хроматографирование промежуточных продуктов. Кроме того, в данном случае аминоалкильную группу вводят в одну стадию, а применяемая фталоильная защита выдерживает условия олигонуклеотидного синтеза и удаляется при стандартных постсинтетических обработках концентрированным водным раствором аммиака при нагревании. Вместо фталоильной защитной группы можно использовать трифторацетильную⁶² либо 2-цианэтоксикарбонильную.⁶³

В олигонуклеотидном синтезе применяли также нуклеозиды **30a–d**, в которых аминогруппы связаны с O(2')-атомом более сложными линкерами.⁶⁴

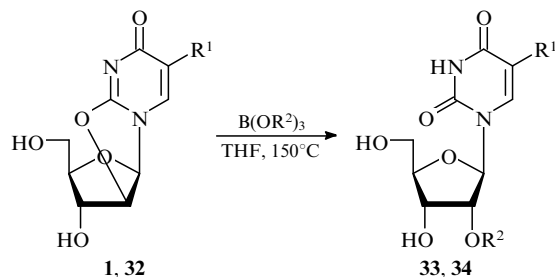


К сожалению, прямое алкилирование незащищенного нуклеозида возможно лишь для аденозина и его аналогов. В синтезе пиримидиновых нуклеозидов **31a,b** металл-направляемое алкилирование *цис*-диолевой группы позволяет повысить общий выход до 46%, но региоспецифичность замещения оказывается низкой (образуется смесь 2'- и 3'-изомеров в соотношении 55 : 45).⁶⁵



B = Ura (**a**), Cyt (**b**).

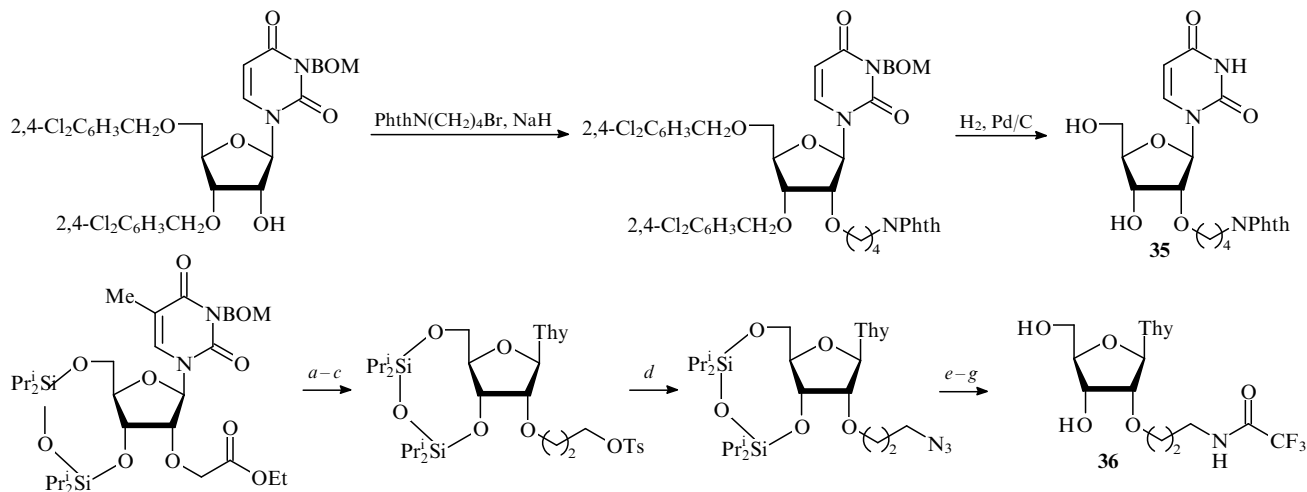
Разработан способ алкилирования O²,2'-ангидроуридина **1** и -тимидина **32** эфирами борной кислоты.^{63, 66–69} Выходы соединений **33**, **34** составляют 15–20%. Раскрытие цикла в соединении **32** провели также в присутствии фталимидоэтанол действием тетраизопропилата титана.⁷⁰



1, **33**: R¹ = H; **32**, **34**: R¹ = Me; R² = (CH₂)_nNPhth; *n* = 2, 3.

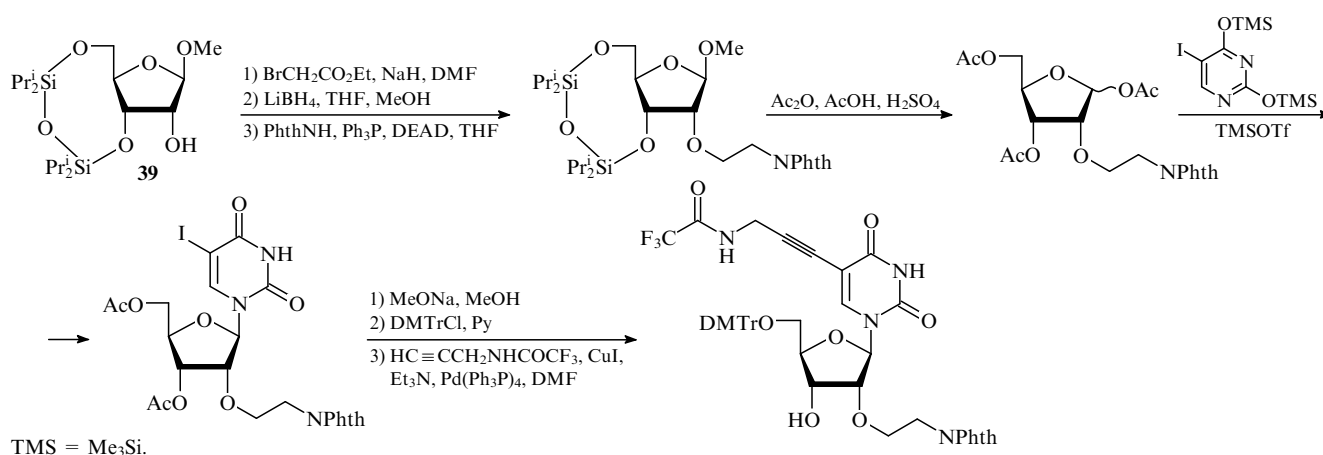
В работах^{71, 72} продемонстрирован более традиционный вариант получения 2'-O-аминоалкилнуклеозидов **35** и **36**, основанный на защите всех реакционных центров молекулы, кроме модифицируемого. Все стадии синтеза протекают с высокими выходами, но за счет их большого числа общий выход составляет 10–25% (схема 1).

Схема 1

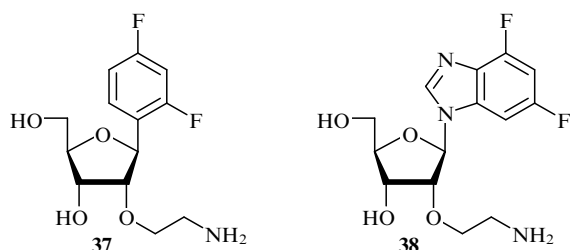


BOM = CH₂OBn; *a* — LiBH₄, MeOH, THF; *b* — TsCl, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂; *c* — H₂, Pd/C; *d* — NaN₃, DMF; *e* — SnCl₂, MeOH; *f* — (CF₃CO)₂O, Py; *g* — TBAF, THF.

Схема 2

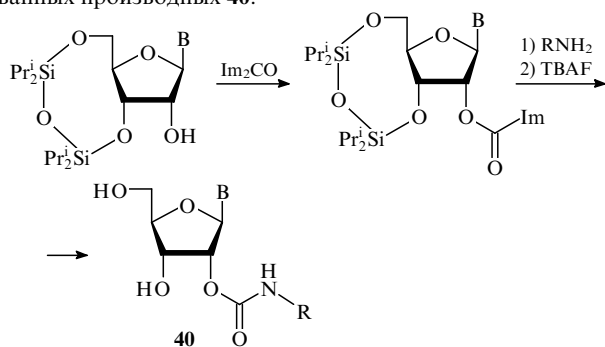


Недавно⁷³ осуществлен аналогичный синтез модифицированных гликозидов **37** и **38** с неприродными агликонами.



Авторы статьи⁷⁴ сначала алкилировали защищенную рибозу, затем вводили аминогруппу в условиях реакции Мицунобу, а гликозилирование проводили на более поздних стадиях синтеза (схема 2).

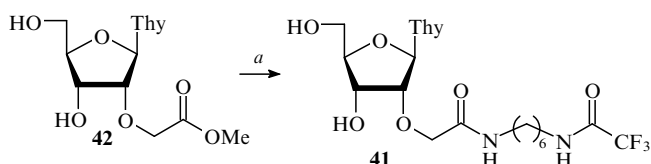
В работах^{75–77} аминоалкильные группы присоединяли к O(2')-атому через карбамильный линкер. Использование такого подхода обеспечивает высокий выход аминоалкилированных производных **40**.



B = Cyt^{Bz}; R = (CH₂)₆NHC(O)CF₃;
B = Ura; R = (CH₂)₂NPhth, CH₂(CH₂CH₂O)₃(CH₂)₂NH₂,
CH₂(CH₂CH₂NH)₂(CH₂)₂NH₂, (CH₂)₃NH(CH₂)₂NH₂, Leu – Phe – NH₂.

Аналогично был получен карбамат 3',5'-блокированного арабиноуридина.⁷⁸

Келлер и Ханер⁷⁹ получили *N*-ацелированный 2'-*O*-(9-амино-2-оксо-3-азанонил)тимидин **41** исходя из нуклеозида **42** с фрагментом гликолевой кислоты в 2'-положении.

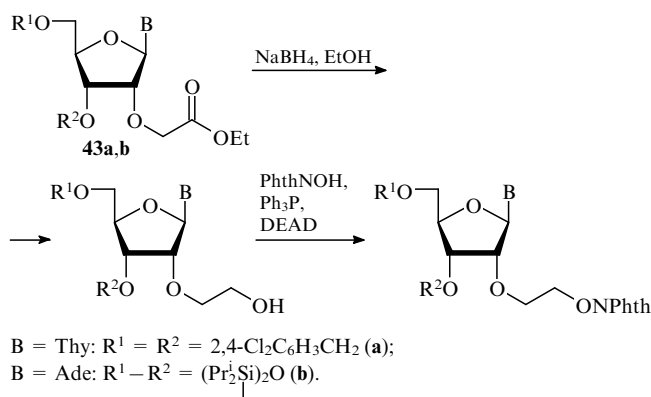


a — H₂N(CH₂)₆NHC(O)CF₃.

в. Синтез нуклеозидов, содержащих аминоксигруппу

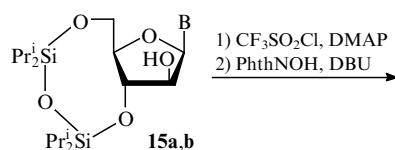
Оптимальным способом введения аминоксигруппы в состав нуклеозидов является обработка их *N*-гидроксифталимидом в условиях реакции Мицунобу.⁸⁰ Данный метод весьма прост, а фталоильная защитная группа совместима с условиями автоматического олигонуклеотидного синтеза.

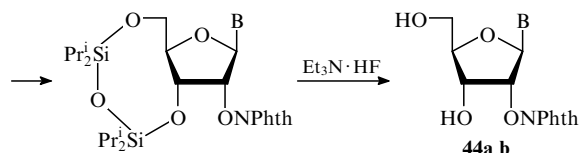
В работах^{81,82} представлен один из вариантов введения аминоксигруппы в 2'-положение защищенного тимидина **43a** и аденозина **43b**.



Недавно предложен^{83–85} более короткий путь синтеза пиримидиновых 2'-*O*-(2-гидроксиэтил)нуклеозидов алкилированием *O*²,2'-ангидронуклеозидов эфирами борной кислоты. Полученные таким образом нуклеозиды являются промежуточными соединениями при синтезе защищенных 2'-*O*-(2-аминоксигрупп)нуклеозидов.

При попытке введения фталимидной группы непосредственно в 2'-положение 3',5'-*O*-защищенных нуклеозидов выход целевых продуктов не превышал 10%, так как вторичная гидроксильная группа малореакционноспособна в условиях реакции Мицунобу. Тем не менее, желаемые продукты **44a,b** можно получить, проводя замещение 2'-*O*-трифлатной группы в производных арабиноуридина **15a** и арабиноаденозина **15b**.⁸⁶ Процесс протекает с обращением конфигурации при C(2')-атоме.



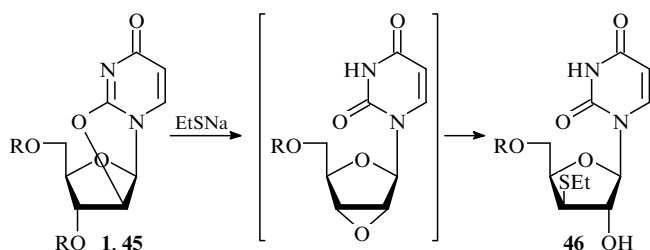


B = Ura (a), Ade (b).

г. Синтез нуклеозидов, содержащих тиольную группу

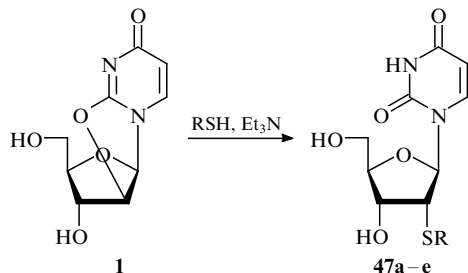
В данном параграфе рассмотрен синтез 2'-тионуклеозидов и 2'-*O*-меркаптоалкилнуклеозидов. Недавно опубликован обзор⁸⁷, посвященный синтезу различных тионуклеозидов, однако методы получения C(2')-производных в нем не представлены.

Первые попытки осуществить взаимодействие свободного *O*²,2'-ангидроуридина **1**⁸⁸ или его защищенного производного **45**⁸⁹ с этантиолатом натрия привели к образованию в качестве основного продукта реакции 3'-*S*-этилтио-3'-дезоксисилоуридина **46**.



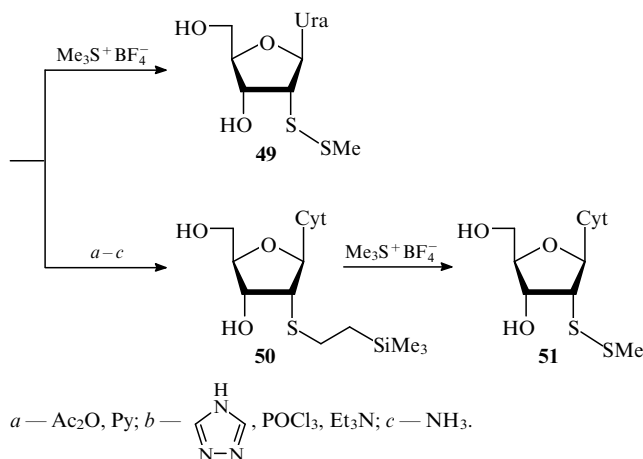
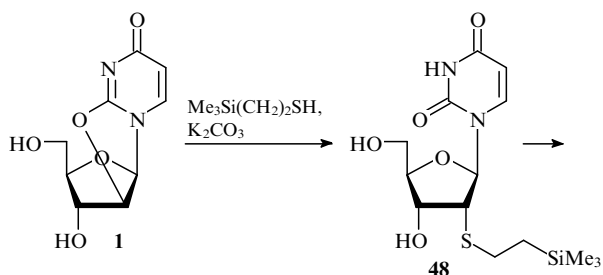
1: R = H; **45**: R = Ac.

Позднее было показано, что для получения 2'-тиопродуктов нуклеозидов **47a–e** нуклеофильное замещение при C(2')-атоме ангидронуклеозида **1** следует проводить более слабыми нуклеофилами — тиоуксусной кислотой^{90,91} и различными тиолами в присутствии триэтиламина или *N*¹,*N*¹,*N*³,*N*³-тетраметилгуанидина.⁹² Этот подход неоднократно использовали в дальнейшем.^{93–96}



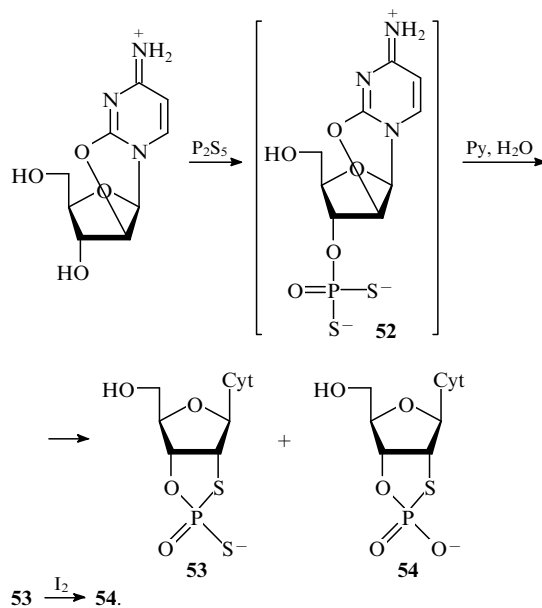
R = Ac (a), Me (b), Et (c), Bn (d), 4-MeOC₆H₄ (e).

Недавно для получения пиримидиновых 2'-тионуклеозидов было предложено использовать 2-(триметилсилил)этантол в присутствии карбоната калия.⁹⁷ Модифицированный таким образом уридин **48** можно легко превратить в смешанный дисульфид **49**, а также в аналогичные производные цитидина **50**, **51**. К недостатку метода следует отнести высокую стоимость реагентов. Попытка деблокирования тиольной группы в соединении **48** фторидом тетрабутиламмония приводит к сложной смеси продуктов.



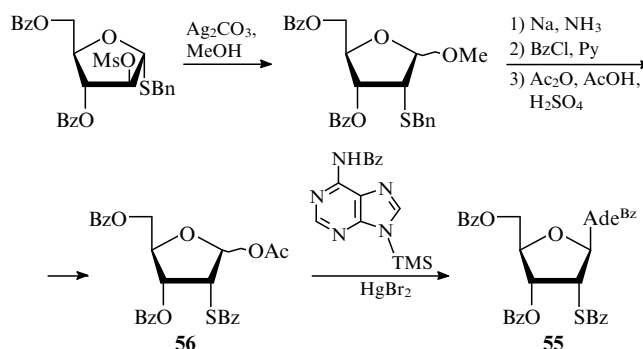
a — Ac₂O, Py; b — , POCl₃, Et₃N; c — NH₃.

Производные 2'-тиоцитидина могут быть получены не только переаминированием уридина,^{93,97} но также размыканием цикла *O*²,2'-ангидроцитидина.⁹⁸ В работе⁹⁸ описана внутримолекулярная атака 3'-*O*-дитиофосфатной группы по C(2')-атому замещенного *O*²,2'-ангидроцитидина **52**. При этом образуется смесь 2',3'-циклодитиофосфата **53** и 2',3'-циклодитиофосфата **54**, который может быть получен из соединения **53** под действием иода.



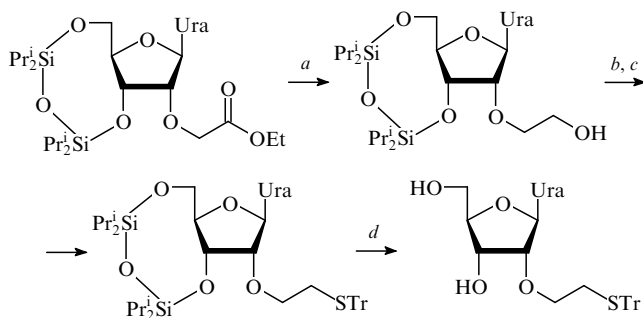
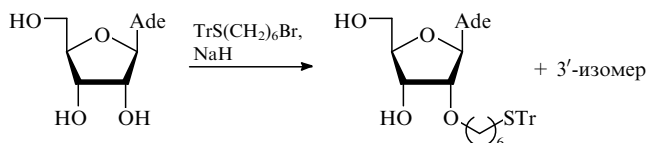
53 $\xrightarrow{I_2}$ **54**.

В работе⁹⁹ описано получение 2'-бензоилтиоаденозина **55** гликозилированием блокированного аденина тиоаналогом рибозы **56**.



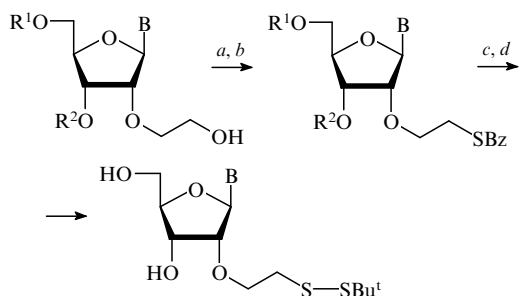
Несмотря на то что 2'-тионуклеозиды впервые были описаны около 25 лет назад, они лишь недавно были использованы в олигонуклеотидном синтезе.^{93,100}

Для получения 2'-*O*-меркаптоалкилнуклеозидов возможны две стратегии: реакция нуклеозида с алкилгалогенидом, содержащим защищенную тиольную группу,^{101–103} либо получение 2'-*O*-гидроксиалкилнуклеозида с последующим превращением гидроксильной группы в тиольную.^{104–107}



a — NaBH_4 , MeOH , Bu^tOH ; *b* — Ph_3P , CBr_4 , MeCN ;

c — TrSH , DBU , C_6H_6 ; *d* — TBAF , THF .



$\text{B} = \text{Ura}$, Cyt^{Bz} , $\text{Gua}^{\text{Bu}^t\text{C}(\text{O})}$; $\text{R}^1 - \text{R}^2 = (\text{Pr}_2^i\text{Si})_2\text{O}$, $\text{R}^1 = \text{R}^2 = \text{Bu}^t\text{Me}_2\text{Si}$.
a — MeSO_2Cl , Py , CH_2Cl_2 ; *b* — BzSH , Et_3N , DMF ; *c* — HF , MeCN ;
d — 1-(*m*pe*m*-бутилтио)гидразин-1,2-дикарбоксиморфолид, LiOH , MeOH , THF .

Кроме того, можно получать целевые 2'-*O*-меркаптоалкилнуклеозиды через бромалкилнуклеозиды.¹⁰⁸

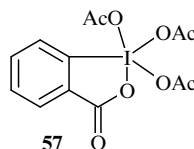
2. Синтез нуклеозидов, содержащих электрофильные группы

В отличие от нуклеофильных группировок, электрофильные группы (за исключением монозамещенной фосфатной и кето-групп) невозможно ввести непосредственно по C(2')-атому нуклеозида. Это связано с тем, что подобные нуклеозиды крайне неустойчивы и подвержены реакции β-элиминирования. Поэтому единственным возможным вариантом присоединения электрофильных групп по C(2')-атому нуклеозида является использование различных линкеров. Недавно был опубликован обзор¹⁰⁹, посвященный получению модифицированных олигонуклеотидов с электрофильными группами, в котором подробно рассмотрен синтез нуклеозидов, содержащих альдегидную и карбоксильную функции. Здесь мы сочли необходимым остановиться на некоторых моментах, не нашедших отражения в указанном обзоре.

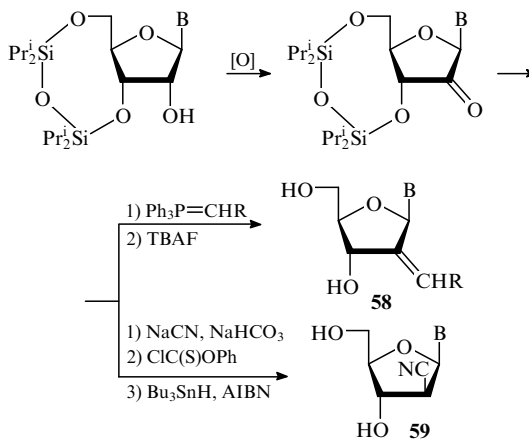
а. Синтез 2'-оксонуклеозидов

Долгое время считалось, что 2'-оксопроизводные нуклеозидов чрезвычайно неустойчивы и претерпевают разложение в силу лабильности *N*-гликозидной связи.¹¹⁰ Тем не менее Робинс и сотр.^{111, 112} успешно провели окисление 3',5'-защищенного уридина при помощи CrO_3 . Позднее этот подход нашел применение в работах^{113, 114}. Мацуда и сотр.^{115–120} получали защищенные 2'-оксонуклеозиды окислением по Сверну системой оксалилхлорид–ДМСО–триэтил-амин.^{121, 122} В этом случае, как правило, требуется защита гетероциклического основания.^{123, 124} Недавно была опубликована работа¹²⁵, в которой проведено сравнение различных ацилирующих агентов при окислении 3',5'-защищенного цитидина по Сверну. Показано, что использование трифторуксусного ангидрида дает максимальный выход 2'-оксоцитидина.

В 1990 г. Робинс и сотр.¹²⁶ применили для окисления 2'-гидроксильной группы «периодинан» Десса–Мартина (1,1,1-триацетоксибензо[*d*]-1,2-иодоксол-3(1*H*)-он) **57**.¹²⁷ Этот метод на сегодняшний день остается лучшим,^{128, 129} так как реакция протекает селективно, а продукт без очистки можно использовать в последующих превращениях.



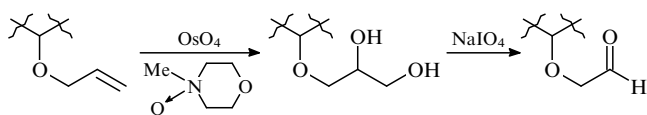
2'-Оксонуклеозиды применяют далее для получения 2'-дезоксид-2'-метиленовых производных **58** по реакции Виттига^{130–133} или цианопродных **59**.^{134, 135} Модифицированные нуклеозиды **58** и **59** активно используют в терапии рака и вирусных заболеваний.^{136, 137} Однако введение этих производных в олигонуклеотидную цепь сильно дестабилизирует НК-дуплекс,¹³⁸ поэтому применение их для синтеза модифицированных олигонуклеотидов представляется нецелесообразным.



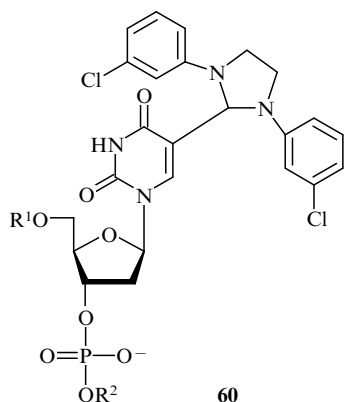
B — свободное или защищенное гетероциклическое основание,
 $\text{R} = \text{Alk}$.

б. Синтез нуклеозидов, содержащих альдегидную группу

Синтез нуклеозидов, содержащих альдегидную группу в 2'-положении, осуществляют окислительным расщеплением их предшественников — *виш*-диольных производных — периодатом натрия.



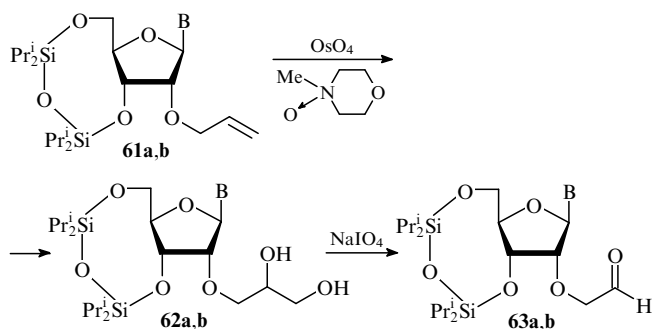
Использование такой стратегии вызвано рядом причин. Во-первых, окисление винильной группы до альдегидной протекает в более мягких условиях, чем окисление первичной гидроксильной группы. Во-вторых, если нуклеозид, содержащий альдегидную группу, предполагается вводить в олигонуклеотидную цепь, то эту функцию необходимо защищать, так как она может взаимодействовать с аминогруппами гетероциклических оснований, производными фосфора(III) и окисляться иодом. К сожалению, подходящей защитной группы для этой цели до сих пор не найдено. Так, предложенная для блокирования альдегидной группы 5-формил-2'-дезоксидеоксиуридина *N,N'*-бис(3-хлорфенил)имидазолидиновая защита¹³⁹ не нашла применения, так как для ее удаления требуется длительная обработка олигонуклеотида **60** 80%-ной уксусной кислотой, что приводит к разрушению даже наиболее устойчивого гомотимидинового олигонуклеотида.



R^1, R^2 — фрагменты олигодезоксирибонуклеотидной цепи.

Примером использования описанной выше методологии являются работы Глика и соавт.,^{105,106} которые получили сначала 2'-*O*-аллильные производные пиримидиновых

нуклеозидов **61a,b**, окислили их до *вин*-диолов **62a,b** и затем до альдегидов **63a,b**.



$B = \text{Ura (a)}, \text{Cyt}^{\text{Bz}} \text{ (b)}.$

Аналогичный подход использован в работах^{140,141} с тем отличием, что *вин*-диольную группу защищенного уридина **62a** бензоилировали и далее получали его 3'-амидофосфитное производное, которое вводили в автоматический олигонуклеотидный синтез. Альдегидную группу генерировали уже на олигонуклеотидном уровне.

Мартин⁷¹ предложил алкилировать 2'-гидроксильную группу защищенного нуклеозида **64** *n*-толуолсульфонатами изопропилиденглицерина и глицидола. *вин*-Диольный фрагмент генерировали кислотным гидролизом изопропилиденовой защитной группы в модифицированном урине **65** или при обработке оксирана **66** водой в присутствии кислоты Льюиса (схема 3).

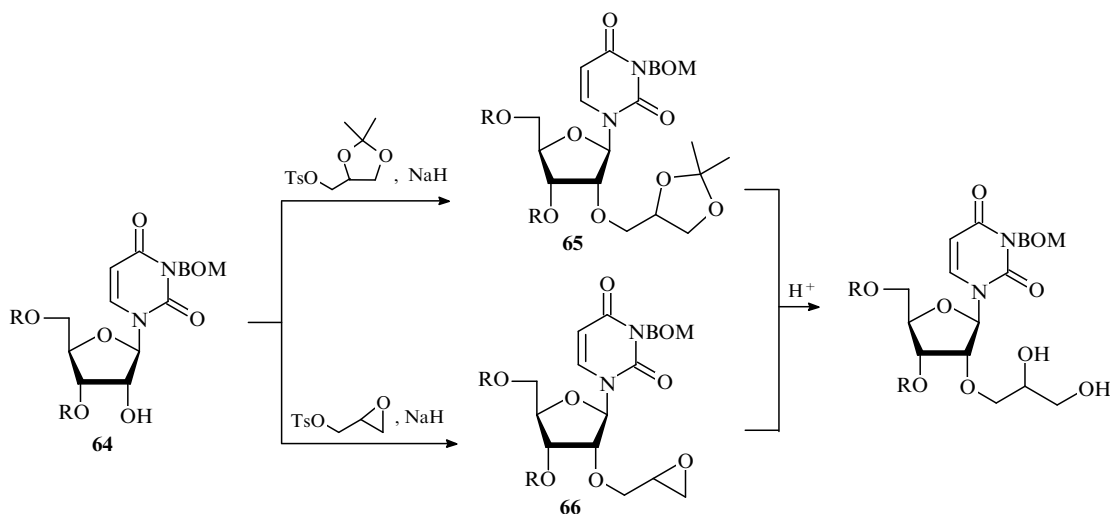
Следует отметить также недавно опубликованные обзоры^{142–144}, посвященные синтезу и применению диальдегидных производных нуклеозидов и олигонуклеотидов.

в. Синтез нуклеозидов, содержащих карбоксильную группу

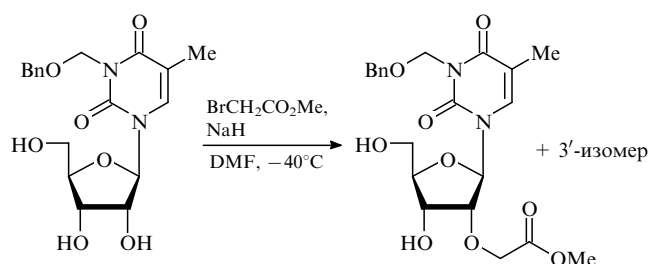
Часть работ, посвященных получению 2'-*O*-алкоксикарбонилметилнуклеозидов, обобщена в обзоре¹⁰⁹. Здесь будут рассмотрены публикации, не вошедшие в обзор¹⁰⁹ или требующие дополнительного обсуждения.

Манохаран и сотр.¹⁴⁵ алкилировали 3-*N*-(бензилоксиметил)риботимидин со свободными гидроксильными группами. Авторам удалось достичь высокой региоспецифичности алкилирования (соотношение изомеров 2':3' = 9:1), однако выход 2'-изомера не указан.

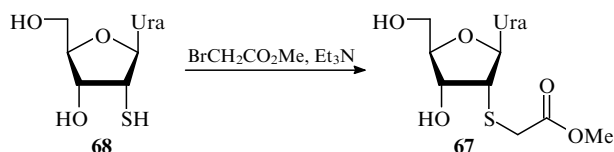
Схема 3



$R = 2,4\text{-Cl}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{CH}_2.$



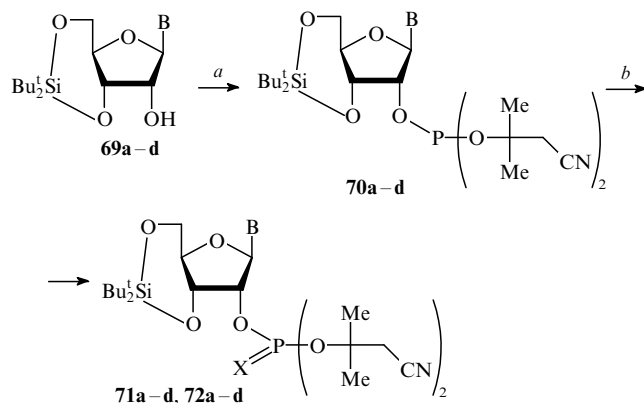
В работах ^{94,95} описано получение 2'-метоксикарбонилметилтио-2'-дезоксинуридина **67**. Алкилирование незащищенного производного **68** метиловым эфиром бромуксусной кислоты в этом случае частично протекало по N(3)-атому гетероциклического основания.



Из литературы известно,¹⁴⁶ что 2'-S-алкильная группа экспонирована в большую бороздку ДНК-дуплекса в отличие от 2'-O-алкильной, которая направлена в малую бороздку.¹⁴⁷ Различное расположение реакционноспособных групп в НК-дуплексе позволяет получать разные по свойствам конъюгаты модифицированных олигонуклеотидов с другими молекулами.

г. Синтез нуклеозидов, содержащих другие электрофильные группы

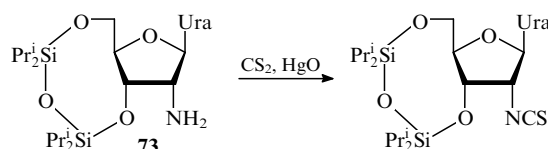
В работах Секине и сотр.^{148,149} представлен синтез нуклеозидов и олигонуклеотидов, содержащих 2'-фосфатную или 2'-тиофосфатную группу. Защищенные по 3'- и 5'-положениям нуклеозиды **69a–d** превращали в производные трехвалентного фосфора **70a–d**, последующим окислением которых *трет*-бутилпероксидом или серой получены 2'-фосфаты **71a–d** и тиофосфаты **72a–d** соответственно.



B = Ura^{Bz} (a), Cyt^{Bu^{CO}} (b), Ade^{Bz} (c);
71a–d: X = O; **72a–d**: X = S;

a — Pr₂NP(OCMe₂CH₂CN)₂, TetrH; b — Bu^tO₂H или S₈;
 TetrH — тетразол.

В работе ¹⁵⁰ описано превращение 2'-аминогруппы модифицированного уридина **73** в изотиоцианатную, которую в дальнейшем можно вводить в реакции с различными нуклеофилами.



Таким образом, методология синтеза модифицированных нуклеозидов, содержащих свободные или защищенные реакционноспособные группы в 2'-положении углеводного фрагмента, достаточно хорошо разработана. Первые используют для создания конъюгатов с различными молекулами, вторые — для получения защищенных амидофосфитных производных, которые вводят в олигонуклеотидный синтез.

III. Синтез конъюгатов на основе 2'-модифицированных нуклеозидов и олигонуклеотидов

В настоящее время существует два принципиально различных подхода к синтезу НК — химический и ферментативный. Синтез абсолютного большинства 2'-модифицированных олигонуклеотидов был осуществлен с использованием химического подхода. Этот подход прежде всего подразумевает получение защищенных производных нуклеозидов для автоматического олигонуклеотидного синтеза. Как правило, для образования природных 3' → 5' межнуклеотидных связей используют 3'-амидофосфитные производные нуклеозидов, хотя возможен ряд исключений. Для блокирования 5'-гидроксильной группы широкое применение получила диметокситригильная защитная группа, а для аминогрупп гетероциклических оснований используют лабильные в щелочной среде защиты. Данный метод позволяет синтезировать олигомеры длиной до 80–100 нуклеотидов. Для получения более длинных НК используют реакции химического ¹⁵¹ или ферментативного ¹⁵² лигирования.

Применение ферментативного подхода, предполагающего включение 5'-трифосфатов нуклеозидов в состав НК при помощи ДНК- и РНК-полимераз, возможно лишь для 2'-амино-2'-деокси-¹⁵³ и 2'-алкоксиаминонуклеозидов.^{154,155} Более того, по своим субстратным свойствам трифосфаты пиримидиновых 2'-амино-2'-дезоксинуклеозидов уступают природным нуклеозидтрифосфатам.¹⁵⁶

Для синтеза 2'-конъюгатов олигонуклеотидов используют три подхода. Первый предполагает первоначальное получение конъюгатов нуклеозидов с другими соединениями с последующим введением их в автоматический олигонуклеотидный синтез. При этом необходимо, чтобы амидофосфитные производные полученных конъюгатов являлись устойчивыми в условиях олигонуклеотидного синтеза и постсинтетических обработок. Преимуществом данного подхода является возможность проведения селективной конъюгации и отсутствие необходимости подвергать олигонуклеотиды постсинтетической модификации. Однако при этом требуются значительные количества модифицированных нуклеозидов, что заметно ограничивает возможности данного метода.

Второй подход предусматривает конъюгацию 2'-модифицированных олигонуклеотидов, иммобилизованных на полимерном носителе. Для этого в процессе твердофазного химического синтеза в состав олигонуклеотида включают модифицированное звено, содержащее блокированную реакционноспособную группу в 2'-положении. Защитная группа в этом фрагменте должна быть устойчива в условиях олигонуклеотидного синтеза и избирательно удаляться по его окончании, не затрагивая вновь образованных связей в блокированном олигонуклеотиде. Для защиты 2'-гидроксильных и аминогрупп используют аллилоксикарбонильную группу, которая удаляется комплексами палладия(0), и флуоренилметоксикарбонильную группу, которую удаляют мор-

фолином или пиперидином. Левулиноильную и фталоильную группы применяют соответственно для защиты гидроксильных и аминогрупп. Эти защитные группы удаляют гидразиолизом. Для блокирования карбоксильной группы используют флуоренилметильную защиту, которую снимают морфолином или пиперидином. Кроме того, применяют различные фотолabile защитные группы. Использование *трет*-бутилдиметилсилильной и *трет*-бутилдифенилсилильной защитных групп возможно только в случае проведения автоматического синтеза на полистирольном полимерном носителе, так как стекло с контролируемым размером пор разрушается в условиях удаления этих защит под действием фторид-аниона.

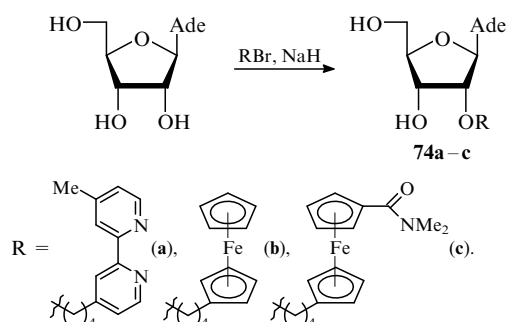
После деблокирования реакционноспособной группы проводят реакцию конъюгации, полученный конъюгат олигонуклеотида, иммобилизованный на полимерном носителе, отмывают от избытков реагентов, деблокируют функциональные группы и отщепляют от твердой фазы. Реакцию конъюгации, как правило, осуществляют в безводных органических растворителях, особенно при получении конъюгатов с гидрофобными соединениями, плохо растворимыми в водной и водно-органической среде. Селективное удаление 2-цианэтильных защит с фосфатных групп действием морфолина повышает гидрофильность защищенного олигонуклеотида и позволяет проводить реакции конъюгации в водно-органической среде. При этом необходимо учитывать, что защита гетероциклических оснований повышает лабильность *N*-гликозидной связи.

Третий подход предполагает получение конъюгатов олигонуклеотидов в растворе. При этом защитная группировка, используемая для блокирования реакционноспособной группы в 2'-положении, должна быть устойчива в условиях олигонуклеотидного синтеза и по возможности удалиться в процессе стандартных постсинтетических обработок. Ограничением данного метода является возможность протекания побочных реакций по аминогруппам гетероциклических оснований, например при образовании амидной связи с соединениями, содержащими карбоксильную группу.

1. Синтез 2'-конъюгатов нуклеозидов

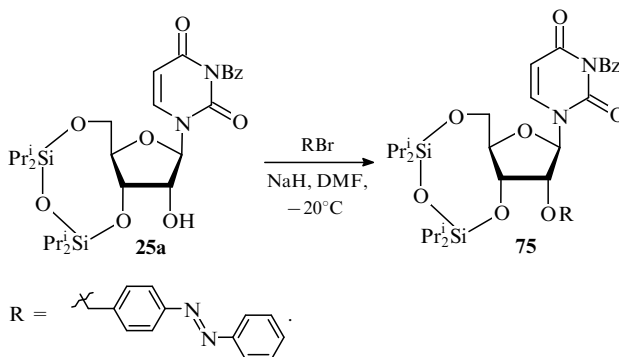
Можно выделить три варианта синтеза 2'-конъюгатов нуклеозидов с различными соединениями. Первый подход предполагает присоединение различных молекул непосредственно по 2'-гидроксильной группе нуклеозида путем образования простой эфирной,⁵⁶ карбаматной⁷⁶ или фосфотриэфирной¹⁵⁷ связи. Другой вариант предусматривает предварительное присоединение по C(2')-атому линкера, содержащего amino-⁵⁷ или карбоксильную группу,⁷⁹ которая затем взаимодействует с другим соединением с образованием амидной связи. Кроме того, можно проводить ацилирование 2'-амино-2'-дезоксинуклеозида.

В работах^{158–160} описано получение производных аденозина **74a–c**, содержащих остатки 2,2'-бипиридина и ферроцена, присоединенные к O(2')-атому через бутиленовый линкер. Реакция алкилирования аденозина идет региоспеци-

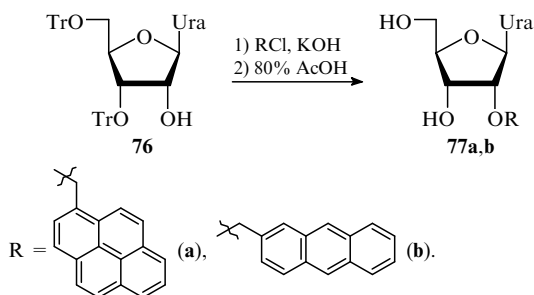


фично с образованием незначительных количеств 3'-производных.

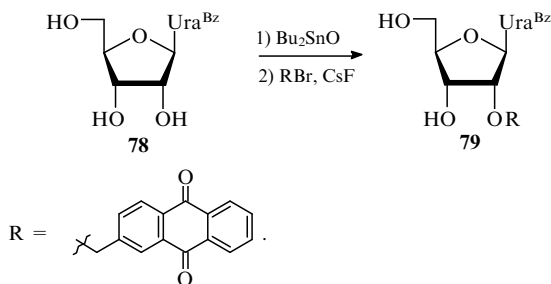
Похожий вариант алкилирования использовали авторы работы¹⁶¹ для введения фрагмента азобензола по O(2')-атому защищенного уридина **25a**. Полученное производное **75** деблокировали и включали в состав олигонуклеотида.



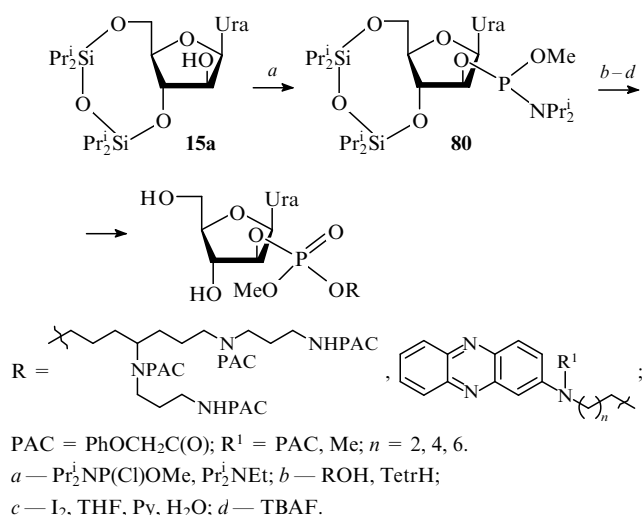
Для введения в углеводный фрагмент нуклеозида полиароматических молекул проводили алкилирование 3',5'-защищенного уридина **76** замещенными метилхлоридами в присутствии гидроксида калия.^{162, 163} Интересно отметить, что при этом не затрагивалось гетероциклическое основание, и соединения **77a,b** были единственными продуктами реакции.



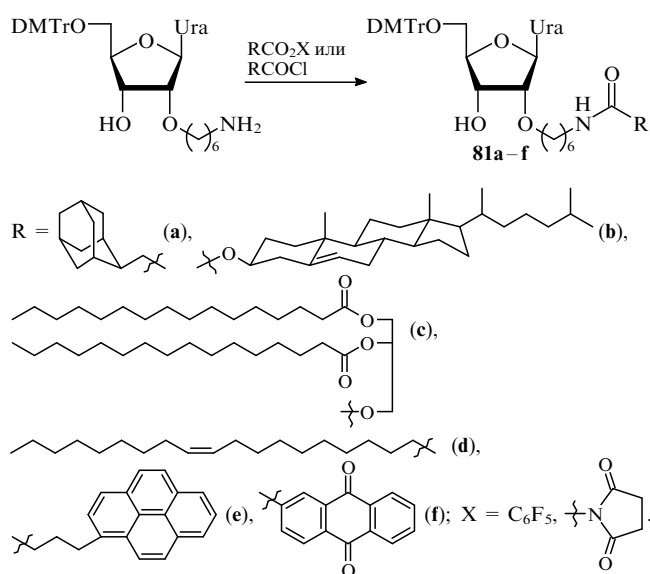
Металл-направляемое алкилирование уридина описано в работах^{164, 165}. Предварительно *виц*-диольную систему 3-*N*-бензоилуридина (**78**) активировали оксидом дибутилолова и полученный интермедиат вводили в реакцию с 2-бромметилантрахиноном. Наличие в реакционной смеси фторида цезия увеличивает долю 2'-изомера **79**.



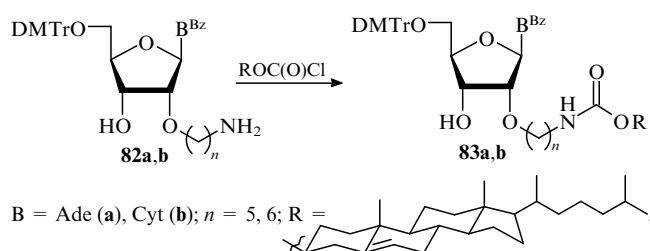
Чаттопада и сотр.^{166, 167} разработали простую и удобную схему, в которой C-гомолог спермина присоединяли к нуклеозиду через 2'-фосфатную группу. Первоначально из защищенного арабиноуридина **15a** получали 2'-амидофосфит **80**, который вводили во взаимодействие с гидроксипроизводным аналога спермина, а затем окисляли фосфорсодержащий фрагмент и деблокировали гидроксильные группы. В данных работах спермин рассматривали в качестве катионного соединения, способного увеличивать стабильность НК-дуплекса за счет взаимодействия с фосфатными группами противоположной цепи. Аналогично по O(2')-атому арабиноуридина через фосфатную группу вводили производные феназина.¹⁵⁷



Другой подход к синтезу 2'-конъюгатов нуклеозидов был разработан Куком и сотр.,^{168, 169} которые вводили фрагменты различных соединений в 2'-положение уридина через аминоксильный линкер. Этим способом исходя из одного модифицированного нуклеозида были получены гидрофобные производные **81a-d**,^{168, 169} флуоресцентная **81e**¹⁷⁰ и электрохимическая **81f**¹⁷¹ метки, пригодные к встраиванию в олигонуклеотидную цепь.

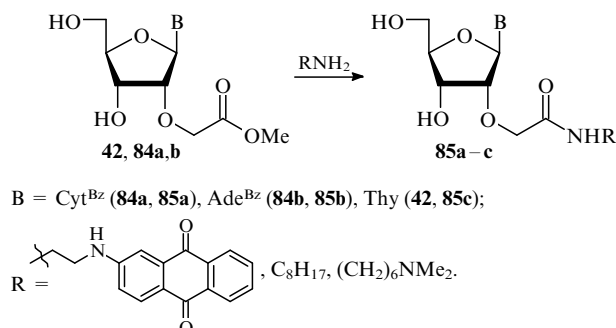


Те же авторы¹⁷² присоединили холестерин к модифицированным нуклеозидам **82a,b**. Полученные производные **83a,b** вводили в стандартный автоматический олигонуклеотидный синтез. Наличие остатка холестерина в составе модифицированных олигонуклеотидов сильно влияет на их фармакодинамику.



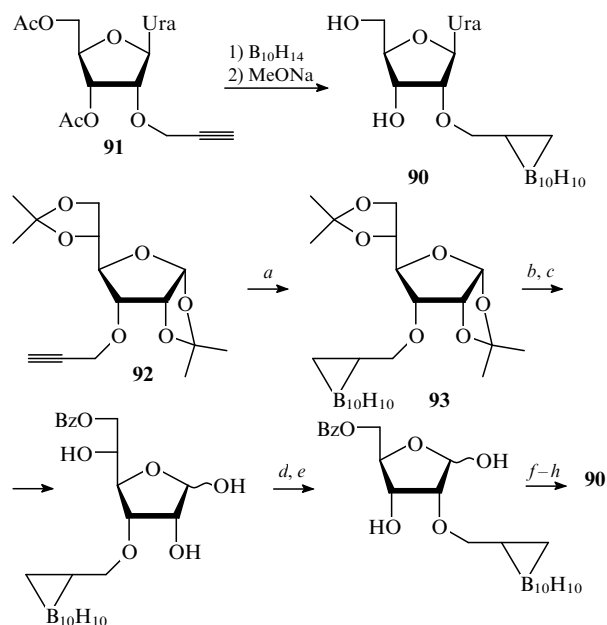
Келлер и Ханер^{79, 173} проводили реакцию 2'-O-(метоксикарборанилметил)нуклеозидов **42** и **84a,b** с 2-[(2-аминоэтил)-

амино]антрахиноном, октиламино и 6-(N,N-диметиламино)гексиламино. Полученные конъюгаты нуклеозидов **85a-c** затем превращали в амидофосфитные производные и включали их в олигонуклеотидную цепь. Наличие в молекулах олигонуклеотидов таких модификаций увеличивает термическую стабильность образованных ими ДНК-дуплексов по сравнению с природными аналогами.



Секине и сотр.^{174, 175} исходя из защищенного уридина **86**, содержащего активированную 2'-карбоксильную группу, и блокированного 5-аминометил-2'-дезоксидуридина **87** получили динуклеозид **88**, который далее был превращен в динуклеозидфосфат с фиксированной конформацией¹⁷⁴ и встроен в состав олигонуклеотида **89** (схема 4).¹⁷⁵

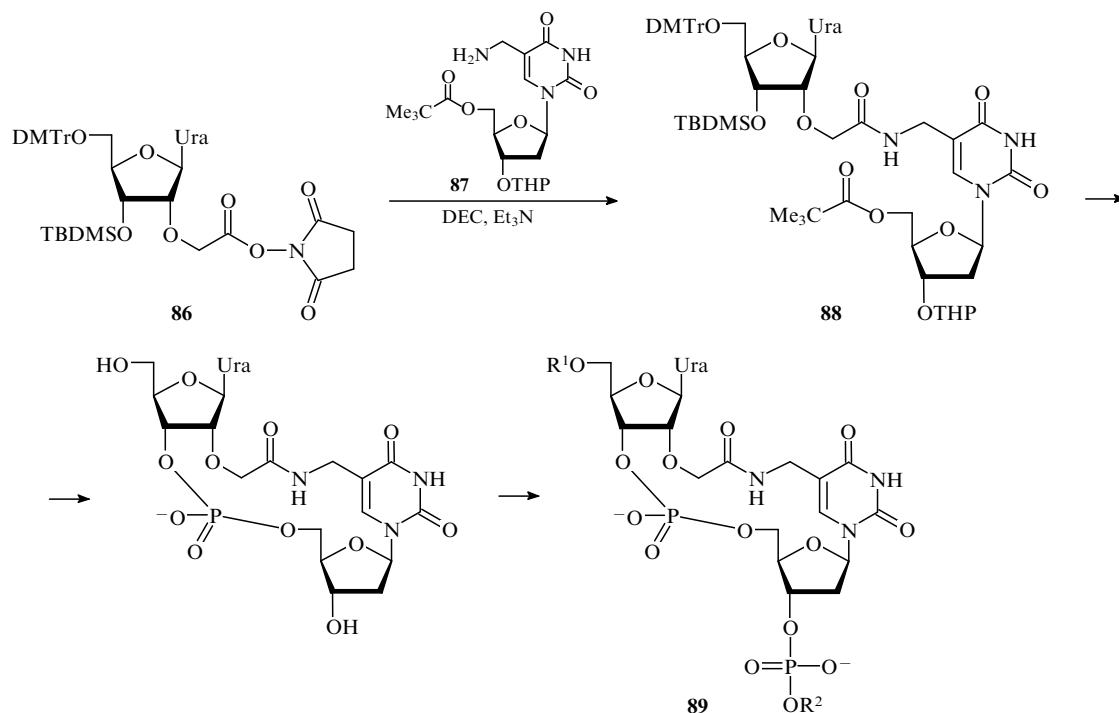
Синтез 2'-O-карборанилметилуридина **90** осуществлен исходя из пропилильного производного уридина **91**^{176, 177} или защищенной аллофуранозы **92**.¹⁷⁸ В последнем случае присоединение декаборана к углеводу **92** приводило первоначально к 3'-изомеру **93**, который после удаления изопропиленовой защиты и расщепления *цис*-диольной системы подвергали изомеризации и гликозилировали.



$a - \text{B}_{10}\text{H}_{14}$; $b - \text{H}^+$; $c - \text{BzCl}$; $d - \text{NaIO}_4$; $e - \text{Py}, \text{H}_2\text{O}, \Delta$;
 $f - \text{Ac}_2\text{O}, \text{Py}$; $g - \text{Ura}^{\text{TMS}}, \text{TMSOTf}$; $h - \text{MeONa}$.

Карборанилнуклеозиды используют в борнейтронзахватной терапии раковых опухолей.^{179, 180} Как показали исследования *in vivo*,¹⁸¹ нуклеозид **90** успешно проникает в клетки, но не фосфорилируется. Внутриклеточная концентрация бора при этом составляет 5–35 мкг·г⁻¹, что достаточно для проведения эффективной борнейтронзахватной терапии. В дальнейшем было показано,¹⁸² что включение нуклеозида **90** в олигонуклеотидную цепь заметно уменьшает стабильность ДНК-дуплекса. Скорее всего, это обусловлено образованием отрицательно заряженной *нидо*-

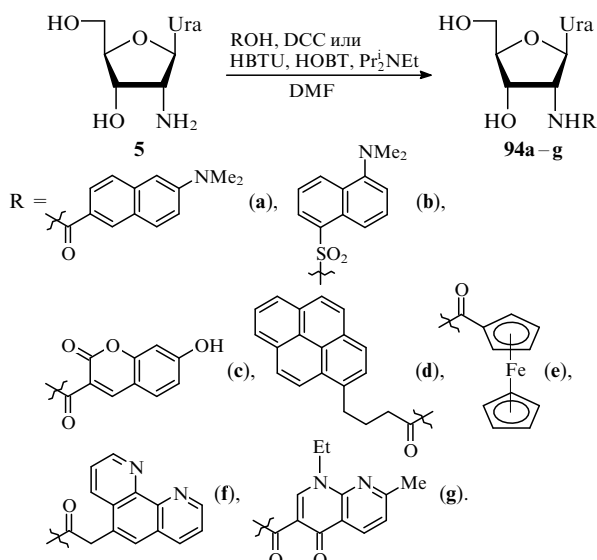
Схема 4



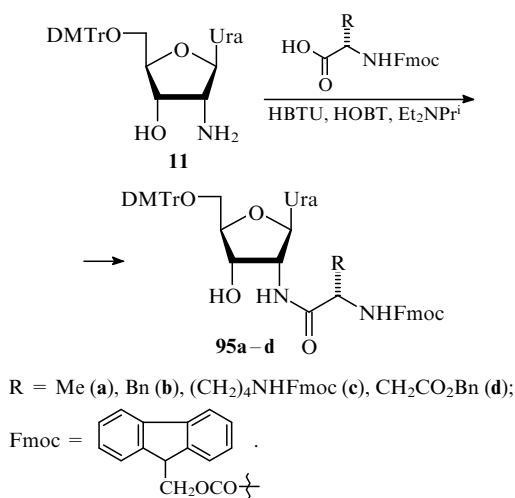
TBDMS = Bu^tMe₂Si; DEC = Me₂N(CH₂)₃N=C=NEt; R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

формы карборана под действием аммиака в процессе стандартных постсинтетических обработок.

Для получения конъюгатов на основе 2'-амино-2'-дезоксинуридина **5** проводили ацилирование аминогруппы кислотами, активированными дициклогексилкарбодиимидом (DCC) или смесью 1-гидроксibenзотриазола (HOBt) и гексафторфосфата *O*-(бензотриазол-1-ил)-*N,N,N',N'*-тетраметилуридина (HBTU). Этим способом в 2'-положение нуклеозида были введены флуоресцентные метки: 6-диметиламино-2-нафталин (**94a**),^{183, 184} дансильная группа (**94b**),¹⁸⁵ кумарин (**94c**),¹⁸⁶ пирен (**94d**),¹⁸⁷ а также электрохимическая метка ферроцен (**94e**),^{188–190} фенантролин (**94f**)¹⁹¹ (химическая нуклеаза в присутствии многозарядных ионов металлов) и налидиксовая кислота **94g**,¹⁹² при включении которой на 3'-конец олигонуклеотида значительно увеличивается термическая стабильность полученного дуплекса.



Авторы работы¹⁹³ ацилировали защищенный 2'-амино-2'-дезоксинуридин **11** рядом аминокислот. Полученные производные **95a–d** превращали в амидофосфиты и включали в состав РНК для создания устойчивых конъюгатов с высокой каталитической активностью.



Недавно¹⁹⁴ на основе защищенного 2'-амино-2'-дезоксиридина **95с**, ацилированного *N*-блокированным лизином, был получен бисконъюгат **96** с перацетилгалактозамином. К сожалению, амидофосфитное производное нуклеозида **96** крайне плохо вступало в последующие реакции из-за значительных стерических затруднений.

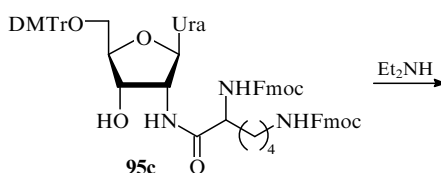


Схема 5

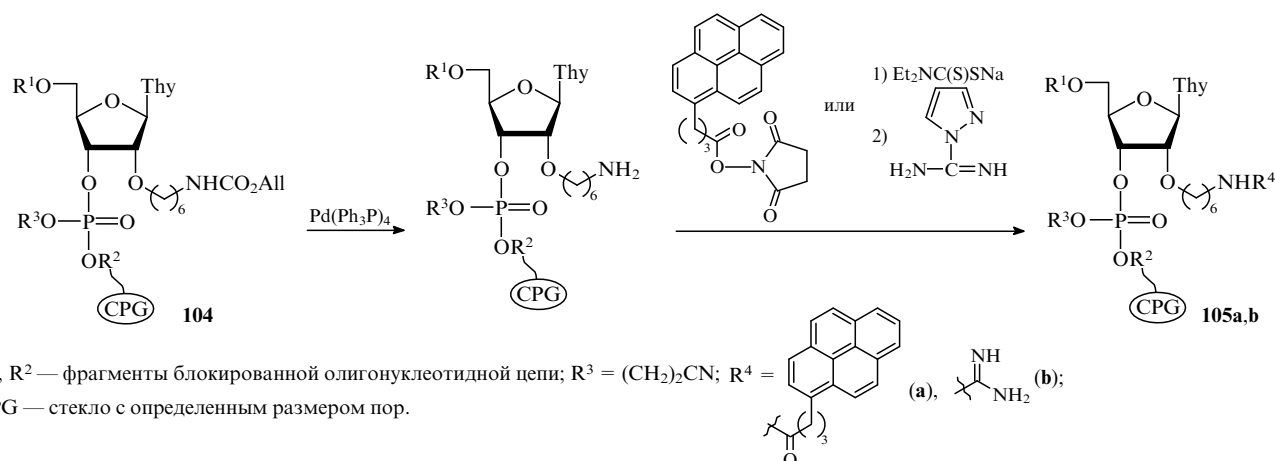
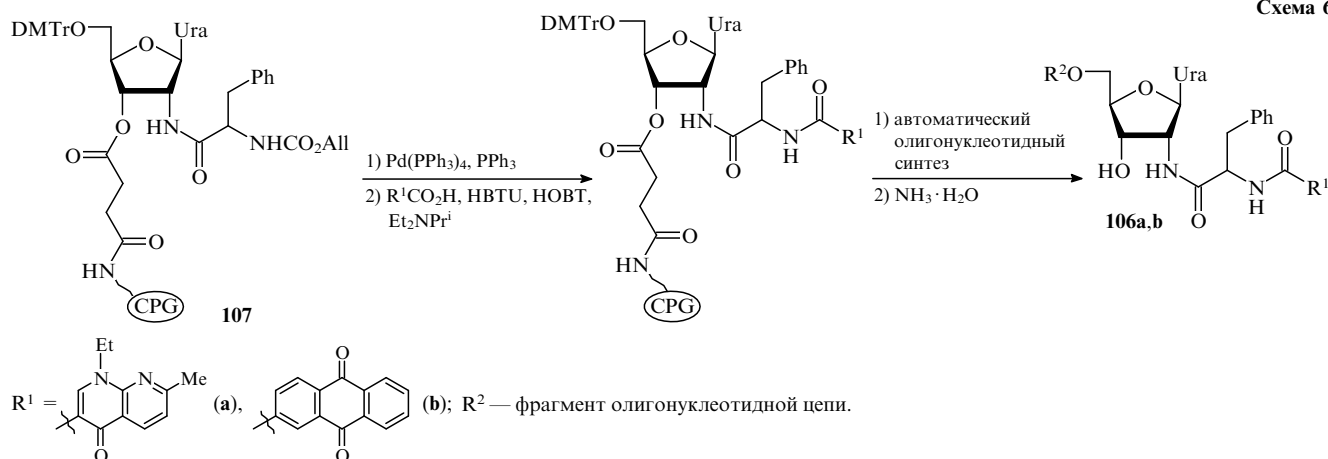


Схема 6



олигонуклеотида, содержащего аминогруппу, смесью активированных карбоновых кислот с последующим разделением продуктов. Комбинаторные библиотеки олигонуклеотидов активно используют в биоорганической химии и молекулярной биологии, в частности для поиска наиболее устойчивых к действию нуклеаз соединений.²⁰⁸

В работе Манохарана и сотр.²⁰⁹ представлен вариант получения конъюгатов на основе иммобилизованных олигонуклеотидов **104**, содержащих блокированный 2'-O-(6-аминогексил)нуклеозид. Селективное удаление аллилоксикарбонильной защитной группы комплексом палладия(0) позволило провести реакцию с *N*-гидроксисукцинимидным эфиром пиренилмасляной кислоты с образованием соединения **105a**. При этом сохранялись межнуклеотидные связи и защитные группы гетероциклических оснований и межнуклеотидных фосфатов. Позже те же авторы²¹⁰ провели синтез олигонуклеотидов **105b**, содержащих гуанидиновую группировку, присоединенную к 2'-O-аминогексильному линкеру (схема 5).

Недавно опубликована работа²¹¹, посвященная синтезу конъюгатов олигонуклеотидов **106a,b**, содержащих на 3'-конце 2'-ацелиамидную группировку. Нуклеозид с остатком *N*-защищенного фенилаланиламида в 2'-положении иммобилизовывали на полимерном носителе с использованием стандартного сукцинатного линкера. Далее аллилоксикарбонильную защитную группу в соединении **107** селективно удаляли, иммобилизованный нуклеозид ацилировали и вводили в стандартный олигонуклеотидный синтез (схема 6).

Другой метод введения аминогруппы на 3'-конец олигонуклеотида основан на использовании 5'-амидофосфитного

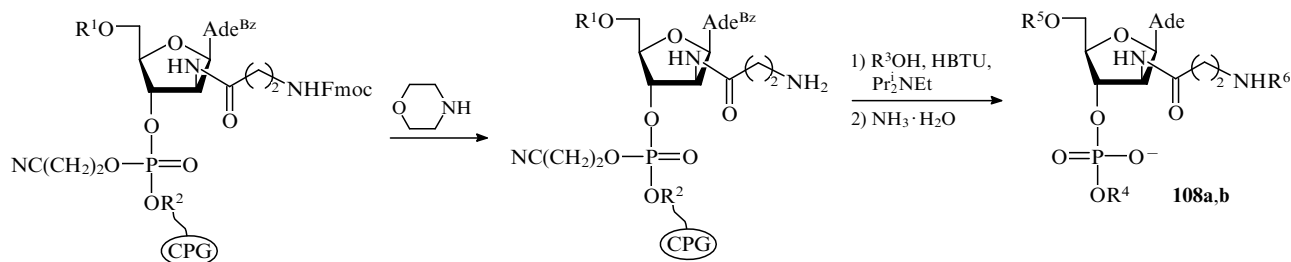
производного модифицированного нуклеозида, которое встраивают в олигонуклеотидную цепь в ходе обращенного (5' → 3') автоматического олигонуклеотидного синтеза.²¹¹ Высокие выходы на стадии *N*-ацелирования позволили получить комбинаторную библиотеку и изучить устойчивость 3'-конъюгатов олигонуклеотидов к действию нуклеаз.²⁰⁸

В работе Орецкой и соавт.²¹² описан синтез пептид-олигонуклеотидных конъюгатов. Защищенную аминогруппу 2'-(β-аланил)амидо-2'-дезоксарабиноаденозина, включенного в состав олигонуклеотидов, селективно деблокировали морфолином или пиперидином. Дальнейшее ацилирование *N*-блокированными пептидами и удаление защитных групп приводило к получению целевых конъюгатов **108a,b** со степенью превращения 80–90% (схема 7).

Хванг и Гринберг^{213,214} предложили использовать для 2'-аминогруппы модифицированных нуклеозидов 4,5-диметокси-2-нитробензилоксикарбонильную защиту, удаляемую при облучении. Изучена реакционная способность 2'-амино-2'-дезоксидеокси- и 2'-O-(4-аминобутил)уридина в составе олигонуклеотидов в реакциях ацилирования. В ряде случаев выходы продуктов **109**, **110** оказались довольно низкими (например, выход олигонуклеотид-пептидного конъюгата **110b** составил 30%) (схема 8).

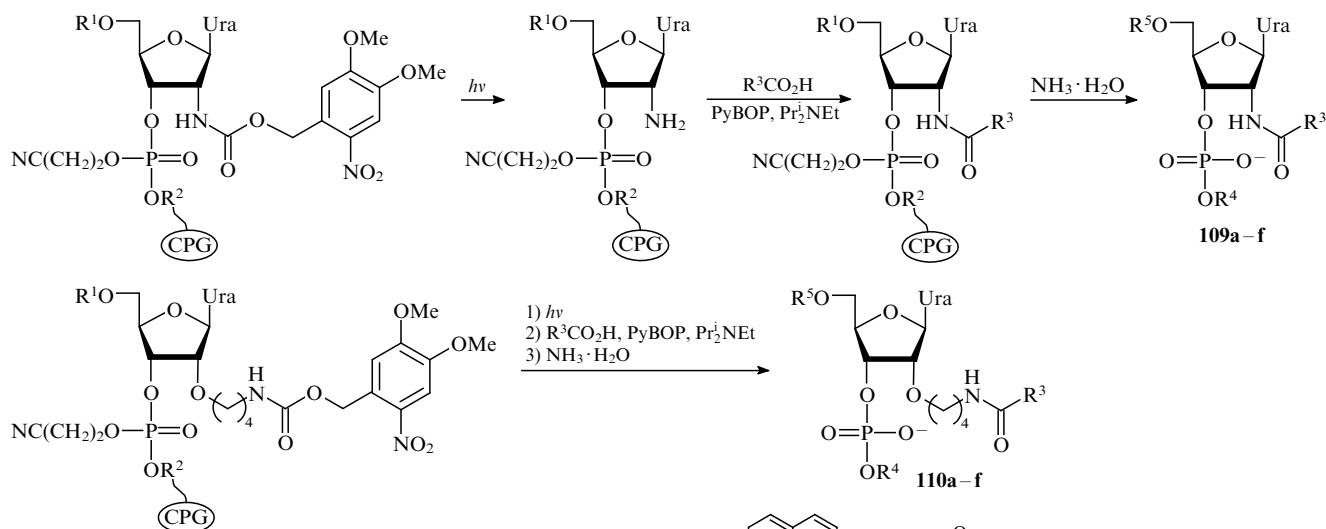
Манохаран и соавт.²¹⁵ для блокирования аминоксигруппы модифицированных нуклеозидов использовал фталионильную защитную группировку, которая селективно удаляется гидразинолизом. Аминоксигруппа чрезвычайно реакционноспособна при взаимодействии с карбонильными соединениями. Такой способ конъюгации широко используют в пептидной химии.²¹⁶ Получаемые оксимы устойчивы в широком интервале pH. При необходимости они могут

Схема 7



R^1, R^2 — фрагменты защищенной олигонуклеотидной цепи; $R^3 = -\text{Gly}-\text{LeuNHFmoc}, -\text{Gly}-\text{Phe}-\text{D-Ala}-\text{TyrNHFmoc}$;
 R^4, R^5 — фрагменты деблокированной олигонуклеотидной цепи; $R^6 = -\text{Gly}-\text{LeuNH}_2$ (a), $-\text{Gly}-\text{Phe}-\text{D-Ala}-\text{TyrNH}_2$ (b).

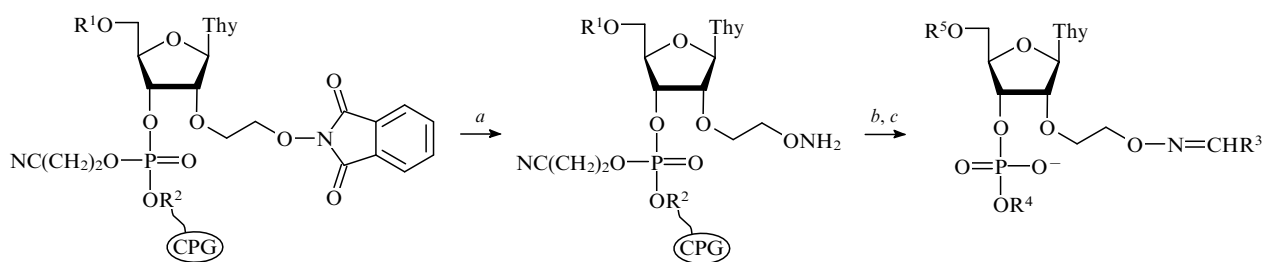
Схема 8



R^1, R^2 — фрагменты защищенной олигонуклеотидной цепи; $R^3 =$ (a), (b), (c), (d), (e), (f); R^4, R^5 — фрагменты деблокированной олигонуклеотидной цепи;

PyBOP — гексафторфосфат бензотриазол-1-илокситрис(пирролидино)фосфония.

Схема 9



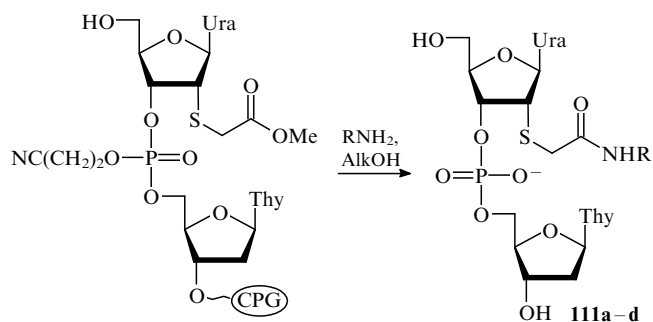
a — $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Py, AcOH; b — R^3CHO , DMF или MeCN; c — $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

R^1, R^2 — фрагменты блокированной олигонуклеотидной цепи; $R^3 =$; R^4, R^5 — фрагменты деблокированной олигонуклеотидной цепи.

быть восстановлены до *N,O*-дизамещенных гидросиламинов, которые еще более стабильны в жестких условиях (схема 9).

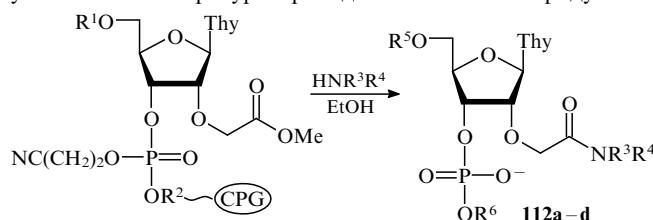
Саваи и сотр.^{94,95} предложили одновременно осуществлять удаление защит и превращение сложноэфирной группы в составе модифицированного звена в амидную. Таким образом получены динуклеозидмонофосфаты с незамещенной

карбамоильной группой **111a**, алкильным остатком **111b**, аминогруппой **111c** и дендримером **111d** в 2'-положении. Необходимо отметить, что при использовании более сложных аминов выходы целевых продуктов снижались. В случае применения вместо тимидина и уридина *N*-защищенных аденозина, цитидина и гуанозина возможна побочная реакция переминирования.



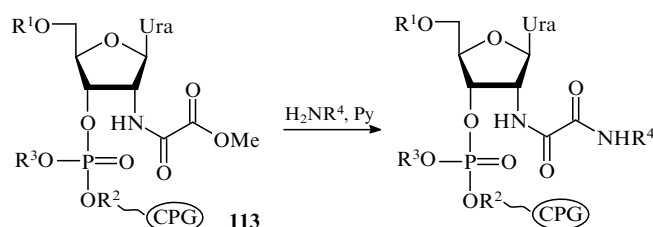
$\text{R} = \text{H}$ (a), $(\text{CH}_2)_6\text{Me}$ (b), $(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ (c), $(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)_2$ (d); $\text{Alk} = \text{Me}, \text{Et}$.

Эта методология получила развитие в работе Манохарана и сотр.¹⁴⁵ При использовании первичных аминов высокие выходы соединений **112a–c** достигались за сутки при комнатной температуре, но при проведении реакции с диметиламином выход соединения **112d** составил лишь 50%, а увеличение температуры приводило к побочным продуктам.



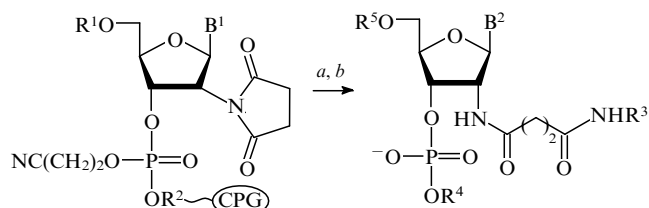
R^1, R^2 — фрагменты блокированной олигонуклеотидной цепи;
 $\text{R}^3 = \text{H}; \text{R}^4 = \text{H}$ (a), Me (b), $(\text{CH}_2)_2\text{NMe}_2$ (c); $\text{R}^3 = \text{R}^4 = \text{Me}$ (d);
 R^5, R^6 — фрагменты деблокированной олигонуклеотидной цепи.

Полушин²⁰² получил ряд олигонуклеотидов **113**, содержащих метоксалиламидную группу в 2'-положении углеводного фрагмента. Данная группировка более электрофильна по сравнению с обычной сложноэфирной, что позволяет проводить реакцию с аминами в более мягких условиях без одновременного отщепления олигонуклеотида с полимера.



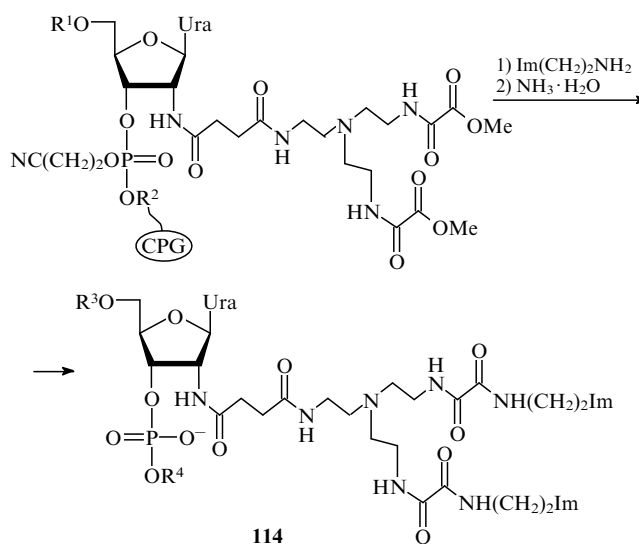
R^1, R^2 — фрагменты блокированной олигонуклеотидной цепи;
 $\text{R}^3 = (\text{CH}_2)_2\text{CN}; \text{R}^4 = (\text{CH}_2)_{12}\text{NH}_2$.

Авторы работ^{203, 204, 217} предложили использовать 2'-сукцинимидные производные 2'-дезоксиридина и -цитидина, пятичленный имидный цикл в которых раскрывается при взаимодействии с различными аминами.



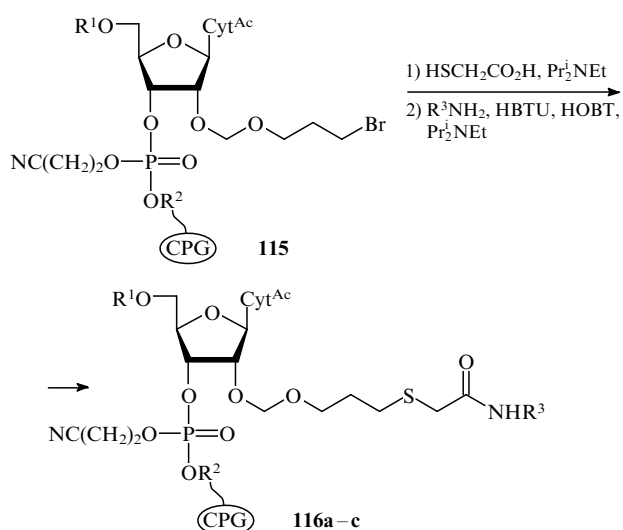
$\text{B}^1 = \text{Ura}, \text{Cyt}^{\text{Bz}}; \text{B}^2 = \text{Ura}, \text{Cyt}; \text{R}^1, \text{R}^2$ — фрагменты блокированной олигонуклеотидной цепи; $\text{R}^3 = \text{Me}, (\text{CH}_2)_2\text{OH}, (\text{CH}_2)_6\text{OH}, (\text{CH}_2)_3\text{NMe}_2, (\text{CH}_2)_n\text{Im}; n = 2, 3; \text{R}^4, \text{R}^5$ — фрагменты деблокированной олигонуклеотидной цепи; $a - \text{R}^3\text{NH}_2; b - \text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Те же авторы^{204, 217} описали синтез дендримерных конструкций на основе 2'-сукцинимидо-2'-дезоксиридина, включенного в состав олигонуклеотидной цепи. Первоначально к модифицированному нуклеозидному звену присоединяли разветвленные полиамины, после чего свободные аминогруппы ацилировали метоксалилтетразолом. Обработка полученного дендримера гистамином приводит к конъюгату **114** — потенциальной химической нуклеазе.

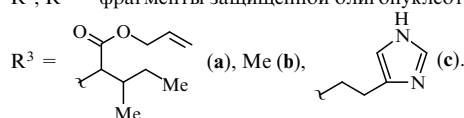


R^1, R^2 — фрагменты блокированной олигонуклеотидной цепи;
 R^3, R^4 — фрагменты деблокированной олигонуклеотидной цепи.

Введение в состав олигонуклеотида бромалкильной группировки позволяет проводить конъюгацию с такими нуклеофилами, как тиолы и азид натрия.^{108, 218} Так, в работе²¹⁹ для получения конъюгатов олигонуклеотидов с аминами сначала синтезировали модифицированные олигонуклеотиды **115**, содержащие при O(2')-атоме ω-бромалкильную группу. Последние, будучи иммобилизованными на полимерном носителе, обрабатывали тиогликолевой кислотой в присутствии основания. В полученных кислотах активировали карбоксильную группу и вводили их в реакцию с различными аминами с образованием соединений **116a–c**.



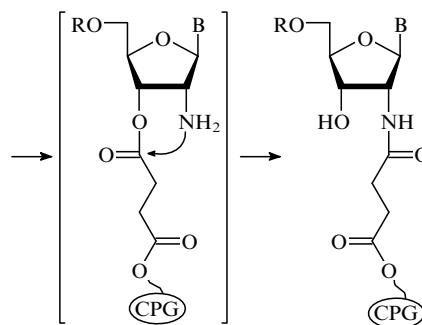
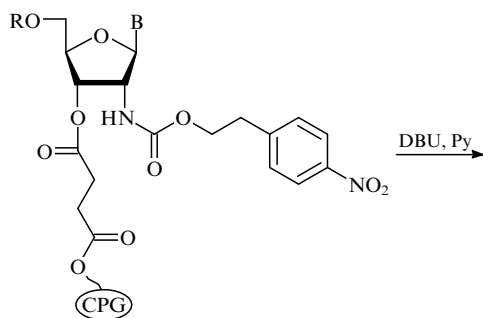
R^1, R^2 — фрагменты защищенной олигонуклеотидной цепи;



3. Синтез конъюгатов олигонуклеотидов в растворе

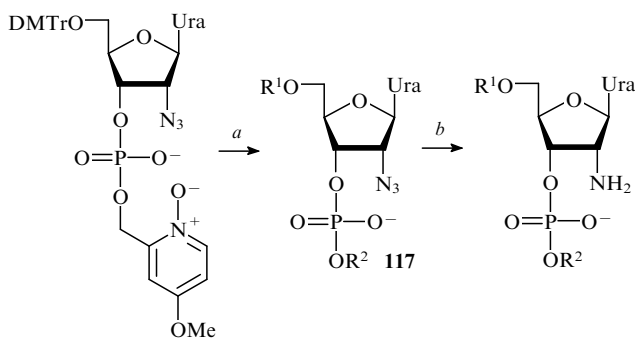
Для конъюгации в растворе наибольшее распространение получили олигонуклеотиды, содержащие пиримидиновые 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозидные звенья. Аминогруппа, находящаяся в 2'-положении, обладает $pK_a = 6.2$,²²⁰ что было подтверждено методом спектроскопии ЯМР 1H (см.²²¹) и ^{13}C (см.²²²). Это позволяет селективно ацилировать ее за счет варьирования pH, не затрагивая аминогруппы гетероциклических оснований, имеющие pK_a в интервале 3–5. Основным недостатком такой модификации является значительное снижение температуры плавления дуплексов, образованных 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеотидами с немодифицированными НК. Так, температура плавления 15-звенного дуплекса уменьшается на 2.7–13.8°C в зависимости от природы дуплекса и расположения модификации в цепи.²²³

Важной проблемой при включении 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозидов в олигонуклеотидную цепь является выбор защитной группы для аминофункции модифицированного звена. Предложено использовать для этой цели трифторацетильную защиту, однако конденсация коммерчески доступного амидофосфитного производного 2'-трифторацетида-2'-дезоксинуридина с растущей олигонуклеотидной цепью протекает с относительно низким выходом (~90% за 10 мин),²²⁴ что может быть связано со значительной электроотрицательностью трифторацетильной защитной группы. Данная проблема может быть решена путем увеличения времени конденсации,²²⁵ однако при этом протекают побочные реакции, снижающие общий выход олигонуклеотида.²²⁶ Трифторацетильную защитную группу также использовали для защиты аминофункции 2'-амино-2'-дезоксигуанозина.²²⁷ Флуоренилметоксикарбонильная защитная группа полностью удовлетворяет условиям олигонуклеотидного синтеза, но блокированное таким образом амидофосфитное производное 2'-амино-2'-дезоксинуридина оказалось нестабильно в растворе ацетонитрила, более того, разрушается даже в твердом состоянии при $-20^\circ C$.^{224, 228} Тем не менее эту защитную группу применяли в работе²²⁹. Было предложено также использовать фталимидную группировку,²²⁴ которую вводили с высокими выходами, полностью удаляли при стандартных постсинтетических обработках, но эффективность конденсации удалось увеличить лишь на 3–5%. Применение 2-(4-нитрофенил)этоксикарбонильной защитной группы^{230, 231} нельзя назвать удачным, так как для ее удаления требуется предварительная обработка блокированного олигонуклеотида 1 М раствором DBU в пиридине в течение 12 часов. Кроме того, защищенный таким образом 2'-амино-2'-дезоксинуклеозид не может быть иммобилизован на полимерном носителе с помощью сукцинатного линкера, что связано с протеканием внутримолекулярной $O \rightarrow N$ миграции ацильной группы при деблокировании. Прочность амидной связи в образующемся 2'-сукцинамиде делает невозможным удаление модифицированного олигонуклеотида с полимерного носителя.



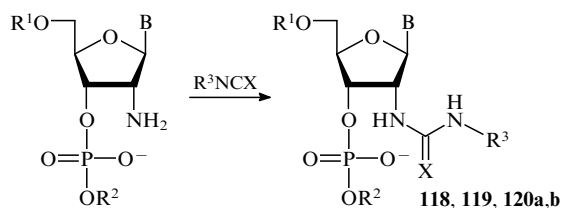
R — фрагмент блокированной олигонуклеотидной цепи;
B — защищенное гетероциклическое основание.

Принципиально другой подход к синтезу олигонуклеотидов с 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозидными звеньями был предложен Полушиным и соавт.²³² В данном случае олигонуклеотиды **117**, содержащие 2'-азидо-2'-дезоксинуридин, получали с использованием фосфотриэфирного метода. Далее азидогруппу восстанавливали до аминогруппы действием трифенилфосфина или трис(2-карбоксиил)фосфина (ТСЕР) в присутствии воды. Однако такой подход не получил распространения в связи с тем, что твердофазный фосфотриэфирный метод синтеза олигонуклеотидов сейчас практически не используется. Это обусловлено большей длительностью цикла и меньшими выходами на стадиях конденсации по сравнению с фосфитным методом. Тем не менее на сегодняшний день это единственный подход, позволяющий получать олигонуклеотиды с 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозидными звеньями в середине цепи.



a — олигонуклеотидный синтез; b — Ph_3P или ТСЕР, H_2O , MeCN;
 R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

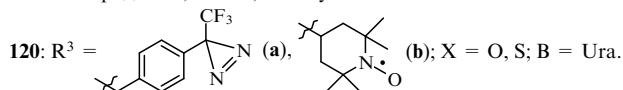
Синтез конъюгатов на основе олигонуклеотидов с 2'-аминогруппами проводят по реакции *N*-ацилирования в боратном, фосфатном или карбонатном буфере при pH 8–8.5. В этих условиях аминогруппы гетероциклических оснований протонированы, что позволяет проводить реакцию селективно по 2'-аминогруппе модифицированного звена. В качестве ацилирующих агентов применяют активированные карбоновые кислоты, изоцианаты или изотиоцианаты. Таким образом были получены конъюгаты с флуоресцеин-изотиоцианатом **118**,^{233–235} родамин-5-изоцианатом **119**,²²² фотохимически активным производным — диазирином **120a**²³⁶ и спиновой меткой **120b**.²³⁷



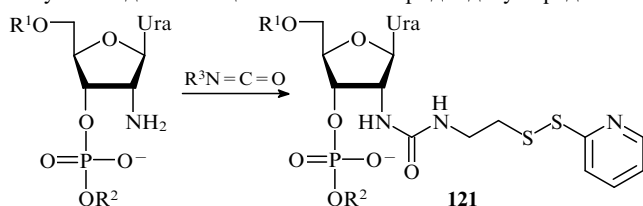
R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидной цепи;

118: R^3 = флуоресцеин, $X = S$, $B = \text{Ura}$;

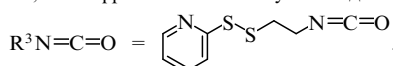
119: R^3 = родамин, $X = O$, $B = \text{Cyt}$.



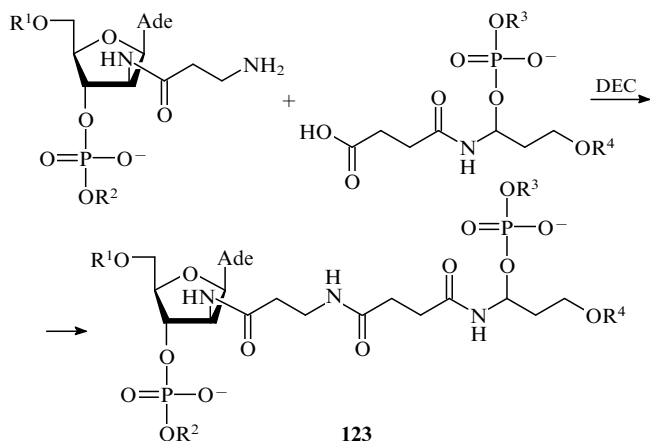
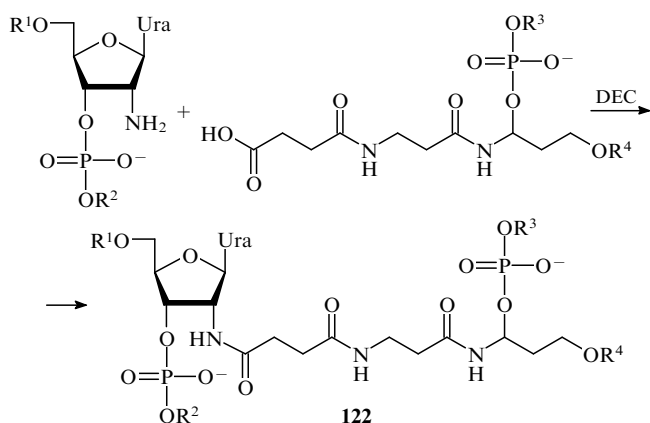
Сигурдссон и сотр.^{238–240} получили конъюгаты **121** взаимодействием 2'-амино-2'-дезоксиридинового фрагмента олигонуклеотида с 2-изоцианатоэтил-2-пиридилдисульфидом.



R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидной цепи;



Олигонуклеотиды, содержащие 2'-амино-2'-дезоксиридин^{241–244} или 2'-(β-аланиламида)-2'-дезоксирарабиноаденозин,^{245, 246} использованы Шабаровой и сотр. для получения ковалентно связанных дуплексов **122** и **123**. При этом в комплементарную цепь вводили ненуклеозидное звено с карбоксильной группой на конце протяженного линкера.

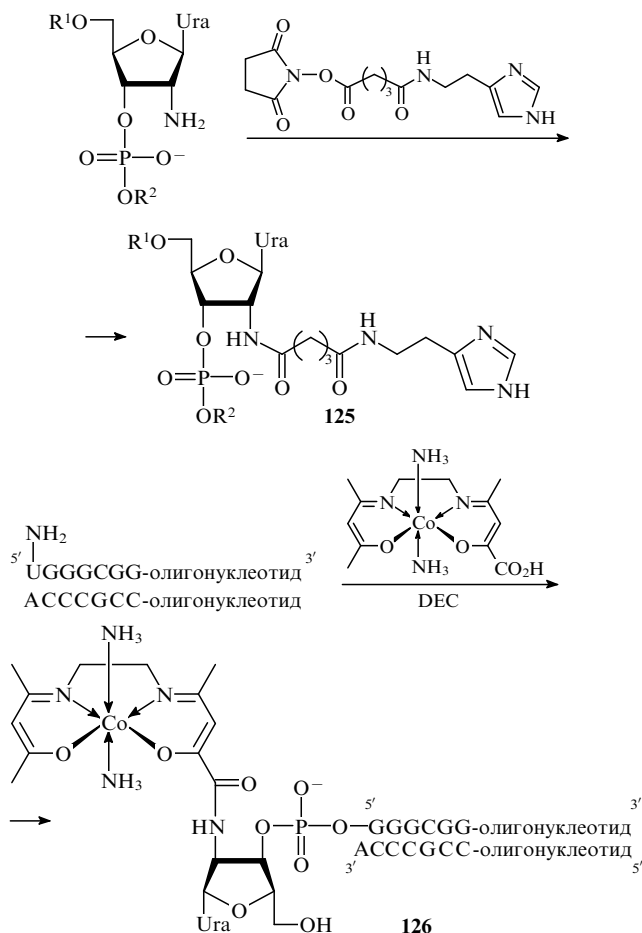


R^1, R^2, R^3, R^4 — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

Авторы работы²⁴⁷ синтезировали олигонуклеотиды **124**, в которых звенья цепи соединены помимо фосфодиэфирных также амидными связями через линкеры, присоединенные к $C(2')$ -атомам. Пространственная близость карбоксильных и аминогрупп обусловила высокую региоселективность реакции; выход целевого продукта **124** составил 78%, образования побочных продуктов не наблюдалось (схема 10).

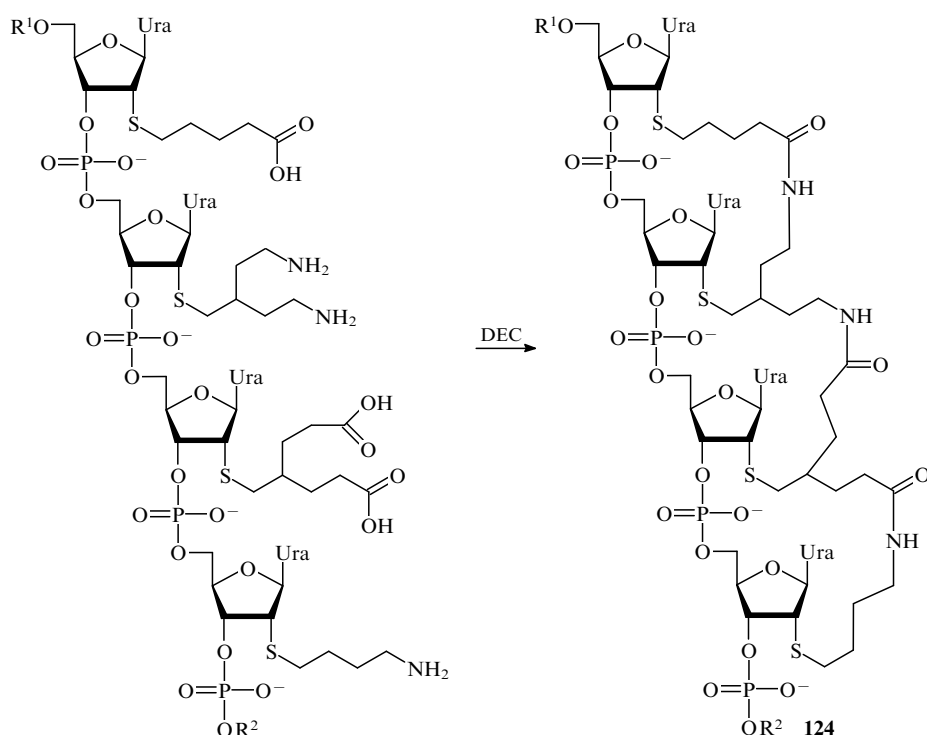
В качестве активированных ацилирующих агентов часто используют *N*-гидроксисукцинимидные эфиры замещенных карбоновых кислот. Сильверман и Кеч²⁴⁸ ацилировали олигонуклеотиды, содержащие 2'-амино-2'-дезоксиридин, *N*-гидроксисукцинимидными эфирами пиренилуксусной и пиренилмасляной кислот, Викс и сотр.^{249–251} использовали для этой цели эфир биотинилмасляной кислоты.

Синтезированы конъюгаты модифицированных олигонуклеотидов, содержащих 2'-амино-2'-дезоксиридин, с гистамином **125**²⁵² и комплексом кобальта **126**.²⁵³ В последнем случае ацилирование проводили в дуплексе для предотвращения взаимодействия карбоксильной группы в составе лиганда с аминогруппами гетероциклических оснований.

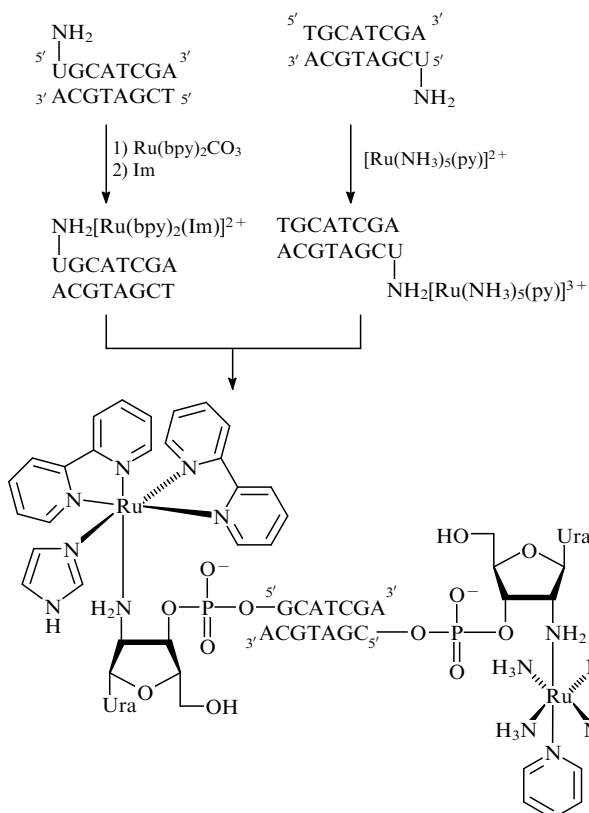


Работы Меаде и соавт.^{254, 255} посвящены получению рутениевых комплексов 2'-амино-2'-дезоксирiboолигонуклеотидов. Комплементарные олигонуклеотиды, содержащие 2'-амино-2'-дезоксиридин на 5'-концах, были модифицированы двумя комплексами рутения с разной степенью окисления. Реакцию комплексообразования проводили в ДНК-дуплексе для предотвращения взаимодействия рутениевых комплексов с экзоциклическими аминогруппами гетероциклических оснований. Полученный модифицированный ДНК-дуплекс был использован для изучения фотоиндуцированного переноса электрона вдоль цепи ДНК, который играет важную роль в повреждении и репарации ДНК.^{256, 257}

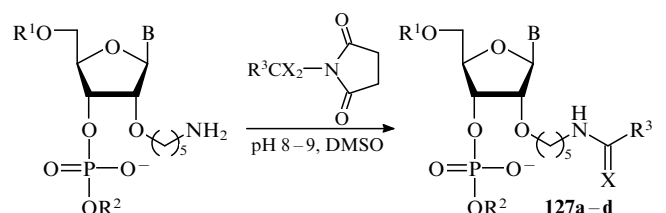
Схема 10



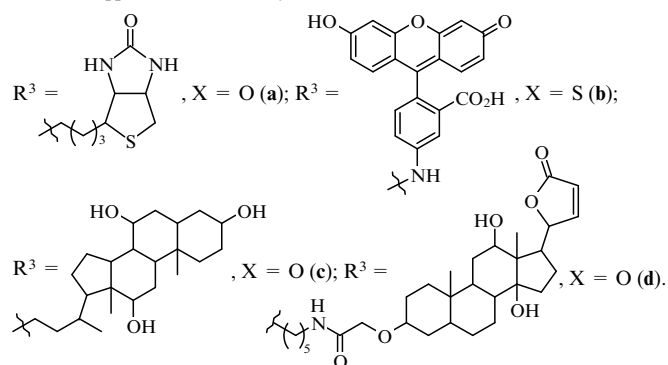
R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидной цепи.



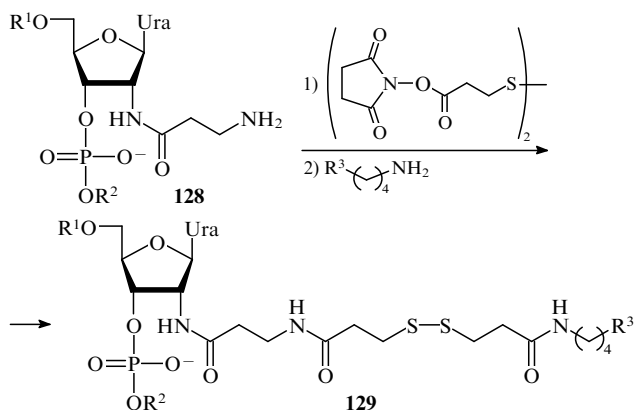
Ряд конъюгатов **127a–d** получен взаимодействием модифицированных олигонуклеотидов, содержащих 2'-*O*-(5-аминопентил)уридин⁶⁵ и -аденозин,⁵⁷ с *N*-гидроксисукцинимидными эфирами различных кислот.



R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидной цепи; B = Ade, Ura;

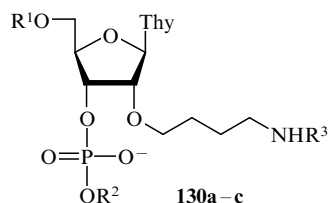


В работе²⁵⁸ было проведено ацилирование олигорибонуклеотида **128**, содержащего 2'- β -аланиламидо)-2'-дезоксиуридин, бифункциональным агентом — активированным *N*-гидроксисукцинимидным эфиром 3,3'-дитиобис(пропионовой) кислоты, что позволило в дальнейшем получить конъюгат **129** с пептидом, присоединенным к C(2')-атому через линкер дисульфидной природы. Дисульфидную связь можно расщеплять тиолами, что упрощает масс-спектрометрическое исследование конъюгатов с пептидами.

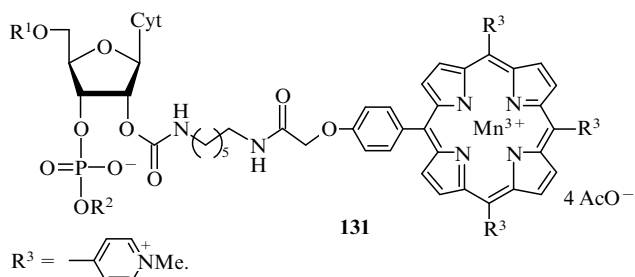
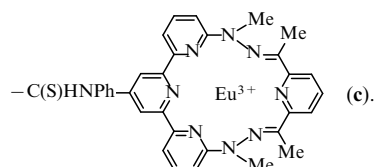
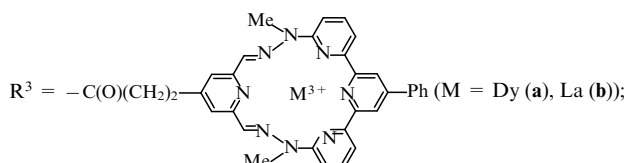


R^1, R^2 — фрагменты олигорибонуклеотидной цепи; R^3 — фрагмент Tat-белка.

Аналогично получены конъюгаты олигонуклеотидов, содержащих 2'-*O*-(4-аминобутил)риботимидин, с комплексами лантаноидов **130a**–**c**,²⁵⁹ а также конъюгаты олигонуклеотидов, включающих 2'-*O*-(6-аминогексилкарбамоил)-цитидин с марганцевым комплексом порфирина **131**.⁷⁵

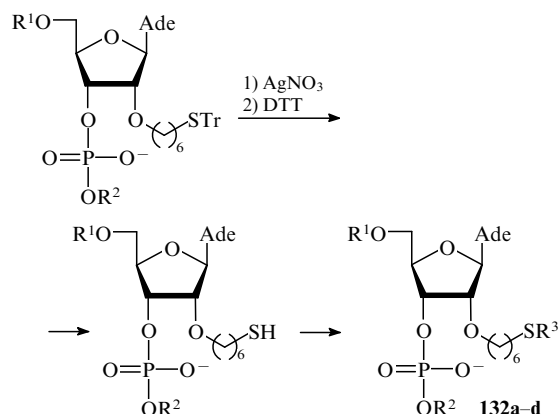


R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидной цепи;

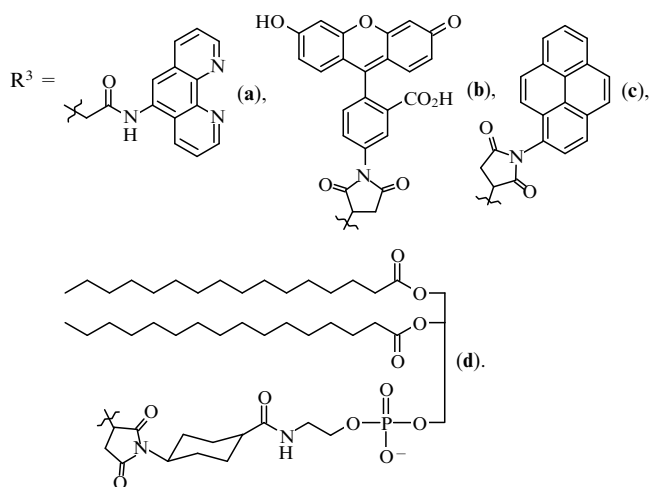


Широкие возможности для конъюгации предоставляет наличие в составе модифицированных олигонуклеотидов тиольной группы, которая может вступать в образование дисульфидных связей, нуклеофильное замещение, перэтерификацию тиоэфиров.²⁶⁰

2'-*O*-(6-Меркаптогексил)аденозин, включенный в состав олигомерной цепи, превращали в конъюгаты **132a–d** путем *S*-алкилирования иодацетамидофенантролином или присоединения малеимидных производных флуоресцеина, пирена и фосфолипидов.

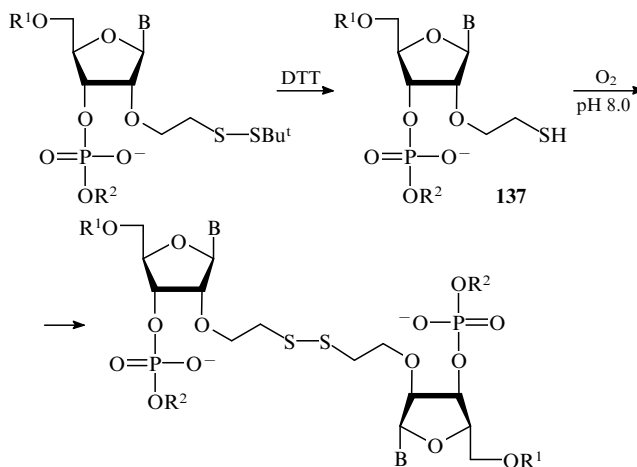


R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной цепи; DTT — дитиотреит;



Сигурдссон и соавт.^{238, 240} получили ковалентно связанные дуплексы **133** и конъюгаты с биманом (флуоресцентной меткой) **134**²³⁹ на основе олигонуклеотидов **135**, содержащих тиольную группу, а также конъюгаты с глутатионом **136** на основе олигомеров **121**, содержащих дисульфидную связь (схема 11).²³⁹

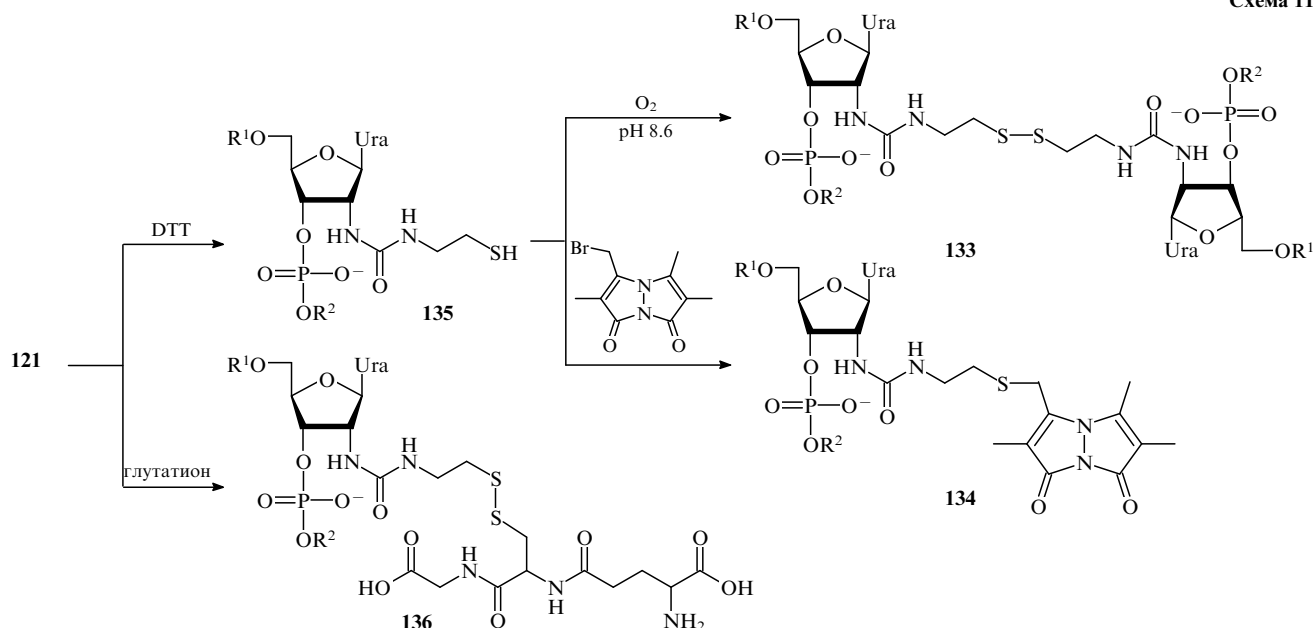
Авторы работ^{105, 106} осуществляли ковалентное «гомо-
шпивание» тиолов **137**, полученные дуплексы использовали
для изучения пространственной структуры тРНК^{Phe}.



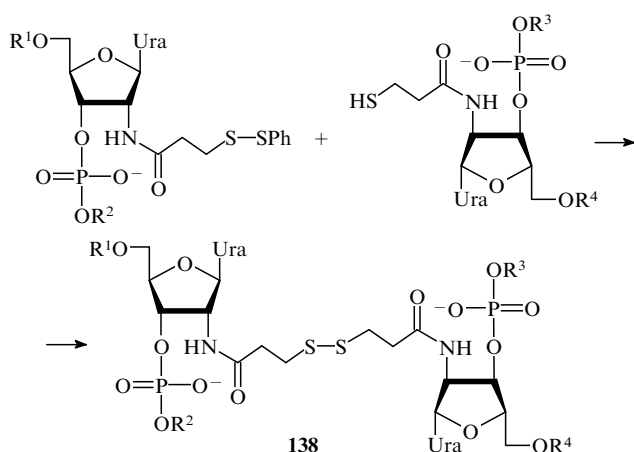
R¹, R² — фрагменты тРНК^{Phe}; В = Ura, Cyt.

В работе²⁶¹ образование конъюгатов **138** с дисульфидной связью происходило в результате реакции тиол-дисульфидного обмена.

Схема 11

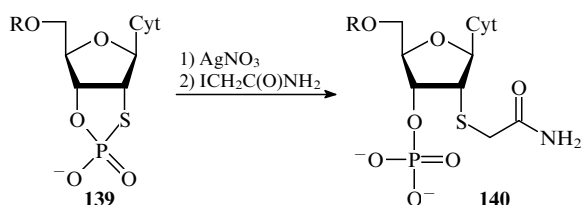


R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидной цепи.



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

Хамм и Пицирилли²⁶² синтезировали олигонуклеотиды **139**, содержащие 2'-S,3'-O-циклофосфат на 3'-конце. Свободную 2'-тиольную группу генерировали обработкой олигомеров **139** нитратом серебра, после чего проводили реакцию с иодацетамидом с образованием производных **140**. Подобным образом можно модифицировать 2'-тионуклеозиды, находящиеся в середине олигонуклеотидной цепи.

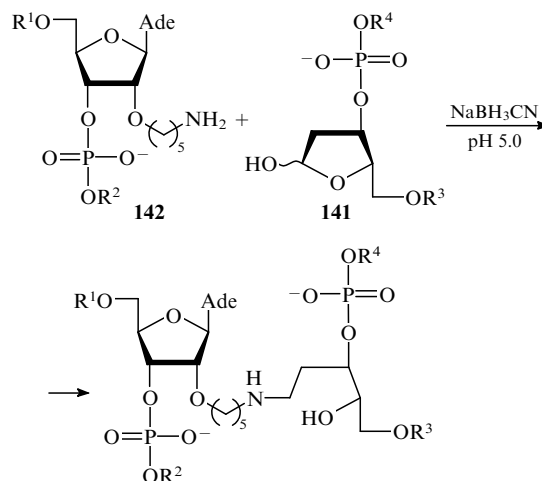


R — фрагмент олигонуклеотидной цепи.

В ходе этой реакции не наблюдалось образования побочных 1',2'-эписульфидов, которое протекает для 2'-тионуклеотидов в щелочной среде.^{263, 264} Вероятно, это обусловлено тем, что в реакции участвует не свободная тиогруппа, а тиолят серебра. Интересно отметить, что в щелочной среде

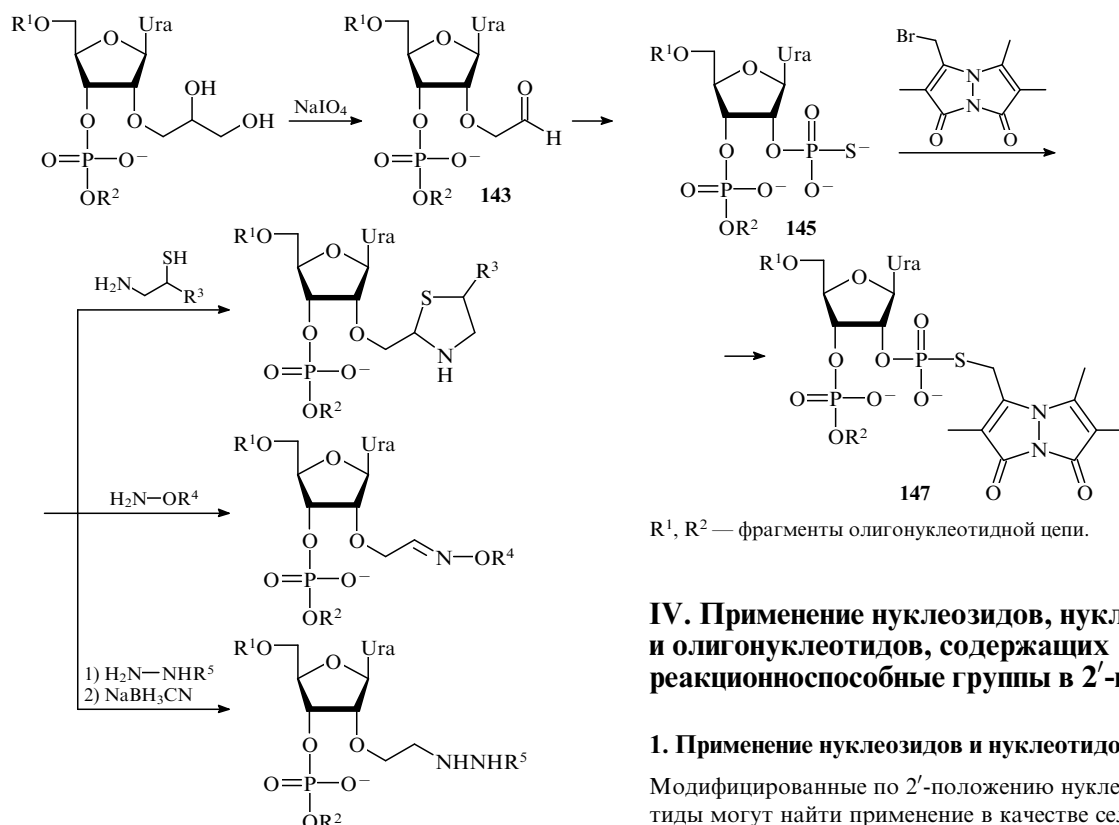
2'-тиеолигонуклеотиды более стабильны, чем немодифицированные олигорибонуклеотиды.

Кук и сотр.^{265–267} получили ковалентно связанный дуплекс путем восстановительного аминирования апуринового/апириимидинового сайта в составе олигонуклеотида **141** аминоалкильным заместителем при O(2')-атоме аденозина **142** в противоположной цепи.

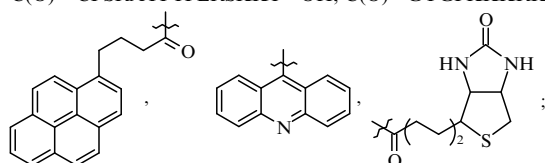


R^1, R^2, R^3, R^4 — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

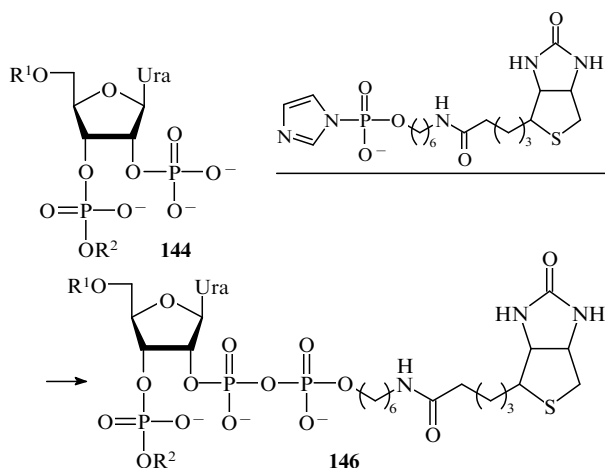
В работе²⁶⁸ описано присоединение ряда 1,2-аминотиолов, O-алкилгидроксиламинов и гидразидов к олигонуклеотидам **143**, содержащим остаток ацетальдегида при O(2')-атоме. Таким образом были получены конъюгаты с пептидами, пиреном, акридином и биотином. Синтезированные гидразоны оказались неустойчивы при нейтральных pH, что потребовало дополнительного восстановления их до гидразинов цианборгидридом натрия. Необходимо отметить, что это первая работа, в которой осуществлено одновременное присоединение нескольких пептидных остатков к молекуле олигонуклеотида за счет включения нескольких модифицированных звеньев в состав цепи.



R^1, R^2 — фрагменты олигонуклеотидной цепи; $R^3 = C(O)NHCH_2CO_2H$, $C(O)-CFSRAYPTPLRSKKT-OH$, $C(O)-GYGPKKKRKVGG-OH$.


$$\begin{aligned} \text{R}^4 &= \text{CH}_2\text{C}(\text{O})-\text{DPGYIGSR}-\text{OH}; \\ \text{R}^5 &= \text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_2\text{C}(\text{O})-\text{DPGYIGSR}-\text{OH}. \end{aligned}$$

Секине и сотр.¹⁴⁸ использовали олигонуклеотиды **144** и **145**, содержащие 2'-фосфатную и -тиофосфатную группы, для введения биотина и бимана. Таким образом получены конъюгаты **146** и **147** с пиррофосфатной и тиофосфатной связями соответственно. Позже было показано,²⁶⁹ что 2'-фосфатная и -тиофосфатная группы легко и селективно удаляются при нагревании. Изучение механизма этого процесса показало, что наличие соседней 3'-фосфатной группы способствует протеканию 2'-дефосфорилирования.



IV. Применение нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов, содержащих реакционноспособные группы в 2'-положении

1. Применение нуклеозидов и нуклеотидов

Модифицированные по 2'-положению нуклеозиды и нуклеотиды могут найти применение в качестве селективных ингибиторов ряда ферментов. При этом в состав нуклеозида вводят группу, которая может взаимодействовать с аминокислотными остатками в активном центре фермента и таким образом необратимо ингибировать последний. Такой подход может быть использован только в том случае, если строение активного центра фермента и механизмы его функционирования детально изучены.

Авторы работ^{270–272} предложили использовать 5'-дифосфаты пириимидиновых 2'-тио- и 2'-тиоцианатонуклеозидов для ингибирования рибонуклеозиддифосфатредуктазы. Данный фермент играет ключевую роль при биосинтезе 2'-дезоксирибонуклеозидов из рибонуклеозидов, катализируя восстановление рибозы в составе рибонуклеозиддифосфатов в 2-дезоксирибозу. Для протекания процесса требуется наличие двух атомов водорода, источником которых является восстановленный белковый кофактор тиоредоксин, содержащий две свободные SH-группы в составе остатков цистеина. При восстановлении рибозы происходит окисление остатков цистеина; при этом тиоредоксин переходит в дисульфидную форму. Было сделано предположение,^{271, 273} что 2'-тио- и 2'-тиоцианатные производные нуклеозиддифосфатов могут конкурентно взаимодействовать с остатками цистеина в активном центре фермента, таким образом ингибируя его. Кроме того, для ингибирования рибонуклеозиддифосфатредуктазы использовали 2'-метилен-2'-дезоксирибонуклеозиды.²⁷⁴

2'-Гидроксиамино-2'-дезоксирибонуклеозиды, способные генерировать свободные радикалы, показали высокую активность против фибросаркомы в опытах *in vitro* и *in vivo*.^{28–30} Интересно отметить, что 3'-изомеры этих нуклеозидов ингибируют синтез РНК, что также подавляет рост опухолей у мышей.

Производные 2'-ациламино-2'-дезоксиаденозина, содержащие остатки ароматических кислот,^{195, 275–277} показали высокую ингибирующую активность в отношении глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из *Trypanosomatidae brucei*, вызывающей сонную болезнь.²⁷⁸ Эффективное ингибирование происходило уже при микромолярных концентрациях нуклеозидов. При помощи PCA было показано,²⁷⁹ что связывание *N*⁶,2'-модифицированного аденозина с глицераль-

дегид-3-фосфатдегидрогеназой приводит к значительному изменению структуры фермента.

2. Применение 2'-модифицированных олигонуклеотидов и конъюгатов на их основе

а. Антисмысловая и антигенная биотехнология

В последние 15–20 лет основным направлением использования модифицированных олигонуклеотидов является блокирование экспрессии генов за счет конъюгации с клеточными ДНК и РНК. Для этого применяют ряд подходов: антисмысловой, антигенный и РНК-интерференцию.

Идея антисмыслового механизма действия олигонуклеотидов подразумевает их внутриклеточное комплексобразование с мРНК с образованием гибридных дуплексов, которые препятствуют трансляции за счет блокирования связывания мРНК с рибосомой.^{280, 281} Ингибируют обратную транскрипцию²⁸² или процессинг мРНК.^{283, 284} Кроме того, в ряде случаев такие гибридные дуплексы могут являться субстратами РНКазы H,²⁸¹ которая катализирует гидролиз рибонуклеинового компонента, подвергаться удалению «кэпа» с 5'-конца молекулы РНК,²⁸⁵ сиквенс-специфическому расщеплению РНК^{3, 286–289} или ковалентному присоединению олигонуклеотида к РНК.²⁹⁰ Последние достижения антисмысловой биотехнологии описаны в обзоре²⁹¹.

Антигенный механизм, напротив, предполагает связывание модифицированного олигонуклеотида непосредственно с геномной ДНК с образованием на комплементарной последовательности триплекса^{2, 292} или путем расплетания двойной спирали с образованием гетерогенного дуплекса и D-петли.²⁹³ Это приводит к ингибированию транскрипции соответствующих генов, повышает лабильность участка ДНК к действию нуклеаз²⁹⁴ и химических реагентов.^{295–298} Основой как антисмыслового, так и антигенного механизма является прежде всего повышенное сродство модифицированных олигонуклеотидов по сравнению с природными к комплементарной последовательности.

В 1998 г. было открыто явление РНК-интерференции,²⁹⁹ которое заключается в том, что двухспиральная РНК, комплементарная участку мРНК, вызывает деградацию последней и, как следствие, ингибирование генной экспрессии. Первоначально для этой цели использовали протяженные РНК-дуплексы (300–1000 пар оснований), но позже было показано,^{300, 301} что РНК-интерференция индуцируется более короткими 21–23-звенными дуплексами. Сильный внутриклеточный эффект возникает при введении в клетку всего нескольких копий РНК-дуплексов, что может быть связано с функционированием их в каталитическом режиме. Преимуществом коротких РНК-дуплексов является отсутствие неспецифической иммунной реакции клеток млекопитающих, включающей синтез интерферона и приводящей к гибели клеток, что наблюдается в случае использования протяженных РНК-дуплексов. Это позволяет рассматривать короткие РНК-дуплексы в качестве эффективных средств, селективно блокирующих экспрессию отдельных генов, которые могут найти применение при разработке потенциальных терапевтических препаратов.

К сожалению, даже незначительная модификация РНК, например, замена гуанозина на инозин,³⁰² введение 2'-О-метилованных нуклеотидов,³⁰³ наличие одной некомплементарной пары оснований,³⁰⁴ приводит к полному исчезновению РНК-интерференции. При введении 2'-амино-2'-дезоксигуанидина или 2'-фтор-2'-дезоксигуанидина в смысловую цепь РНК-дуплекса происходит незначительное ингибирование РНК-интерференции, в то время как модификация антисмысловой цепи является критической.³⁰² Тем не менее было показано, что возможна модификация двух 3'-концевых нуклеотидов.³⁰³ При изучении РНК-интерференции в клетках млекопитающих было показано,³⁰⁵ что введение 2'-фтор-2'-

дезоксигуанидина и конформационно-блокированных 2'-О-4'-С-метилендидеоксигуанидинов в состав РНК-дуплекса не влияет на эффективность РНК-интерференции. Наряду с этим изучают активность односпиральных 22-звенных РНК, так называемых микроРНК,^{306, 307} которые действуют по механизму, аналогичному РНК-интерференции.^{5, 6, 308, 309}

Недавно был предложен метод, получивший название SELEX,^{4, 310, 311} который позволяет выбирать молекулы НК с заданными свойствами из комбинаторных библиотек, содержащих до 10²⁵ индивидуальных молекул.^{312, 313} Выбор целевых молекул НК основан на их способности образовывать устойчивые комплексы с различными белками и их низкомолекулярными аналогами. Как правило, этим свойством обладают молекулы РНК, содержащие 40–100 нуклеотидных звеньев, которые называют аптамерами. Введение модифицированных нуклеотидов в состав аптамеров³¹⁴ позволяет увеличить их конформационную подвижность и стабильность к действию нуклеаз. Для установления структуры модифицированных аптамеров можно использовать метод масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (ESI-MS).^{315, 316} Метод SELEX может быть использован также при анализе библиотеки рибозимов.³¹⁷

Для применения олигонуклеотидов в качестве терапевтических препаратов необходимо выполнение ряда условий, в том числе высокая стабильность олигонуклеотидов к действию нуклеаз, эффективная доставка в клетку, продуктивное и селективное связывание с мишенью и отсутствие побочного действия. Кроме того, немаловажным фактором является стоимость и доступность модифицированных олигонуклеотидов. Таким образом, создание эффективных антисмысловых и антигенных агентов требует одновременного решения ряда задач.

В работах^{318, 319} было показано, что олигонуклеотиды в клетке гидролизуются в основном под действием экзогенных нуклеаз. Благодаря использованию 2'-О-метилованных нуклеотидов, конформационно-блокированных нуклеиновых кислот^{320, 321} и введению различных 3'-концевых модификаций, значительно увеличивающих стабильность НК к действию нуклеаз, на сегодняшний день проблему устойчивости олигонуклеотидов можно считать практически решенной.

Значительно более сложным оказался вопрос доставки олигонуклеотида в клетку. Решение этой проблемы осложнено отсутствием четкого понимания механизма проникновения олигонуклеотидов через клеточную мембрану, которое может осуществляться за счет неспецифической адсорбции на поверхности клеточной мембраны с последующей диффузией и путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Значительный интерес в этой связи представляют ковалентные^{260, 322} и нековалентные³²³ конъюгаты олигонуклеотидов с пептидами. Не меньшее внимание уделяется использованию липосом в качестве носителей для доставки олигонуклеотидов, например анионных и нейтральных,^{324, 325} катионных,³²⁶ pH-чувствительных,³²⁷ фьюзогенных (проникающих через клеточную мембрану),³²⁸ фолат-направленных³²⁹ и иммунолипосом.³³⁰ Кроме того, представляют интерес гликоконъюгаты олигонуклеотидов, для которых реализуется рецептор-опосредованный эндоцитоз с участием гликопротеиновых рецепторов.³³¹ Внутриклеточное распределение таких конъюгатов между цитозолем и ядром определяется их взаимодействием с внутриклеточными лектинами. В качестве носителей для олигонуклеотидов также используют гидрофобные наночастицы³³² и полиамидаминные дендримеры.³³³ Обсуждено проникновение олигонуклеотидов с тиофосфатной связью³³⁴ и гидрофобных конъюгатов олигонуклеотидов⁶⁴ через клеточную мембрану.

При создании антисмысловых аналогов нуклеиновых кислот возможна модификация как углеводфосфатного остова, так и гетероциклических оснований. Среди 2'-модифицированных олигонуклеотидов в антисмысловой биотех-

нологии наиболее широко используют 2'-О-алкилолигонуклеотиды, содержащие реакционноспособные группы, и их конъюгаты с другими соединениями. Так, в работе²⁶⁸ показано, что присоединение 10–15-звенных пептидов через линкер к О(2')-атому углеводного фрагмента практически не влияет на связывание антисмысловой конструкции с TAR РНК. Кроме того, существует ряд задач, решение которых требует введения в 2'-положение углеводного фрагмента НК более сложных группировок. Одним из примеров является синтез 2'-О-{2-[2-(N,N-диметиламино)этокси]этил}олигонуклеотидов.⁶⁹ Введение такой модификации в состав олигомеров обеспечивает увеличение термической стабильности дуплекса с РНК за счет *goш*-эффекта⁷¹ и повышение устойчивости к действию нуклеаз за счет наличия положительного заряда.³³⁵

3'-Амидофосфитные производные 2'-О-метилнуклеозидов являются коммерчески доступными, что обуславливает широкое применение в антисмысловой биотехнологии 2'-О-метилированных олигонуклеотидов с межнуклеотидной тиофосфатной и фосфодиэфирной связью. Была показана высокая активность таких олигомеров *in vitro*³³⁶ и *in vivo* на различных линиях клеток^{337–341} и мышах.³⁴² Часто используют подход,³⁴³ который заключается в синтезе химерного олигонуклеотида, состоящего из 2'-О-алкилрибонуклеозидов и содержащего в середине цепи 2'-дезоксирибонуклеозиды, связанные межнуклеотидными тиофосфатными группами. Дуплексы, образованные такими олигонуклеотидами с РНК, являются субстратами РНКазы Н. Необходимо отметить, что одновременное присутствие тиофосфатных групп и 2'-О-метилнуклеотидных звеньев приводит к аддитивному ингибированию экспрессии генов.³⁴⁰ Аналогичный подход предполагает активацию РНКазы Р.³⁴¹ Этот фермент расщепляет 3'-концевую часть РНК, находящуюся в составе дуплекса,³⁴⁴ причем более селективно, чем традиционная РНКазы Н.³⁴⁵

Наиболее перспективными среди 2'-модифицированных олигонуклеотидов считаются 2'-О-метоксиэтилированные РНК.³⁴⁶ Было показано,³⁴⁷ что такие олигомеры лучше проникают через клеточную мембрану, устойчивы в плазме крови³⁴⁸ и специфично ингибируют экспрессию генов.³⁴⁹

2'-О-Метоксиэтилированные РНК также являются эффективными ингибиторами теломеразы.³⁵⁰ Кроме того, ингибирование 3'-полиаденилирования пре-мРНК при помощи таких олигонуклеотидов приводит к увеличению стабильности мРНК и, соответственно, к гиперэкспрессии белка.³⁵¹

2'-О-Алкилированные олигонуклеотиды также нашли широкое применение в антигенной биотехнологии. Было показано, что 2'-О-метилолигонуклеотиды образуют кинетически и термодинамически более устойчивые триплексы по сравнению с природными олигонуклеотидами,³⁵² что обусловлено преорганизацией структуры олигонуклеотида (выгодная С(3')-эндо-, С(2')-экзо-конформация углеводного фрагмента) и ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями между 2'-О-метильными группами и пуриновыми основаниями.³⁵³ 2'-О,4'-С-Метилиденолигонуклеотиды (конформационно-блокированные) показали еще большее увеличение стабильности триплексов в условиях, близких к физиологическим.³⁵⁴ Наилучшие результаты были достигнуты при использовании 2'-О-(2-аминоэтил)олигонуклеотидов.^{355–357} Как было показано методом спектроскопии ЯМР, увеличение стабильности триплекса в этом случае обусловлено электростатическими взаимодействиями заряженных аминогрупп пиримидинового олигонуклеотида с фосфатными группами противоположной пуриновой цепи ДНК.^{70, 358} Большой вклад в увеличение стабильности триплексов вносит так называемый *goш*-эффект,³⁵⁹ который определяет торсионные углы в системе Х–С–С–У (Х и У — электроотрицательные заместители). Наличие *goш*⁺-эффекта для 2'-О-аминоэтильной группы определяет конформацию, опти-

мальную для взаимодействия с фосфатной группой противоположной цепи, что увеличивает преорганизацию олигонуклеотида. Наличие заряженной аминогруппы также обуславливает стабильность триплексов при низких концентрациях Mg^{2+} , близких к физиологическим,³⁵⁷ что нехарактерно для триплексообразующих олигонуклеотидов.³⁶⁰ Следует отметить, что при введении большого количества модифицированных звеньев³⁵⁶ ингибирование генной экспрессии *in vivo* ослабляется. Авторы работы³⁵⁷ предполагают, что это обусловлено увеличением гидрофобности олигонуклеотида в связи с частичной нейтрализацией отрицательного заряда фосфатных групп и, следовательно, адсорбцией его на клеточных мембранах, гидрофобных белках и др. Уменьшение внутриклеточной концентрации модифицированного олигонуклеотида также приводит к снижению эффективности его антигенного действия. Недавно авторы работы³⁶¹ показали перспективность использования таких модифицированных олигонуклеотидов для сайт-специфического мутагенеза *in vivo*. При включении в состав олигонуклеотидов 2'-О-аминоэтил-5-пропаргиламинопиримидиновых нуклеозидов³⁶² наблюдался аддитивный эффект участия во взаимодействии двух аминогрупп, что приводило к дополнительной стабилизации триплексов с ДНК.

6. Изучение ДНК-белковых взаимодействий

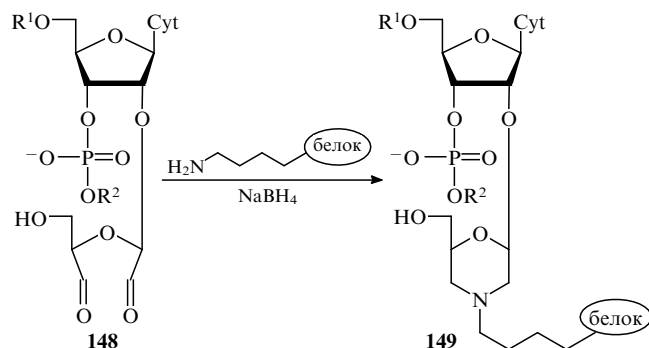
Вторым направлением применения модифицированных олигонуклеотидов является изучение с их помощью белково-нуклеиновых взаимодействий. В частности, для этой цели широко используют ковалентное присоединение нуклеиновых кислот к белкам.^{142, 143, 363} Наиболее достоверные данные о структуре НК-белковых конъюгатов могут быть получены при использовании метода РСА,³⁶⁴ однако не всегда удается выделить достаточное количество и/или закристаллизовать специфические комплексы белков с ДНК. Более того, не исключено искажение результатов в связи с различиями в конформациях макромолекул в растворе и в кристалле. Альтернативным вариантом является изучение структуры НК-белковых комплексов в растворе методом ЯМР.³⁶⁵ Однако данные, получаемые с помощью спектроскопии ЯМР, часто трудно интерпретировать. Мощными методами изучения ДНК-белковых взаимодействий являются сайт-специфический мутагенез^{366, 367} и химическая модификация белка, но для их применения необходимо определить участок в молекуле белка, ответственный за связывание с НК. Использование футпринтинга (метода «отпечатков») позволяет выявить последовательности в ДНК, узнаваемые ДНК-связывающими белками,³⁶⁸ но не дает возможности идентифицировать специфические участки белка, взаимодействующие с НК. Ковалентное присоединение белков к модифицированным нуклеиновым кислотам, содержащим реакционноспособные группы, не только позволяет выявить участок белка, взаимодействующий с НК, но в ряде случаев и определить конкретную аминокислоту, ответственную за связывание.^{363, 369} При этом вносятся минимальные изменения в структуру НК.

Также возможно изменение физико-химических свойств какого-либо фрагмента олигонуклеотида при минимальном нарушении геометрии молекулы и определение влияния модификации кинетическими методами.³⁷⁰

В работе²⁵⁸ проведено изучение взаимодействия фрагмента Tat-белка с модифицированной по С(2')-атому РНК. Показано, что образование конъюгата **129** (см. выше) осуществляется в результате взаимодействия между активированным эфиром на конце линкера при С(2')-атоме Urd(23) и ε-аминогруппой Lys(51).

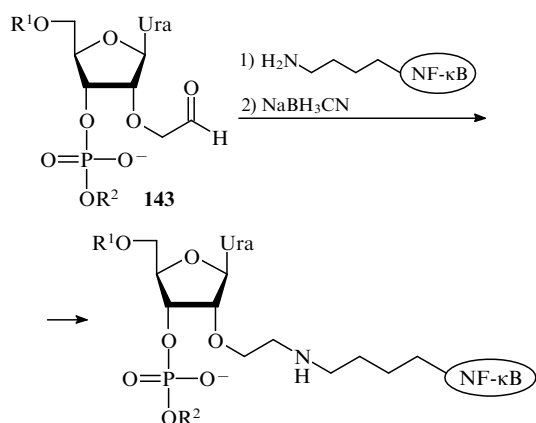
Олигонуклеотиды **148**, содержащие диальдегидную группировку в 2'-положении, были использованы для изучения белково-нуклеиновых взаимодействий с рестриктазой EcoRII, метилазой EcoRII,³⁷¹ метилазой MvaI (см.^{372–374}) и

РНК-полимеразой T7.^{373, 375} Применение модифицированного олигонуклеотида позволяет добиться ингибирования активности ферментов при сохранении способности последних связывать НК-субстрат. Взаимодействие олигонуклеотидов **148** с ферментами протекает селективно с участием ϵ -аминогрупп лизина. Выходы конъюгатов **149** составляют 3–5%.



R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

Описано ковалентное присоединение модифицированных олигонуклеотидов **143**, содержащих 2'-O-(2-оксоэтил)уридин, к фактору транскрипции NF- κ B.³⁷⁶ Данная модификация представляется более предпочтительной по сравнению с диальдегидной группировкой, так как вследствие своего небольшого размера эффективно реагирует с ϵ -аминогруппами лизина, максимально приближенными с ДНК.

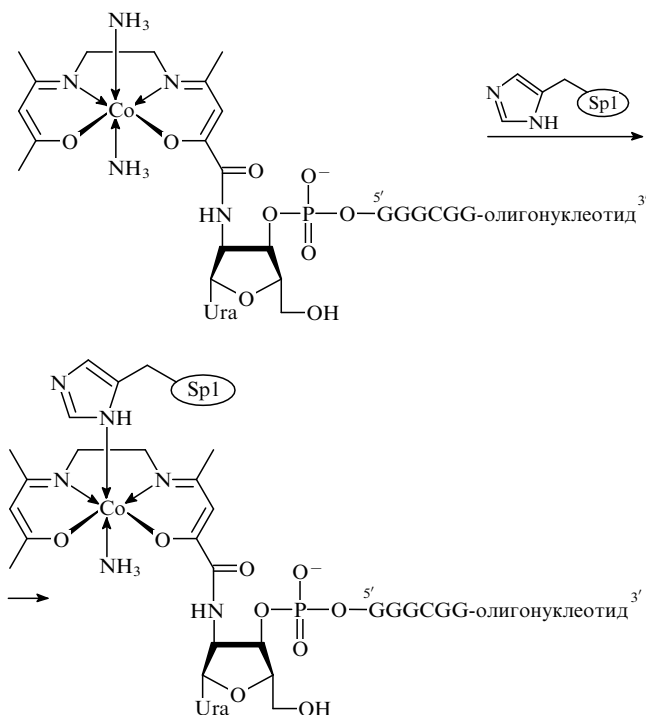


R¹, R² — фрагменты олигонуклеотидной цепи.

Ковалентно связанные дуплексы **122** и **123**^{241–244} чрезвычайно устойчивы к действию нуклеаз. Было изучено³⁷⁷ их взаимодействие с фактором транскрипции NF- κ B и показано, что в ряде случаев эффективность связывания модифицированных дуплексов с белком увеличивается по сравнению с природными дуплексами. Более подробно синтез и применение ковалентно связанных нуклеиновых кислот представлены в обзоре³⁷⁸.

Олигонуклеотиды **89**, содержащие внутрицепочечную сшивку соседних нуклеотидных звеньев,^{174, 175} имеют изгиб цепи в месте модификации и структурно соответствуют U-повороту тРНК. Такие олигонуклеотиды также могут быть использованы для изучения РНК-белковых взаимодействий.

Авторы работы²⁵³ предложили селективно ингибировать фактор транскрипции Sp1 за счет необратимого связывания боковых групп гистидина в молекуле белка с атомом кобальта в составе металлокомплекса, ковалентно присоединенного к олигонуклеотиду.



Рибонуклеиновые кислоты, содержащие 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеотидные звенья, неоднократно использовали в качестве аптамеров, обладающих большей константой связывания с различными белками и рецепторами по сравнению с природными нуклеиновыми кислотами. В качестве объектов были выбраны протеолитический фермент эластаза из нейтрофилов человека,³⁷⁹ фактор роста сосудистого эндотелия,³⁸⁰ фактор роста фибробластов,³⁸¹ белок Rev HIV-1,³⁸² γ -интерферон человека,³⁸³ N-метилмезопорфирин (низкомолекулярный аналог гем-содержащих белков),^{384, 385} инсулиновый³⁸⁶ и ацетилхолиновый рецепторы.³⁸⁷ При введении 2'-аминогруппы в состав РНК сохраняется способность к образованию водородных связей. Кроме того, ван-дер-ваальсовы радиусы аминогруппы и гидроксильной группы близки, поэтому наличие такой модификации не сказывается на конформации молекул РНК.

Олигонуклеотиды с 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеотидными звеньями были использованы также для изучения роли 2'-гидроксильных групп в НК-белковых взаимодействиях. Исследованы взаимодействия ДНК с рибонуклеазой H1 из *E.coli*,³⁸⁸ РНК с белком оболочки бактериофага MS2^{389, 390} и урацил-ДНК-гликозилазой.^{391, 392} Авторы работы³⁹³ синтезировали мРНК с использованием 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатов и показали, что такие мРНК не транслируются *in vitro* и *in vivo*.

В. Изучение структуры нуклеиновых кислот

В работах^{394–396} были изучены флуоресцентные свойства олигонуклеотидов, содержащих остаток метилпирена при O(2')-атоме.¹⁶² Было показано, что в дуплексе с ДНК происходит интеркаляция пиренового остатка между гетероциклическими основаниями, о чем свидетельствует сдвиг максимума флуоресценции. Для дуплексов с РНК, напротив, наблюдается сильное возрастание эмиссии, что говорит о расположении пиренового остатка вне дуплекса. Эти выводы были подтверждены данными по изучению термической стабильности дуплексов и спектрами КД. Кроме того, флуоресцентные характеристики пиреносодержащих олигонуклеотидов оказались очень чувствительными к наличию некомплементарных пар.³⁹⁶ Такие олигонуклеотиды могут быть использованы для структурного анализа РНК.^{397–399}

В работе¹⁷⁰ пирен был соединен с C(2')-атомом уридина при помощи протяженного линкера. Авторы изучали эмиссионные характеристики модифицированных таким образом олигонуклеотидов в зависимости от природы 3'-фланкирующего нуклеотида и наличия комплементарной цепи, что позволило оценить энергию переноса электрона и конформационную подвижность гетероциклических оснований в различных одно- и двухцепочечных структурах.

Сильверман и соавт.^{187, 248, 400} использовали ряд модифицированных олигонуклеотидов с различной длиной линкера между остатком пирена и C(2')-атомом для изучения сворачивания Р4–Р6 домена интронного фрагмента РНК простейшего *Tetrahymena*. При сворачивании происходило возгорание флуоресценции, что свидетельствует об изменении окружения модифицированного нуклеотида. Авторам удалось показать различные пути сворачивания РНК в зависимости от ионной силы и рН раствора.

Недавно предложено⁷⁸ применение олигонуклеотидов, содержащих 2'-*O*-(пиренилметилкарбамоил)уридин. Пространственное сближение модифицированных нуклеозидов, расположенных в комплементарных цепях, приводит к образованию пиренового эксимера в большой бороздке ДНК-дуплекса. Использование линкера с низкой конформационной подвижностью позволило получить производные, обладающие сильной флуоресценцией.

Накано и сотр.^{183–186, 235} опубликовали серию работ, посвященных синтезу олигонуклеотидов с различными флуоресцентными метками при C(2')-атоме. При гибридизации олигонуклеотидов, содержащих 4-(*N,N*-диметиламино)фенилсульфамидную группу, с комплементарной цепью ДНК происходило сильное возгорание флуоресценции.^{184, 185} В работах^{186, 235} изучены флуоресцентные свойства олигонуклеотидных дуплексов, содержащих в противоположных цепях пары флуорофоров дансил–флуоресцеин и кумарин–флуоресцеин. К сожалению, в первом случае квантовый выход переноса энергии был слишком низким, что исключает использование таких олигонуклеотидов для резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). Для пары кумарин–флуоресцеин квантовый выход достигал 25%, при этом гашение флуоресценции донора энергии происходило только в том случае, если акцептор был присоединен к комплементарному олигонуклеотиду.

Электрохимическое детектирование структуры ДНК является перспективным методом определения мононуклеотидного полиморфизма.^{401–403} Опубликован ряд патентов^{404, 405} и статей,^{159, 406, 407} посвященных применению модифицированных олигонуклеотидов с 2'-*O*-ферроценалкилнуклеозидными звеньями для электрохимического детектирования однобуквенных замен в фрагментах ДНК. Созданные для этой цели ДНК-чипы и прибор на их основе являются коммерчески доступными (eSensor™, eSensor™ 4800 Reader, Motorola Clinical Micro Sensors, USA). Более подробно синтез и свойства ферроценсодержащих олигонуклеотидов рассмотрены в обзоре⁴⁰³.

Введение остатка антрахинона по C(2')-атому¹⁶⁴ приводит к увеличению термической стабильности дуплексов, образованных модифицированными олигонуклеотидами с ДНК и РНК.⁴⁰⁸ В работе⁴⁰⁹ методом спектроскопии ЯМР ¹H было показано, что антрахинон, присоединенный к C(2')-атому, интеркалирует между парами гетероциклических оснований. Это свойство было использовано при изучении механизма переноса электрона вдоль цепи ДНК.¹⁶⁵ В дальнейшем олигонуклеотиды, содержащие 2'-*O*-антрахинониметилуридин, нашли применение при попытке создания нового типа ДНК-сенсора.^{410, 411} Было показано, что эффективность переноса электрона резко возрастает при образовании дуплекса между антрахинонсодержащим олигонуклеотидом, иммобилизованным на электроде, и НК-мишенью.

Авторы работ^{171, 412} использовали олигонуклеотиды с остатком антрахинона, присоединенным через 2'-*O*-аминогексильный линкер, для электрохимического детектирования комплементарных молекул НК на поверхности электрода методом циклической вольтамперометрии. При использовании ртутного капельного электрода¹⁷¹ не удалось получить устойчивой зависимости вольтамперометрических характеристик от концентрации анализируемой НК, что может быть связано с неспецифической адсорбцией олигонуклеотида на поверхности ртути. В дальнейшем⁴¹² олигонуклеотид, содержащий 5'-концевую тиольную группу, иммобилизовывали на поверхности золотого электрода. Для уменьшения неспецифической сорбции поверхность электрода обрабатывали меркаптоэтанолом, затем добавляли комплементарный олигонуклеотид, содержащий остаток антрахинона, и проводили детектирование. Интересно отметить, что на основании данных УФ-спектроскопии авторы работы⁴¹² предполагают отсутствие интеркаляции остатка антрахинона между парами гетероциклических оснований.

Олигонуклеотиды, содержащие при C(2')-атоме комплекс рутения,²⁰⁶ предлагалось использовать в качестве моделей для изучения электронного переноса вдоль цепи ДНК. Однако оказалось, что окисление остатков гуанозина в составе дуплекса протекает с очень низким выходом.

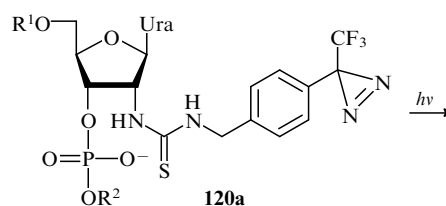
Недавно опубликованы обзоры, посвященные применению тиолсодержащих олигорибонуклеотидов для изучения структуры и функций рибозимов⁴¹³ и трехмерной структуры РНК.^{414, 415}

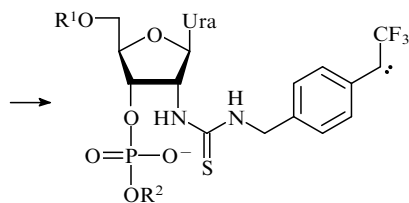
Авторы работы²³⁸, используя рибозим с ковалентно связанными доменами, однозначно выбрали одну из двух третичных структур рибозима, предложенных ранее на основании данных РСА. Далее этот подход применяли для доказательства сближенности двух доменов шпильчатого рибозима.⁴¹⁶

В работе²⁶¹ изучение процесса образования дисульфидных «сшивок» между модифицированными олигонуклеотидными цепями позволило оценить скорость теплового движения структурных элементов рибозима *NheI*. В дальнейшем использование аналогичной модификации позволило авторам работ^{417, 418} добиться изменения нуклеазной активности рибозима *HNx10* на лигирующую. Значительное возрастание скорости лигирования без изменения скорости гидролиза было объяснено резким уменьшением теплового движения доменов рибозима⁴¹⁷ и изменением структуры каталитического центра фермента⁴¹⁸ и, как следствие, расположения 2'-гидроксильной и 3'-фосфатной групп субстрата.

Авторы работ^{105, 106} использовали образование ковалентных дисульфидных связей между тиолсодержащими олигонуклеотидами для изучения пространственной структуры тРНК^{Phe}. Было показано, что влияние ковалентных «сшивок» на трехмерную структуру тРНК минимально. Далее в работе⁴¹⁹ проведено исследование кинетики и термодинамики фолдинга тРНК^{Phe}, происходящего при разрушении дисульфидных «сшивок» в результате реакции тиол-дисульфидного обмена.

Модифицированную 5S рРНК **120a**, содержащую фотохимически активную арил(трифторметил)дизазириновую группу,²³⁶ использовали для изучения пространственного окружения 5S рРНК в составе рибосомы.





R^1 , R^2 — фрагменты олигорибонуклеотидной цепи.

Под действием УФ-облучения диазириин превращается в высокореакционноспособный карбен, который атакует даже алифатические C—H-связи.⁴²⁰ Анализ продуктов реакции позволил установить ряд контактов 5S рРНК с 23S рРНК.

Бучнюллер и соавт.^{421, 422} использовали олигорибонуклеотиды, содержащие 2'-(4-азидо-2-гидроксibenзамидо)-2'-дезоксигуанидин, для определения нескольких неравновесных структур, которые образуются в процессе сворачивания РНК.

Интересное применение олигонуклеотидов, содержащих пиримидиновые 2'-амино-2'-дезоксигуанидинуклеозиды, предложили Викс и соавт.^{249–251} Они показали, что скорость ацилирования 2'-аминогруппы зависит от конформационной подвижности модифицированного нуклеотидного звена, будучи максимальной для одноцепочечной НК и минимальной для идеального дуплекса. Ацилирование проводили *N*-гидроксисукцинимидным эфиром биотинилмасляной кислоты. Были установлены кинетические и термодинамические параметры реакции ацилирования для всех возможных нуклеотидных пар в ДНК–ДНК и ДНК–РНК дуплексах.^{250, 251} Эти данные были использованы для изучения локальной структуры тРНК^{Asp} (см.²⁴⁹) и детектирования моонуклеотидного полиморфизма.²⁵¹ В частности, было показано, что скорость ацилирования 2'-амино-2'-дезоксигуанидинуклеозиды, встроенного в антикодоновую петлю тРНК^{Asp} (см.²⁴⁹), превосходит скорость ацилирования нуклеозидов, участвующих в комплементационных взаимодействиях или образующих различные элементы третичной структуры.

Авторы работы⁴²³ продемонстрировали, что скорость ацилирования 2'-аминогруппы определяется не только локальной конформационной подвижностью олигонуклеотида, но и химической природой группы, находящейся в соседнем 3'-положении. Скорость реакции резко уменьшается при наличии в 3'-положении фосфотриэфирной группы, 3',5'-циклофосфатной группы и при замене остатка рибозы на треофуранозу. Это свидетельствует об участии 3'-фосфатной или 3'-гидроксильной группы в катализе реакции ацилирования. Полученные данные и результаты компьютерного моделирования позволили сделать предположение о возможности каталитического участия 2'-гидроксильной группы в реакции образования пептидной связи в пептидном центре рибосомы.

Используя РНК, содержащую спиновую метку в 2'-положении,²³⁷ Сигурдссон и сотр.^{424, 425} изучали влияние ионов металлов на структуру и взаимодействие модифицированной TAR РНК с фрагментами Tat-белка. Методом ЭПР было показано, что замена ионов кальция на ионы натрия не изменяет структуру TAR РНК, но ослабляет взаимодействие фрагмента мутантного Tat-белка с определенными нуклеотидными звеньями. Введение в состав TAR РНК нескольких спиновых меток⁴²⁶ позволило изучить ее взаимодействие с рядом красителей, интеркаляторов и антибиотиков и определить участки связывания этих молекул. В дальнейшем с помощью данной модификации были определены расстояния в двуспиральной РНК методом спектроскопии ЭПР.⁴²⁷

г. Рибозимы

Рибозимы — это короткие РНК, которые катализируют сиквенс-специфичное расщепление РНК, лигирование и ряд

других процессов.³ Наиболее изученным является молотообразный рибозим.^{428–430} В данном разделе рассмотрены рибозимы, содержащие нуклеозиды с химически активными группами в 2'-положении.

Введение в определенные положения рибозима 2'-амино-2'-дезоксигуанидинуклеозидов,^{228, 431–437} 2'-тионуклеозидов,^{433, 435} 2'-аминооксинуклеозидов,^{86, 433, 435} 2'-*O*-метил- и 2'-*O*-аллилнуклеозидов⁴³⁸ приводит к значительному увеличению устойчивости РНК к действию нуклеаз при сохранении или незначительном уменьшении каталитической активности. Подобные результаты были получены в случае ДНКзима.⁴³⁹

Однако в работе⁴⁴⁰ показано, что включение некоторых заместителей в 2'-положение углеводного фрагмента вызывает сильное снижение каталитической активности рибозима. Этот эффект не зависит от размера вводимой группировки, а определяется природой связи при C(2')-атоме. По-видимому, ряд модификаций, таких как 2'-ацетиламидная и 2'-алкилуретановая группировки, препятствует протеканию конформационных изменений молекулы рибозима при катализе. Это подтверждают данные работы⁴⁴¹ об отсутствии каталитической активности у молотообразного рибозима, содержащего 2'-ацетиламидные группировки, и данные Бейгельмана и соавт.¹⁹³ о значительном снижении каталитической активности при ацилировании 2'-амино-2'-дезоксигуанидина аминокислотами (аланином, фенилаланином, лизин и аспарагином).

Хамм и соавт.⁴⁴² предположили, что если субстрат рибозима dH16 содержит 2'-тиоцитидин вместо природного цитидина, то расщепление РНК протекает через стадию образования 1',2'-эписульфида по механизму, аналогичному гидролизу в щелочной среде.^{263, 264} При этом скорость расщепления модифицированной РНК понижается на два порядка по сравнению с природными олигорибонуклеотидами. Дальнейшее изучение свойств олигонуклеотидов с 2'-тиоцитидиновым звеном показало,⁴⁴³ что для протекания реакции необходимо присутствие ионов марганца. Более того, при отсутствии в реакционной смеси кислорода или при наличии ловушек свободных радикалов реакция не идет.

Включение нескольких остатков 2'-тиоцитидина 5'-фосфата в состав рибозима полностью ингибировало его каталитическую активность.⁴⁴⁴

Авторы работы⁴⁴⁵ синтезировали модифицированный Р4–Р6 домен интронного участка РНК простейшего *Tetrahymena* с использованием α -тиотрифосфатов 2'-тионуклеозидов. Выделение РНК, не соответствующих природному фрагменту по геле-электрофоретической подвижности, и последующее расщепление модифицированных РНК иодом по тиофосфатным группам позволило определить положения 2'-гидроксильных групп в составе домена, которые необходимы для его сворачивания.

Стромберг и сотр.^{446–448} изучали самосплайсинг интрона IA2 пре-мРНК, образующейся в ходе экспрессии гена *nrdB* бактериофага T4. При этом происходит присоединение гуанозина по 5'-концу интрона, сопровождающееся расщеплением РНК, и последующее отделение остатка гуанозина от интронной последовательности, протекающее в присутствии ионов металлов. При использовании в качестве кофактора 2'-амино-2'-дезоксигуанозина вместо гуанозина скорость реакции сплайсинга уменьшалась в 20–25 раз. Изучение зависимости скорости отщепления гуанозина от pH, концентрации и природы ионов двухвалентных металлов позволило установить наличие взаимодействия ионов металлов с 2'-гидроксильной и 2'-аминогруппами. В работах^{449, 450} в ходе аналогичного исследования каталитической активности РНК *Tetrahymena* было показано, что 2'-аминогруппа и ион двухвалентного металла конкурентно взаимодействуют с одной и той же фосфатной группой на 5'-конце активного центра рибозима.

Созданные в настоящее время модифицированные рибозимы представляют собой сложные конструкции, содержащие одновременно 2'-*O*-метилнуклеозиды, 2'-амино-2'-дезоксигуанидин, 2'-фтор-2'-дезоксинуклеозиды и тиофосфатные межнуклеотидные связи.⁴⁵¹ При этом введение в 2'-положение объемистых заместителей приводило к значительному снижению активности рибозима,^{229, 440} поэтому использование подобных конструкций не является перспективным.

V. Заключение

В настоящее время синтез олигонуклеотидов, содержащих реакционноспособные группы в 2'-положении, и конъюгатов на их основе представляется перспективным подходом к направленному изменению физико-химических и субстратных свойств фрагментов нуклеиновых кислот. Среди модифицированных нуклеозидов наиболее распространенными являются 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозиды, которые могут быть легко включены в состав НК химическими или ферментативными методами и впоследствии селективно проацилированы. Это обусловило коммерческую доступность амидофосфитных производных и 5'-трифосфатов пиримидиновых 2'-амино-2'-дезоксирибонуклеозидов (TriLink Bio-Tech, США).

Методология получения модифицированных олигонуклеотидов, в которых с C(2')- или O(2')-атомом связаны различные молекулы или реакционноспособные группы, к настоящему времени хорошо разработана. При этом значительная часть работ посвящена синтезу олигонуклеотидов, содержащих нуклеофильные группы, так как амидофосфитные производные для получения этих соединений в большинстве случаев коммерчески доступны.

Для создания конъюгатов с амидной связью используют методы активации карбоксильной группы, изначально разработанные для синтеза пептидов, где традиционно концентрация вещества, содержащего карбоксильную группу, на порядок превышает концентрацию аминокислотного компонента. Поэтому представляется целесообразным осуществлять взаимодействие аминокислот в составе олигонуклеотидов с избытком карбоксилсодержащих соединений. Кроме того, наличие в олигонуклеотидной цепи аминокислотной группы легко вписывается в регламент олигонуклеотидного синтеза, в то время как карбоксильная группа требует предварительного деблокирования перед стандартными постсинтетическими обработками.

Модифицированные олигонуклеотиды, в которых тиольные группы присоединены через различные линкеры к O(2')-атому, легкодоступны и применяются для получения конъюгатов с дисульфидной связью.

Не понятна причина редкого использования олигонуклеотидов, содержащих альдегидную или кетогруппу. Только в последние годы стали появляться работы по синтезу и применению альдегидсодержащих олигонуклеотидов.¹⁰⁹ Получил распространение коммерчески доступный модифицированный полимерный носитель (Glen Research), позволяющий получать олигонуклеотиды с альдегидной группой на 3'-конце. Недавно стал доступен активированный эфир 4-формилбензойной кислоты, использование которого позволяет включать альдегидную группу в состав олигонуклеотидов, содержащих алифатическую аминокислотную группу.

На основании приведенного выше анализа можно сказать, что методы получения конъюгатов в растворе и на полимерном носителе имеют примерно равное значение. В случае выбора метода конъюгации в растворе необходимо добиться растворимости компонентов и селективности протекания реакции, а присоединяемое к олигонуклеотиду вещество должно легко отделяться от продукта методом ВЭЖХ или гель-электрофореза; в твердофазном варианте

образованная связь и присоединенная молекула должны быть стабильными в условиях постсинтетических обработок. Конъюгация нуклеозидов имеет гораздо меньшее значение, но перспективна для получения соединений с различными репортерными группами.

Анализ существующих работ, посвященных применению 2'-модифицированных олигонуклеотидов, показывает значительные успехи, достигнутые во многих областях молекулярной биологии, антисмысловой и антигенной биотехнологии и энзимологии.

Авторы выражают благодарность А.Ю.Томашевскому (University of Virginia, Charlottesville, VA, USA), О.Ю.Смирновой (German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany) и Д.А.Стеценко (Medical Research Council, Cambridge, UK) за помощь в подготовке обзора. Работа выполнена в рамках программы «Университеты России» (проект УР.05.03.010) при финансовой поддержке Wellcome Trust (грант № CRIG 069419) и Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 03-04-48957).

Литература

1. D.A.Braasch, D.R.Corey. *Biochemistry*, **41**, 4503 (2002)
2. D.Praseuth, A.L.Guieysse, C.Helene. *Biochim. Biophys. Acta*, **1489**, 181 (1999)
3. E.A.Doherty, J.A.Doudna. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 597 (2000)
4. L.Gold, B.Polisky, O.Uhlenberg, M.Yarus. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 763 (1995)
5. P.D.Zamore. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 746 (2001)
6. G.J.Hannon. *Nature (London)*, **418**, 244 (2002)
7. J.Telser, K.A.Cruikshank, L.E.Morrison, T.L.Netzel. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6966 (1989)
8. E.Bucci, L.De Napoli, G.Di Fabio, A.Messere, D.Montesarchio, A.Romanelli, G.Piccilli, M.Varra. *Tetrahedron*, **55**, 14435 (1999)
9. В.А.Коршун, Е.В.Манасова, Ю.А.Берлин. *Биоорг. химия*, **23**, 324 (1997)
10. А.Ф.Насонов, Г.А.Коршунова. *Успехи химии*, **68**, 532 (1999)
11. H.Rosemeyer, N.Ramzaeva, E.M.Becker, E.Feiling, F.Seela. *Bioconjugate Chem.*, **13**, 1274 (2002)
12. M.T.Tierney, M.W.Grinstaff. *Org. Lett.*, **2**, 3413 (2000)
13. M.Manoharan. *Biochim. Biophys. Acta*, **1489**, 117 (1999)
14. T.Pathak. *Chem. Rev.*, **102**, 1623 (2002)
15. J.G.Moffatt. In *Nucleoside Analogues. Chemistry, Biology and Medical Applications. Vol. A26*. (Eds R.T.Walker, E.De Clercq, F.Eckstein). Plenum, New York, 1979. P. 92
16. T.Ueda. In *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides. Vol. 1*. (Ed. L.B.Townsend). Plenum, New York, 1988. P. 50
17. J.P.H.Verheyden, D.Wagner, J.G.Moffatt. *J. Org. Chem.*, **36**, 250 (1971)
18. T.Sasaki, K.Minamoto, T.Siguiru. *J. Org. Chem.*, **40**, 3498 (1975)
19. T.Sasaki, K.Minamoto, T.Siguiru, M.Niwa. *J. Org. Chem.*, **41**, 3138 (1976)
20. G.P.Kirschenheuter, Y.Zhai, W.A.Pieken. *Tetrahedron Lett.*, **35**, 8517 (1994)
21. D.P.C.McGee, C.Vargeese, Y.Zhai, G.P.Kirschenheuter, A.Settle, C.R.Siedem, W.A.Pieken. *Nucleosides Nucleotides*, **14**, 1329 (1995)
22. M.W.Logue, B.H.Han. *J. Org. Chem.*, **45**, 5000 (1980)
23. D.P.C.McGee, A.Vaughn-Settle, C.Vargeese, Y.Zhai. *J. Org. Chem.*, **61**, 781 (1996)
24. D.P.C.McGee, D.P.Sebesta, S.S.O'Rourke, R.L.Martinez, M.E.Jung, W.A.Pieken. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 1995 (1996)
25. D.P.Sebesta, S.S.O'Rourke, R.L.Martinez, W.A.Pieken, D.P.C.McGee. *Tetrahedron*, **52**, 14385 (1996)
26. D.P.C.McGee, A.Vaughn-Settle. *Nucleosides Nucleotides*, **16**, 1095 (1997)
27. E.S.Krider, J.E.Miller, T.J.Meade. *Bioconjugate Chem.*, **13**, 155 (2002)
28. A.Ogawa, S.Shuto, O.Inanami, M.Kuwabara, M.Tanaka, T.Sasaki, A.Matsuda. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **8**, 1913 (1998)

29. A.Ogawa, M.Tanaka, T.Sasaki, A.Matsuda. *J. Med. Chem.*, **41**, 5094 (1998)
30. A.Ogawa, S.Shuto, M.Tanaka, T.Sasaki, S.Mori, S.Shigeta, A.Matsuda. *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1000 (1999)
31. A.Karpeisky, D.Sweedler, P.Haeberli, J.Read, K.Jarvis, L.Beigelman. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3345 (2002)
32. W.T.Markiewicz, M.Wieworowski. *Nucleic Acids Res. Spec. Publ.*, 185 (1978)
33. M.J.Robins, S.D.Hawrelak, A.E.Hernandez, S.F.Wnuk. *Nucleosides Nucleotides*, **11**, 821 (1992)
34. S.Van Calenbergh, E.van Den Eeckhout, P.Herdewijn, A.De Bruyn, C.Verlinde, W.G.J.Hol, M.Callens, A.van Aerschot, J.Rozensky. *Helv. Chim. Acta*, **77**, 631 (1994)
35. R.Ranganathan, D.Larwood. *Tetrahedron Lett.*, **19**, 4341 (1978)
36. M.J.Robins, F.Hansske, J.S.Wilson, S.D.Hawrelak, D.Madej. In *Selective Modification and Deoxygenation at C2' of Nucleosides*. (Ed. J.L.Rideout). Academic Press, New York; London, 1984. P. 278
37. S.H.Krawczyk, M.Bernier-Rodriguez, M.R.Nassisri, E.R.Kern, L.L.Wotring, J.C.Drach, L.B.Townsend. *J. Med. Chem.*, **33**, 3160 (1990)
38. D.Wagner, J.P.H.Verheyden, J.G.Moffatt. *J. Org. Chem.*, **39**, 24 (1974)
39. A.Sato, R.Imai, N.Nakamizo, T.Hirata. *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 821 (1979)
40. M.J.Robins, S.D.Hawrelak. *Tetrahedron Lett.*, **19**, 3653 (1978)
41. A.Matsuda, J.Yasuoka, T.Ueda. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1659 (1989)
42. A.Matsuda, J.Yasuoka, T.Sasaki, T.Ueda. *J. Med. Chem.*, **34**, 999 (1991)
43. K.Minamoto, K.Azuma, T.Tanaka, H.Iwasaki, S.Eguchi, S.Kadoya, R.Moroi. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2955 (1988)
44. R.Mengel, H.Wiedner. *Chem. Ber.*, **109**, 433 (1976)
45. F.J.McEvoy, B.R.Baker, M.J.Weiss. *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 209 (1960)
46. M.L.Wolfom, M.W.Winkley. *J. Org. Chem.*, **32**, 1823 (1967)
47. J.B.Hobbs, F.Eckstein. *J. Org. Chem.*, **42**, 714 (1977)
48. M.Imazawa, F.Eckstein. *J. Org. Chem.*, **44**, 2039 (1979)
49. M.Ferrero, V.Gotor. *Monatsh. Chem.*, **131**, 585 (2000)
50. T.Utagawa. *J. Mol. Catal., B*, **6**, 215 (1999)
51. K.Matsuyama, Y.Takahashi, M.Yamashita, A.Hirano, S.Omura. *J. Antibiot.*, **32**, 1367 (1979)
52. R.J.Suhadolnik, S.Pornbanlualap, D.C.Baker, K.N.Tiwari, A.K.Hebblar. *Arch. Biochem. Biophys.*, **270**, 374 (1989)
53. T.Utagawa, H.Morisawa, T.Nakamatsu, A.Yamazaki, S.Yamanaka. *FEBS Lett.*, **119**, 101 (1980)
54. T.Utagawa, H.Morisawa, S.Yamanaka, A.Yamazaki, Y.Hirose. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1671 (1985)
55. M.J.Robins, R.Zon, F.Hansske, S.F.Wnuk. *Can. J. Chem.*, **75**, 762 (1997)
56. Т.С.Зацепин, Е.А.Романова, Т.С.Орецкая. *Успехи химии*, **71**, 586 (2002)
57. C.J.Guinosso, G.D.Hoke, S.Frier, J.F.Martin, D.J.Ecker, C.K.Mirabelli, S.T.Crooke, P.D.Cook. *Nucleosides Nucleotides*, **10**, 259 (1991)
58. M.Manoharan, C.J.Guinosso, P.D.Cook. *Tetrahedron Lett.*, **32**, 7171 (1991)
59. Пат. 5859221 США; *Chem. Abstr.*, **130**, 110559 (1999)
60. Пат. 5872232 США; *Chem. Abstr.*, **130**, 139589 (1999)
61. Пат. 5914396 США (1999)
62. R.H.Griffey, B.P.Monika, L.L.Cummins, S.M.Freier, M.J.Greig, C.J.Guinosso, E.A.Lesnik, S.M.Manalili, V.Mohan, S.R.Owens, B.R.Ross, H.Sasmor, E.Wancewich, K.Weiler, P.D.Cook. *J. Med. Chem.*, **39**, 5100 (1996)
63. M.Manoharan, T.P.Prakash, I.Barber-Peoc'h, B.Bhat, G.Vasquez, B.S.Ross, P.D.Cook. *J. Org. Chem.*, **64**, 6468 (1999)
64. M.Manoharan. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **12**, 103 (2002)
65. M.Manoharan, K.M.Tivel, L.K.Andrade, P.D.Cook. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 3647 (1995)
66. B.S.Ross, R.H.Springer, Z.Tortorici, S.Dimock. *Nucleosides Nucleotides*, **16**, 1641 (1997)
67. M.Manoharan, T.P.Prakash, I.Barber-Peoc'h, B.Bhat, G.Vasquez, B.S.Ross, P.D.Cook. *Nucleosides Nucleotides*, **18**, 1199 (1999)
68. T.P.Prakash, M.Manoharan, A.W.Kawasaki, A.S.Fraser, E.A.Lesnik, N.Sioufi, J.M.Leeds, M.Teplova, M.Egli. *Biochemistry*, **41**, 11642 (2002)
69. M.Prhac, T.P.Prakash, G.Minasov, M.Egli, M.Manoharan. *Org. Lett.*, **5**, 2017 (2003)
70. M.J.J.Blommers, F.Natt, W.Jahnke, B.Cuenoud. *Biochemistry*, **37**, 17714 (1998)
71. P.Martin. *Helv. Chim. Acta*, **78**, 486 (1995)
72. B.Cuenoud, F.Casset, D.Husken, F.Natt, R.M.Wolf, K.-H.Altmann, P.Martin, H.E.Moser. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **37**, 1288 (1998)
73. A.E.Klopfer, J.W.Engels. *ChemBioChem*, **5**, 348 (2004)
74. M.Sollogoub, B.Domingues, K.R.Fox, T.Brown. *Chem. Commun.*, 2315 (2000)
75. I.Dubey, G.Pratviel, B.Meunier. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3088 (2000)
76. M.Prhac, E.A.Lesnik, V.Mohan, M.Manoharan. *Tetrahedron Lett.*, **42**, 8777 (2001)
77. V.A.Korshun, D.A.Stetsenko, M.J.Gait. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1092 (2002)
78. N.N.Dioubankova, A.D.Malakhov, D.A.Stetsenko, M.J.Gait, P.E.Volynsky, R.G.Efremov, V.A.Korshun. *ChemBioChem*, **4**, 841 (2003)
79. T.H.Keller, R.Haner. *Helv. Chim. Acta*, **76**, 884 (1993)
80. O.Mitsunobu. *Synthesis*, 1 (1981)
81. A.M.Kawasaki, M.D.Casper, T.P.Prakash, S.Manalili, H.Sasmor, M.Manoharan, P.D.Cook. *Tetrahedron Lett.*, **40**, 661 (1999)
82. A.M.Kawasaki, M.D.Casper, T.P.Prakash, S.Manalili, H.Sasmor, M.Manoharan, P.D.Cook. *Nucleosides Nucleotides*, **18**, 1419 (1999)
83. T.P.Prakash, A.M.Kawasaki, G.Vasquez, A.S.Fraser, M.D.Casper, P.D.Cook, M.Manoharan. *Nucleosides Nucleotides*, **18**, 1381 (1999)
84. T.P.Prakash, M.Manoharan, A.M.Kawasaki, E.A.Lesnik, S.R.Owens, G.Vasquez. *Org. Lett.*, **2**, 3995 (2000)
85. T.P.Prakash, A.M.Kawasaki, A.S.Fraser, G.Vasquez, M.Manoharan. *J. Org. Chem.*, **67**, 357 (2002)
86. A.Karpeisky, C.Gonzalez, A.B.Burgin, L.Beigelman. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 1131 (1998)
87. S.Chambert, J.-L.Decout. *Org. Prep. Proced. Int.*, **34**, 27 (2002)
88. D.M.Brown, D.B.Parihar, Sir A.Todd, S.Varadarajan. *J. Chem. Soc.*, 3028 (1958)
89. Y.Furukawa, Y.Yoshioka, K.Imai, M.Honjo. *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 554 (1970)
90. R.Ranganathan. *Tetrahedron Lett.*, **18**, 1291 (1977)
91. M.Imazawa, T.Ueda, T.Ukita. *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 604 (1975)
92. K.J.Divakar, C.B.Reese. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1625 (1982)
93. M.L.Hamm, J.A.Piccirilly. *J. Org. Chem.*, **62**, 3415 (1997)
94. H.Ozaki, S.Momiyama, K.Yokotsuka, H.Sawai. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **42**, 47 (1999)
95. H.Ozaki, S.Momiyama, K.Yokotsuka, H.Sawai. *Tetrahedron Lett.*, **42**, 677 (2001)
96. K.J.Divakar, A.Mottoh, C.B.Reese, Y.S.Sanghvi. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 969 (1990)
97. S.Chambert, I.Gautier-Luneau, M.Fontecave, J.-L.Decout. *J. Org. Chem.*, **65**, 249 (2000)
98. A.D.Patel, W.H.Schrier, J.Nagyvary. *J. Org. Chem.*, **45**, 4830 (1980)
99. K.J.Ryan, E.M.Acton, L.Goodman. *J. Org. Chem.*, **36**, 2646 (1971)
100. C.B.Reese, C.Simons, Z.Pei-Zhuo. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1809 (1994)
101. M.Manoharan, L.K.Johnson, K.L.Tivel, R.H.Springer, P.D.Cook. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **3**, 2765 (1993)
102. M.Manoharan, K.L.Tivel, B.Ross, P.D.Cook. *Gene*, **149**, 147 (1994)
103. Пат. 5578718 США (1996)
104. M.E.Douglas, B.Beijer, B.S.Sproat. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **4**, 995 (1994)
105. J.T.Goodwin, S.E.Osborne, E.J.Scholle, G.Glick. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 5207 (1996)
106. E.J.Maglott, G.Glick. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1301 (1998)

107. C.W.Gundlach IV, T.R.Ryder, G.D.Glick. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 4039 (1997)
108. X.Wu, S.Pitsch. *Bioconjugate Chem.*, **10**, 921 (1999)
109. А.В.Качалова, Е.М.Зубин, Т.С.Орепкая. *Успехи химии*, **71**, 1171 (2002)
110. U.Brodbeck, J.G.Moffatt. *J. Org. Chem.*, **35**, 3552 (1970)
111. F.Hansske, M.J.Robins. *Tetrahedron Lett.*, **24**, 1589 (1983)
112. F.Hansske, D.Madej, M.J.Robins. *Tetrahedron*, **40**, 125 (1984)
113. A.Tranchet, R.Benhamza, G.Bernardinelli, M.Geoffroy. *Tetrahedron Lett.*, **31**, 531 (1990)
114. T.-S.Lin, M.-Z.Luo, M.-C.Liu, R.H.Clarke-Kazenburg, Y.-C.Cheng, W.H.Prusoff, W.R.Mancini, G.I.Birnbaum, E.J.Gabe, J.Giziewicz. *J. Med. Chem.*, **34**, 2607 (1991)
115. A.Matsuda, K.Takenuki, H.Itoh, T.Sasaki, T.Ueda. *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3967 (1987)
116. A.Matsuda, H.Itoh, K.Takenuki, T.Sasaki, T.Ueda. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 945 (1988)
117. T.Ueda, A.Matsuda, Y.Yoshimura, K.Takenuki. *Nucleosides Nucleotides*, **8**, 743 (1989)
118. K.Takenuki, A.Matsuda, T.Ueda, T.Sasaki, A.Fujii, K.Yamagami. *J. Med. Chem.*, **31**, 1063 (1988)
119. K.Takenuki, H.Itoh, A.Matsuda, T.Ueda. *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2947 (1990)
120. A.Matsuda, K.Takenuki, T.Sasaki, T.Ueda. *J. Med. Chem.*, **34**, 234 (1991)
121. K.Omura, A.K.Sharma, D.Swern. *J. Org. Chem.*, **41**, 957 (1976)
122. K.Omura, D.Swern. *Tetrahedron*, **34**, 1651 (1978)
123. J.R.McCarthy, D.P.Matthews, D.M.Stemerick, E.W.Huber, P.Bey, B.J.Lippert, R.D.Snyder, P.S.Suncara. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 7439 (1991)
124. D.P.Matthews, R.A.Persichetti, J.S.Sabol, K.T.Stewart, J.R.McCarthy. *Nucleosides Nucleotides*, **12**, 115 (1993)
125. R.B.Appell, R.J.Duguid. *Org. Proc. Res. Dev.*, **4**, 172 (2000)
126. V.Samano, M.J.Robins. *J. Org. Chem.*, **55**, 5186 (1990)
127. D.B.Dess, J.C.Martin. *J. Org. Chem.*, **48**, 4155 (1983)
128. D.P.Kjell, B.J.Slattey. *Nucleosides Nucleotides*, **16**, 469 (1997)
129. M.Dunkel, V.Reither. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 787 (1999)
130. K.Takenuki, A.Matsuda, T.Ueda, T.Sasaki, A.Fujii, K.Yamagami. *J. Med. Chem.*, **31**, 1064 (1988)
131. A.E.A.Hassan, S.Shuto, A.Matsuda. *J. Org. Chem.*, **62**, 11 (1997)
132. R.Buff, J.Hunziker. *Helv. Chim. Acta*, **85**, 224 (2002)
133. M.Sukeda, S.Shuto, I.Sugimoto, S.Ichikawa, A.Matsuda. *J. Org. Chem.*, **65**, 8988 (2000)
134. A.Matsuda, Y.Nakajima, A.Azuma, M.Tanaka, T.Sasaki. *J. Med. Chem.*, **34**, 2917 (1991)
135. A.Azuma, Y.Nakajima, N.Nishizono, N.Minakawa, M.Suzuki, K.Hanaoka, T.Kobayashi, M.Tanaka, T.Sasaki, A.Matsuda. *J. Med. Chem.*, **36**, 4183 (1993)
136. K.Hanaoka, M.Suzuki, T.Kobayashi, F.Tanzawa, K.Tanaka, T.Shibayama, S.Miura, T.Ikeda, H.Iwabuchi, A.Nakagawa, Y.Mitsuhashi, M.Hisaoka, M.Kaneko, A.Tomida, Y.Wataya, T.Nomura, T.Sasaki, A.Matsuda, T.Tsuruo, S.Kurakata. *Int. J. Cancer*, **82**, 226 (1999)
137. T.Takahashi, A.Nakashima, J.Kanazawa, K.Yamaguchi, S.Akinaga, T.Tamaoki, M.Okabe. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **41**, 268 (1998)
138. S.M.Freier, K.H.Altmann. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4429 (1997)
139. A.Matsuda, M.Inada, H.Nara, E.Ohtsuka, A.Ono. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **3**, 2751 (1993)
140. A.V.Kachalova, T.S.Zatsepin, E.A.Romanova, D.A.Stetsenko, M.J.Gait, T.S.Oretskaya. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **19**, 1693 (2000)
141. Т.С.Зацепин, А.В.Качалова, Е.А.Романова, Д.А.Стеценко, М.Дж.Гейт, Т.С.Орепкая. *Биоорг. химия*, **27**, 45 (2001)
142. О.М.Гриценко, Е.С.Громова. *Успехи химии*, **68**, 267 (1999)
143. Б.С.Ермолинский, С.Н.Михайлов. *Биоорг. химия*, **26**, 483 (2000)
144. Е.В.Ефимцева, С.Н.Михайлов. *Биохимия*, **67**, 1374 (2002)
145. Т.Р.Prakash, А.М.Kawasaki, Е.А.Lesnik, S.R.Owens, M.Manoharan. *Org. Lett.*, **5**, 403 (2003)
146. A.Fraser, P.Wheeler, P.D.Cook, Y.S.Sanghvi. *J. Heterocycl. Chem.*, **30**, 1277 (1993)
147. M.Egli. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35**, 1894 (1996)
148. M.Sekine, H.Tsuruoka, S.Imura, H.Kusuoka, T.Wada, K.Furusawa. *J. Org. Chem.*, **61**, 4087 (1996)
149. H.Tsuruoka, K.Shohda, T.Wada, M.Sekine. *J. Org. Chem.*, **65**, 7479 (2000)
150. A.Zehl, D.Cech. *Liebigs Ann. Chem.*, 595 (1997)
151. N.G.Dolinnaya, Z.A.Shabarova. *Sov. Sci. Rev. D, Physicochem. Biol.*, **13**, 1 (1995)
152. J.C.Leitzel, D.G.Lynn. *Chem. Rec.*, **1**, 53 (2001)
153. H.Aurup, D.M.Williams, F.Eckstein. *Biochemistry*, **31**, 9636 (1992)
154. W.Pieken. *Ciba Found. Symp.*, **209**, 218 (1997)
155. B.E.Eaton, W.A.Pieken. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 837 (1995)
156. M.J.Kujau, A.Siebert, S.Wolf. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **35**, 141 (1997)
157. E.Zamaratski, J.Chattopadhyaya. *Tetrahedron*, **54**, 8183 (1998)
158. C.J.Yu, H.Wang, H.Yowanto, J.C.Kim, L.H.Donilon, C.Tao, M.Strong, Y.Chong. *J. Org. Chem.*, **66**, 2937 (2001)
159. C.J.Yu, Y.Wan, H.Yowanto, J.Li, C.Tao, M.D.James, C.L.Tam, G.F.Blackburn, T.J.Meade. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 11155 (2001)
160. J.K.Bashkin, J.Xie, A.T.Daniher, U.S.Sampath, J.L.-F.Kao. *J. Org. Chem.*, **61**, 2314 (1996)
161. H.Asanuma, T.Yoshida, T.Ito, M.Komiyama. *Tetrahedron Lett.*, **40**, 7995 (1999)
162. K.Yamana, Y.Ohashi, K.Nunota, M.Kitamura, H.Nakano, O.Sangen, T.Shimidzu. *Tetrahedron Lett.*, **32**, 6347 (1991)
163. K.Yamana, R.Aota, H.Nakano. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 8427 (1995)
164. K.Yamana, Y.Nishijima, T.Ikeda, T.Gokota, H.Ozaki, H.Nakano, O.Sangen, T.Shimidzu. *Bioconjugate Chem.*, **1**, 319 (1990)
165. D.Ly, L.Sanii, G.B.Schuster. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 9400 (1999)
166. C.Sund, N.Puri, J.Chattopadhyaya. *Tetrahedron*, **52**, 12275 (1996)
167. C.Sund, N.Puri, J.Chattopadhyaya. *Nucleosides Nucleotides*, **16**, 755 (1997)
168. M.Manoharan, K.L.Tivel, P.D.Cook. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 3651 (1995)
169. M.Manoharan, K.L.Tivel, T.P.Condon, L.K.Andrade, I.Barber-Peoch, G.Inamati, S.Shash, V.Mohan, M.J.Graham, C.F.Bennet, S.T.Crooke, P.D.Cook. *Nucleosides Nucleotides*, **16**, 1129 (1997)
170. M.Manoharan, K.L.Tivel, M.Zhao, K.Nafisi, T.L.Netzel. *J. Phys. Chem.*, **99**, 17461 (1995)
171. N.A.Whitemore, A.N.Mullenix, G.B.Inamati, M.Manoharan, P.D.Cook, A.A.Tuinman, D.C.Baker, J.Q.Chambers. *Bioconjugate Chem.*, **10**, 261 (1999)
172. M.Manoharan, G.Inamati, K.L.Tivel, B.Conklin, B.S.Ross, P.D.Cook. *Nucleosides Nucleotides*, **16**, 1141 (1997)
173. T.H.Keller, R.Haner. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 4499 (1993)
174. K.Seio, T.Wada, K.Sakamoto, S.Yokoyama, M.Sekine. *J. Org. Chem.*, **63**, 1429 (1998)
175. K.Seio, T.Wada, K.Sakamoto, S.Yokoyama, M.Sekine. *Helv. Chim. Acta*, **83**, 162 (2000)
176. A.K.M.Anisuzzaman, F.Alam, A.H.Soloway. *Polyhedron*, **9**, 891 (1990)
177. W.Tjaks, A.K.M.Anisuzzaman, L.Liu, A.H.Soloway, R.F.Barth, D.J.Perkins, D.M.Adams. *J. Med. Chem.*, **35**, 1628 (1992)
178. W.Tjaks, A.K.M.Anisuzzaman, A.H.Soloway. *Nucleosides Nucleotides*, **11**, 1765 (1992)
179. R.F.Barth, A.H.Soloway, R.G.Fairchild, R.M.Brugger. *Cancer*, **70**, 2995 (1992)
180. A.H.Soloway, W.Tjarks, B.A.Barnum, F.G.Rong, R.F.Barth, I.M.Codogni, J.G.Wilson. *Chem. Rev.*, **98**, 1515 (1998)
181. L.Liu, R.F.Barth, W.Tjarks, A.H.Soloway, A.K.M.Anisuzzaman. *Anticancer Res.*, **16**, 113 (1996)
182. A.B.Olejniczak, M.Koziolekiewicz, Z.J.Lesnikowski. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **12**, 79 (2002)
183. T.Mitsui, H.Hayashi, K.Yamana, H.Nakano. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **69** (1997)
184. K.Yamana, T.Mitsui, H.Hayashi, H.Nakano. *Tetrahedron Lett.*, **38**, 5815 (1997)
185. K.Yamana, Y.Ohashi, K.Nunota, H.Nakano. *Tetrahedron*, **53**, 4265 (1997)

186. T.Mitsui, H.Nakano, K.Yamana. *Tetrahedron Lett.*, **41**, 2605 (2000)
187. S.K.Silverman, M.L.Deras, S.A.Woodson, S.A.Scaringe, T.R.Cech. *Biochemistry*, **39**, 12465 (2000)
188. Пат. 6090933 США; *Chem. Abstr.*, **129**, 25365 (2000)
189. Пат. 6096273 США; *Chem. Abstr.*, **129**, 25365 (2000)
190. Пат. 6221583 США; *Chem. Abstr.*, **129**, 25365 (2001)
191. L.Milne, D.M.Perrin, D.S.Sigman. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3136 (2000)
192. O.P.Kryatova, W.H.Conners, C.F.Blecinski, A.A.Mokhir, C.Richert. *Org. Lett.*, **3**, 987 (2001)
193. J.Matulic-Adamic, L.Beigelman, L.W.Dudycz, C.Gonzalez, N.Usman. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **5**, 2721 (1995)
194. J.Matulic-Adamic, V.Serebryany, P.Haerberli, V.R.Mokler, L.Beigelman. *Bioconjugate Chem.*, **13**, 1071 (2002)
195. A.M.Aronov, S.Suresh, F.Buckner, W.van Voorhis, C.L.M.J.Verlinde, F.R.Opperdoes, W.G.J.Hol, M.H.Gelb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4273 (1999)
196. A.Link, S.van Calenbergh, P.Herdewijn. *Tetrahedron Lett.*, **39**, 5175 (1998)
197. B.Backes, A.A.Virgilio, J.A.Ellmann. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 3055 (1996)
198. A.Golisade, S.van Calenbergh, A.Link. *Tetrahedron*, **56**, 3167 (2000)
199. J.C.Bressi, C.L.M.J.Verlinde, A.M.Aronov, M.L.Shaw, S.S.Shin, L.N.Nguyen, S.Suresh, F.S.Buckner, W.C.van Voorhis, I.D.Kuntz, W.G.J.Hol, M.H.Gelb. *J. Med. Chem.*, **44**, 2080 (2001)
200. A.Golisade, J.C.Bressi, S.van Calenbergh, M.H.Gelb, A.Link. *J. Comb. Chem.*, **2**, 537 (2000)
201. A.Golisade, C.Herforth, L.Quirijnen, L.Maes, A.Link. *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 159 (2002)
202. N.N.Polushin. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 3231 (1996)
203. Пат. 5902879 США; *Chem. Abstr.*, **130**, 352505w (1999)
204. N.N.Polushin. *Collect. Czech. Chem. Commun., Symp. Ser.*, **2**, 145 (1999)
205. J.J.Rack, E.S.Krider, T.J.Meade. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6287 (2000)
206. E.S.Krider, J.J.Rack, N.L.Frank, T.J.Meade. *Inorg. Chem.*, **40**, 4002 (2001)
207. N.L.Frank, T.J.Meade. *Inorg. Chem.*, **42**, 1039 (2003)
208. K.L.Dombi, U.E.Steiner, C.Richert. *J. Comb. Chem.*, **5**, 45 (2003)
209. I.Barber-Peoc'h, M.Manoharan, P.D.Cook. *Nucleosides Nucleotides*, **16**, 1407 (1997)
210. M.A.Maier, I.Barber-Peoc'h, M.Manoharan. *Tetrahedron Lett.*, **43**, 7613 (2002)
211. W.H.Conners, S.Naranayan, O.P.Kryatova, C.Richert. *Org. Lett.*, **5**, 247 (2003)
212. E.M.Zubin, E.A.Romanova, E.M.Volkov, V.N.Tashlitsky, G.A.Korshunova, Z.A.Shabarova, T.S.Oretskaya. *FEBS Lett.*, **456**, 59 (1999)
213. J.-T.Hwang, M.M.Greenberg. *Org. Lett.*, **1**, 2021 (1999)
214. J.-T.Hwang, M.M.Greenberg. *J. Org. Chem.*, **66**, 363 (2001)
215. H.Salo, P.Virta, H.Hakala, T.P.Prakash, A.M.Kawasaki, M.Manoharan, H.Lönnberg. *Bioconjugate Chem.*, **10**, 815 (1999)
216. J.P.Tam, J.C.Spetzler. *Biomed. Peptides Proteins Nucleic Acids*, **1**, 123 (1995)
217. N.Polushin, A.Malykh, O.Malykh, M.Zenkova, N.Chumakova, V.Vlassov, S.Kozyavkin. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **20**, 507 (2001)
218. V.Banuls, J.-M.Escudier, C.Zedde, C.Claparols, B.Donnadieu, H.Plaisancie. *Eur. J. Org. Chem.*, 4693 (2001)
219. X.Wu, S.Pitsch. *Helv. Chim. Acta*, **83**, 1127 (2000)
220. W.Gueschlbauser, K.Jankowski. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 1421 (1980)
221. L.-S.Kan, R.Bauman, P.Bhan, P.S.Miller. *J. Chin. Chem. Soc. (Taipei)*, **40**, 469 (1993)
222. H.Aurup, T.Tuschl, F.Benseler, J.Ludwig, F.Eckstein. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 20 (1994)
223. C.Hendrix, B.Devreese, J.Rozenski, A.van Aershot, A.De Bruyn, J.van Beeumen, P.Herdewijn. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 51 (1995)
224. L.Beigelman, A.Karpeisky, J.Matulic-Adamic, P.Haerberli, D.Sweedler, N.Usman. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4434 (1995)
225. P.S.Miller, P.Bhan, L.-S.Kan. *Nucleosides Nucleotides*, **12**, 785 (1993)
226. F.Wincott, A.Di Renzo, C.Shaffer, S.Grimm, D.Tracz, C.Workman, D.Sweedler, N.Usman. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2677 (1995)
227. F.Benseler, D.M.Williams, F.Eckstein. *Nucleosides Nucleotides*, **11**, 1333 (1992)
228. O.Heindenreich, F.Benseler, A.Fahrenholz, F.Eckstein. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2131 (1994)
229. M.Scherr, C.Klebba, R.Haner, A.Ganser, J.W.Engels. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **7**, 1791 (1997)
230. G.Walcher, W.Phleiderer. *Helv. Chim. Acta*, **79**, 1067 (1996)
231. B.Greiner, W.Phleiderer. *Helv. Chim. Acta*, **81**, 1528 (1998)
232. N.N.Polushin, I.P.Smirnov, A.N.Verentchikov, J.M.Coull. *Tetrahedron Lett.*, **37**, 3227 (1996)
233. Л.Г.Кузнецова, Е.М.Волков, Е.А.Романова, В.Н.Ташлицкий, Т.С.Орецкая, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **17**, 1289 (1991)
234. Л.Г.Кузнецова, Е.А.Романова, Е.М.Волков, В.Н.Ташлицкий, Т.С.Орецкая, Н.Ф.Крынецкая, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **19**, 455 (1993)
235. K.Yamana, T.Mitsui, H.Nakano. *Tetrahedron*, **55**, 9143 (1999)
236. P.Sergiev, S.Dokudovskaya, E.Romanova, A.Topin, A.Bogdanov, R.Brimacombe, O.Dontsova. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2519 (1998)
237. T.E.Edwards, T.M.Okonogi, B.H.Robinson, S.T.Sigurdsson. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1527 (2001)
238. S.T.Sigurdsson, T.Tuschl, F.Eckstein. *RNA*, **1**, 575 (1995)
239. S.T.Sigurdsson, F.Eckstein. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3129 (1996)
240. S.Alefeld, S.T.Sigurdsson. *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, 269 (2000)
241. С.И.Анцыпович, Е.М.Волков, Т.С.Орецкая, Е.А.Романова, В.Н.Ташлицкий, М.Блюменфельд, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **21**, 774 (1995)
242. С.И.Анцыпович, Т.С.Орецкая, Е.А.Романова, Е.М.Волков, В.Н.Ташлицкий, М.Вассер, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **22**, 264 (1996)
243. С.И.Анцыпович, Т.С.Орецкая, Е.А.Романова, Е.М.Волков, В.Н.Ташлицкий, М.Вассер, З.А.Шабарова. *FEBS Lett.*, **378**, 224 (1996)
244. С.И.Анцыпович, Т.С.Орецкая, Е.А.Романова, Е.М.Волков, В.Н.Ташлицкий, М.Вассер, З.А.Шабарова. *FEBS Lett.*, **378**, 224 (1996)
245. Е.М.Зубин, С.И.Анцыпович, Т.С.Орецкая, Е.А.Романова, Е.М.Волков, В.Н.Ташлицкий, З.А.Шабарова. *Биоорг. химия*, **23**, 809 (1997)
246. Е.М.Зубин, С.И.Анцыпович, Т.С.Орецкая, Е.А.Романова, Е.М.Волков, Н.Г.Долинная, З.А.Шабарова. *Nucleosides Nucleotides*, **17**, 425 (1998)
247. L.Zhu, P.S.Lukeman, J.W.Canary, N.C.Seeman. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 10178 (2003)
248. S.K.Silverman, T.R.Cech. *Biochemistry*, **38**, 14224 (1999)
249. S.I.Chamberlin, K.M.Weeks. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 216 (2000)
250. D.M.John, K.M.Weeks. *Chem. Biol.*, **7**, 405 (2000)
251. D.M.John, K.M.Weeks. *Biochemistry*, **41**, 6866 (2002)
252. M.Beban, P.S.Miller. *Bioconjugate Chem.*, **11**, 599 (2000)
253. A.Y.Louie, T.J.Meade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6663 (1998)
254. T.J.Meade, J.F.Kayyem. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **34**, 352 (1995)
255. E.S.Krider, T.J.Meade. *J. Bioinorg. Chem.*, **3**, 222 (1998)
256. D.B.Hall, R.E.Holmin, J.K.Barton. *Nature (London)*, **382**, 731 (1996)
257. P.J.Dandliker, R.E.Holmin, J.K.Barton. *Science*, **275**, 1465 (1997)
258. M.A.Farrow, F.Aboul-ela, D.Owen, A.Karpeisky, L.Beigelman, M.J.Gait. *Biochemistry*, **37**, 3096 (1998)
259. J.Hall, D.Husken, R.Haner. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3522 (1996)
260. Д.А.Стеценко, А.А.Арзуманов, В.А.Коршун, М.Дж.Гейт. *Молекуляр. биология*, **34**, 998 (2000)
261. S.B.Cohen, T.R.Cech. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 6259 (1997)
262. M.L.Hamm, J.A.Piccirilly. *J. Org. Chem.*, **64**, 5700 (1999)
263. R.Johnson, C.B.Reese, Z.Pei-Zhuo. *Tetrahedron*, **51**, 5093 (1995)
264. C.L.Dantzman, L.L.Kiesseling. *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 11715 (1996)
265. M.Manoharan, L.K.Andrade, P.D.Cook. *Org. Lett.*, **1**, 311 (1999)

266. Пат. 5719271 США; *Chem. Abstr.*, **128**, 192883 (1998)
267. Пат. 5543507 США; *Chem. Abstr.*, **125**, 222359 (1996)
268. T.S.Zatsepin, D.A.Stetsenko, A.A.Arzumanov, E.A.Romanova, M.J.Gait, T.S.Oretskaya. *Bioconjugate Chem.*, **13**, 822 (2002)
269. H.Tsuruoka, K.Shohda, T.Wada, M.Sekine. *J. Org. Chem.*, **62**, 2813 (1997)
270. L.L.H.De Fallois, J.L.Decout, M.Fontecave. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2587 (1997)
271. J.Coves, L.L.H.De Fallois, L.Le Pape, J.-L.Decout, M.Fontecave. *Biochemistry*, **35**, 8595 (1996)
272. M.Fontecave. *Cell Mol. Life Sci.*, **1**, 684 (1998)
273. B.Roy, S.Chambert, M.Lepoivre, A.M.Aubertin, J.Balzarini, J.L.Decout. *J. Med. Chem.*, **46**, 2565 (2003)
274. J.Stubbe, W.A.van der Donk. *Chem. Biol.*, **2**, 793 (1995)
275. C.L.M.J.Verlinde, M.Callens, S.van Calenbergh, A.Van Aershot, P.Herdewijn, V.Hannaert, P.A.Michels, F.R.Opperdoes, W.G.J.Hol. *J. Med. Chem.*, **37**, 3605 (1994)
276. S.van Calenbergh, C.L.M.J.Verlinde, J.Soenens, A.De Bruyn, M.Callens, N.M.Blaton, O.M.Peeters, J.Rozensky, W.G.J.Hol, P.Herdewijn. *J. Med. Chem.*, **38**, 3838 (1995)
277. A.M.Aronov, C.L.M.J.Verlinde, W.G.J.Hol, M.H.Gelb. *J. Med. Chem.*, **41**, 4790 (1998)
278. D.H.Smith, J.Pepin, A.H.Stich. *Br. Med. Bull.*, **54**, 341 (1998)
279. S.Suresh, J.C.Bressi, K.J.Kennedy, C.L.M.J.Verlinde, M.H.Gelb, W.G.Hol. *J. Mol. Biol.*, **309**, 423 (2001)
280. E.Uhlmann, A.Peyman. *Chem. Rev.*, **90**, 543 (1990)
281. J.F.Milligan, M.D.Matteucci, J.C.Martin. *J. Med. Chem.*, **36**, 1923 (1993)
282. C.Boiziau, N.T.Thuong, J.J.Toulme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 768 (1992)
283. M.Kulka, C.C.Smith, L.Aurelian, R.Fishelevich, K.Meade, P.Miller, P.O.P.Ts'o. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6868 (1989)
284. B.Mestre, A.Arzumanov, M.Singh, F.Boulme, S.Litvak, M.J.Gait. *Biochim. Biophys. Acta*, **1445**, 86 (1999)
285. B.F.Baker, H.Khalili, N.Wei, J.R.Morrow. *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 8749 (1997)
286. D.S.Wilson, J.W.Szostak. *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 611 (1999)
287. G.M.Emilsson, R.R.Breaker. *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 596 (2002)
288. B.N.Trawick, A.T.Daniher, J.K.Bashkin. *Chem. Rev.*, **98**, 939 (1998)
289. В.Н.Сильников, В.В.Власов. *Успехи химии*, **70**, 562 (2001)
290. D.G.Knorre, V.V.Vlassov, V.F.Zarytova. *Biochimie*, **65**, 785 (1985)
291. C.F.Bennett. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **12**, 215 (2002)
292. J.Sung, T.Garestier, C.Helene. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **6**, 327 (1996)
293. N.Schmid, J.-P.Behr. *Tetrahedron Lett.*, **36**, 1447 (1995)
294. V.Demidov, M.Frank-Kamenetskii, M.Egholm, O.Buchardt, P.E.Nielsen. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 2103 (1993)
295. K.G.Ragunathan, H.-J.Schneider. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **35**, 1219 (1996)
296. D.S.Sergeyev, T.S.Godovikova, V.F.Zarytova. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4400 (1995)
297. T.J.Povsic, P.B.Dervan. *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9428 (1990)
298. E.A.Lukhtanov, M.A.Podymnagin, I.V.Kutyavin, R.B.Meyer, H.B.Gamper. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 683 (1996)
299. A.Fire, S.Xu, M.K.Montgomery, S.A.Kostas, S.E.Driver, C.C.Mello. *Nature (London)*, **391**, 806 (1998)
300. S.M.Elbashir, J.Hardworth, W.Lendeckel, A.Yalcin, K.Weber, T.Tuschl. *Nature (London)*, **411**, 494 (2001)
301. S.M.Elbashir, W.Lendeckel, T.Tuschl. *Genes Dev.*, **15**, 188 (2000)
302. S.Parrish, J.Fleenor, S.Xu, C.Mello, A.Fire. *Mol. Cell*, **6**, 1077 (2000)
303. S.M.Elbashir, J.Martinez, A.Patkanowska, W.Lendeckel, T.Tuschl. *EMBO J.*, **20**, 6877 (2001)
304. A.D.J.Scadden, C.W.J.Smith. *EMBO Rep.*, **2**, 1107 (2001)
305. D.A.Braasch, S.Jensen, Y.Liu, K.Kaur, K.Arar, M.A.White, D.R.Corey. *Biochemistry*, **42**, 7967 (2003)
306. H.Grosshans, F.J.Slack. *J. Cell Biol.*, **156**, 17 (2002)
307. E.G.Moss. *Curr. Biol.*, **12**, R688 (2002)
308. M.T.McManus, P.A.Sharp. *Nature Rev. Genet.*, **3**, 737 (2002)
309. S.Gottesman. *Genes Dev.*, **16**, 2829 (2002)
310. А.М.Копылов, В.А.Спиридонова. *Молекуляр. биология*, **34**, 1097 (2000)
311. T.Hermann, D.J.Patel. *Science*, **287**, 820 (2000)
312. C.Tuerk, L.Gold. *Science*, **249**, 505 (1990)
313. A.D.Ellington, J.W.Szostak. *Nature (London)*, **346**, 818 (1990)
314. W.Kusser. *J. Biotechnol.*, **74**, 27 (2000)
315. J.L.Beck, M.L.Colgrave, S.F.Ralph, M.M.Sheil. *Mass Spectrom. Rev.*, **20**, 61 (2001)
316. C.G.Huber, H.Oberacher. *Mass Spectrom. Rev.*, **20**, 310 (2001)
317. V.K.Jayasena, L.Gold. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10612 (1997)
318. C.Cazenave, M.Chevrier, T.T.Nguyen, C.Helene. *Nucleic Acids Res.*, **15**, 10507 (1987)
319. P.S.Eder, R.J.Devine, J.M.Dagle, J.A.Walder. *Antisense Res. Dev.*, **1**, 141 (1991)
320. H.Orum, J.Wengel. *Curr. Opin. Mol. Ther.*, **3**, 239 (2001)
321. A.N.Elayadi, D.R.Corey. *Curr. Opin. Invest. Drugs*, **2**, 558 (2001)
322. C.H.Tung, S.Stein. *Bioconjugate Chem.*, **11**, 605 (2000)
323. R.I.Mahato, Y.Takakura, M.Hashida. *J. Drug Target*, **4**, 337 (1997)
324. R.L.Juliano, S.Akhtar. *Antisense Res. Dev.*, **2**, 165 (1992)
325. A.R.Thierry, A.Dritschilo. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 5691 (1992)
326. C.R.Dass. *J. Pharm. Pharmacol.*, **54**, 3 (2002)
327. P.Milhaud, J.P.Bolgartz, B.Lebieu. *Drug Delivery*, **3**, 67 (1996)
328. M.Fresta, R.Chillemi, S.Spampinato, S.Scuito, G.Puglisi. *J. Pharm. Sci.*, **87**, 616 (1998)
329. S.Wang, R.J.Lee, G.Cauchon, D.G.Gorenstein, P.S.Low. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3318 (1995)
330. M.P.Selvam, S.M.Buck, R.A.Blal, R.E.Mayner, P.A.Mied, J.S.Epstein. *Antiviral Res.*, **33**, 11 (1996)
331. M.Monsigny, P.Midoux, R.Mayer, A.C.Roche. *Biosci. Rep.*, **19**, 125 (1999)
332. G.Lambert, E.Fattal, P.Couvreux. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47**, 99 (2001)
333. S.W.Poxon, P.M.Mitchell, E.Liang, J.A.Hughes. *Drug Delivery*, **3**, 255 (1996)
334. I.Lebedeva, L.Benimetskaya, C.A.Stein, M.Vilenchik. *Eur. J. Pharmacol. Biopharmacol.*, **50**, 101 (2000)
335. M.Teplova, S.T.Wallace, V.Tereshko, G.Minasov, A.M.Symons, P.D.Cook, M.Manoharan, M.Egli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14240 (1999)
336. A.Arzumanov, A.P.Walsh, V.K.Rajwanshi, R.Kumar, J.Wengel, M.J.Gait. *Biochemistry*, **40**, 14645 (2001)
337. J.C.Schmitz, D.Yu, S.Agrawal, E.Chu. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 415 (2001)
338. P.Sazani, S.H.Kang, M.A.Maier, C.Wei, J.Dillman, J.Summerston, M.Manoharan, R.Kole. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3965 (2001)
339. V.Dapic, P.J.Bates, J.O.Trent, A.Rodger, S.D.Thomas, D.M.Miller. *Biochemistry*, **41**, 3676 (2002)
340. T.C.Mou, D.M.Gray. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 749 (2002)
341. M.Ma, L.Benimetskaya, I.Lebedeva, J.Dignam, G.Takle, C.A.Stein. *Nat. Biotechnol.*, **18**, 58 (2000)
342. M.Rydh-Rinder, O.G.Berge, T.Hokfelt. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **86**, 23 (2001)
343. B.P.Monia, E.A.Lesnik, C.Gonzalez, W.F.Lima, D.McGee, C.J.Guinasso, A.M.Kawasaki, P.D.Cook, S.M.Freier. *J. Biol. Chem.*, **268**, 14514 (1993)
344. G.Krupp. *Biochimie*, **75**, 135 (1993)
345. B.Larrouy, C.Boiziau, B.Sproat, J.J.Toulme. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3434 (1995)
346. M.Teplova, G.Minasov, V.Tereshko, G.B.Inamati, P.D.Cook, M.Manoharan, M.Egli. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 535 (1999)
347. O.Khatsenko, R.Morgan, L.Truong, C.York-Defalco, H.Sasmor, B.Conklin, R.S.Geary. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **10**, 35 (2000)
348. R.S.Geary, T.A.Watanabe, L.Truong, S.Freier, E.A.Lesnik, N.B.Sioufi, H.Sasmor, M.Manoharan, A.A.Levin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **296**, 890 (2001)
349. P.Sazani, F.Gemignani, S.H.Kang, M.A.Maier, M.Manoharan, M.Persmark, D.Bortner, R.Kole. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1228 (2002)
350. D.R.Corey. *Oncogene*, **21**, 631 (2002)
351. T.A.Vickers, J.R.Wyatt, T.Burckin, C.F.Bennett, S.M.Freier. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1239 (2001)

352. H.Torigoe, R.Shimizume, A.Sarai, H.Shindo. *Biochemistry*, **38**, 14653 (1999)
353. J.L.Asensio, R.Carr, T.Brown, A.N.Lane. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 11063 (1999)
354. H.Torigoe, Y.Hari, M.Sekiguchi, S.Obika, T.Imanishi. *J. Biol. Chem.*, **276**, 2354 (2001)
355. A.M.Stutz, J.Hoeck, F.Natt, B.Cuenoud, M.Woisetschlager. *J. Biol. Chem.*, **276**, 11759 (2001)
356. N.Puri, A.Majumdar, B.Cuenoud, F.Natt, P.Martin, A.Boyd, P.S.Miller, M.M.Seidman. *J. Biol. Chem.*, **276**, 28991 (2001)
357. N.Puri, A.Majumdar, B.Cuenoud, F.Natt, P.Martin, A.Boyd, P.S.Miller, M.M.Seidman. *Biochemistry*, **41**, 7716 (2002)
358. T.Carlomango, M.J.J.Blommers, J.Meiler, B.Cuenoud, C.Griesinger. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 7364 (2001)
359. K.B.Wiberg. *Acc. Chem. Res.*, **29**, 229 (1996)
360. S.W.Blume, J.Lebowitz, W.Zacharias, V.Guarcello, C.A.Mayfield, S.W.Ebbinghaus, P.Bates, D.E.Jones, J.Trent, N.Vigneswaran, D.M.Miller. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 695 (1999)
361. A.Majumdar, N.Puri, B.Cuenoud, F.Natt, P.Martin, A.Khorlin, N.Dyatkina, A.J.George, P.S.Miller, M.M.Seidman. *J. Biol. Chem.*, **278**, 11072 (2003)
362. M.Sollogoub, R.Darby, B.Cuenoud, T.Brown, K.R.Fox. *Biochemistry*, **41**, 7224 (2002)
363. Г.Я.Шедлян, Е.А.Кубарева, Е.С.Громова. *Успехи химии*, **65**, 765 (1996)
364. S.S.Parikh, G.Walcher, G.D.Jones, G.Slupphaug, H.E.Krokan, G.M.Blackburn, J.A.Tainer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5083 (2000)
365. M.Ghosh, N.V.Kumar, U.Varshney, K.V.Chary. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 1906 (2000)
366. V.Pingoud, E.Kubareva, G.Stengel, P.Friedhoff, J.M.Bujnicki, C.Urbank, A.Sudina, A.Pingoud. *J. Biol. Chem.*, **277**, 14306 (2002)
367. A.Pingoud, A.Jeltsch. *Eur. J. Biochem.*, **246**, 1 (1997)
368. О.В.Воробьева, С.А.Васильев, А.С.Карягина, Т.С.Орецкая, Е.А.Кубарева. *Молекуляр. биология*, **34**, 1074 (2000)
369. K.M.Meisenheimer, T.H.Koch. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **32**, 101 (1997)
370. Е.А.Кубарева, Е.М.Волков, N.L.Vinogradova, I.A.Kanevsky, T.S.Oretskaya, S.A.Kuznetsova, M.G.Brevnov, E.S.Gromova, G.A.Nevinsky, Z.A.Shabarova. *Gene*, **157**, 167 (1995)
371. O.M.Gritsenko, E.V.Koudan, S.N.Mikhailov, B.S.Ermolinsky, A.van Aerschot, P.Herdewijn, E.S.Gromova. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **21**, 753 (2002)
372. S.N.Mikhailov, B.S.Ermolinsky, E.V.Efimtseva, M.G.Brevnov, O.M.Gritsenko, E.S.Gromova, A.van Aerschot, P.Herdewijn. *Nucleosides Nucleotides*, **18**, 1469 (1999)
373. S.N.Mikhailov, B.S.Ermolinsky, E.V.Efimtseva, G.P.Moiseyev, V.L.Tunitskaya, E.E.Rusakova, S.N.Kochetkov, O.M.Gritsenko, E.S.Gromova, A.van Aerschot, P.Herdewijn. *Collect. Czech. Chem. Commun., Symp. Ser.*, **2**, 141 (1999)
374. O.M.Gritsenko, S.N.Mikhailov, E.V.Efimtseva, A.van Aerschot, P.Herdewijn, E.S.Gromova. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **19**, 1805 (2000)
375. V.L.Tunitskaya, E.E.Rusakova, L.V.Memelova, S.N.Kochetkov, A.van Aerschot, P.Herdewijn, E.V.Efimtseva, B.S.Ermolinsky, S.N.Mikhailov. *FEBS Lett.*, **442**, 20 (1999)
376. Д.В.Турутин, Т.С.Зацепин, М.А.Тимченко, Е.А.Кубарева, Т.С.Орецкая. *Молекуляр. биология*, **36**, 877 (2002)
377. S.Antsyrovich, E.Kubareva, V.Tashlitsky, T.Oretskaya, Z.Shabarova. *Eur. J. Biochem.*, **255**, 414 (1998)
378. С.И.Анцыпович, Т.С.Орецкая. *Успехи химии*, **67**, 274 (1998)
379. Y.Lin, Q.Qiu, S.C.Gill, S.D.Jayasena. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 5229 (1994)
380. L.S.Green, D.Jellinek, C.Bell, L.A.Beebe, B.D.Feistner, S.C.Gill, F.M.Jucker, N.Janjic. *Chem. Biol.*, **2**, 683 (1995)
381. D.Jellinek, L.S.Green, C.Bell, C.K.Lynnot, N.Gill, C.Vargeese, G.Kirschenheuter, D.P.C.McGee, P.Abesinghe, W.A.Pieken. *Biochemistry*, **34**, 11363 (1995)
382. J.S.Nelson, L.Giver, A.D.Ellington, R.L.Letsinger. *Biochemistry*, **35**, 5339 (1996)
383. M.F.Kubik, C.Bell, T.Fitzwater, S.R.Watson, D.M.Tasset. *J. Immunol.*, **159**, 259 (1997)
384. N.Teramoto, H.Ichinari, N.Kawazoe, Y.Imanishi, Y.Ito. *Biotechnol. Bioeng.*, **75**, 463 (2001)
385. N.Kawazoe, N.Teramoto, H.Ichinari, Y.Imanishi, Y.Ito. *Biomacromolecules*, **2**, 681 (2001)
386. S.W.Lee, B.A.Sullenger. *J. Exp. Med.*, **184**, 315 (1996)
387. S.W.Lee, B.A.Sullenger. *Nat. Biotechnol.*, **15**, 41 (1997)
388. S.Iwai, S.Kataoka, M.Wakasa, E.Ohtsuka, H.Nakamura. *FEBS Lett.*, **368**, 315 (1995)
389. N.Baidya, O.C.Uhlenbeck. *Biochemistry*, **34**, 12363 (1995)
390. D.Dertinger, T.Dale, O.C.Uhlenbeck. *J. Mol. Biol.*, **314**, 649 (2001)
391. Е.А.Кубарева, N.L.Vasilenko, O.V.Vorobjeva, E.M.Volkov, T.S.Oretskaya, G.A.Korshunova, G.A.Nevisky. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **46**, 597 (1998)
392. A.E.Sudina, E.M.Volkov, E.A.Kubareva. *Moscow University Chem. Bull. Suppl.*, **41**, 122 (2000)
393. H.Aurup, A.Siebert, F.Benseler, D.Williams, F.Eckstein. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4963 (1994)
394. K.Yamana, T.Gokota, H.Ozaki, H.Nakano, O.Sangen, T.Shimidzu. *Nucleosides Nucleotides*, **11**, 383 (1992)
395. K.Yamana, R.Iwase, S.Furutani, H.Tsuchida, H.Zako, T.Yamaoka, A.Murakami. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2387 (1999)
396. K.Yamana, H.Zako, K.Asazuma, R.Iwase, H.Nakano, A.Murakami. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **40**, 1104 (2001)
397. R.Iwase, S.Furutani, T.Yamaoka, K.Yamana, A.Murakami. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **35**, 117 (1996)
398. R.Iwase, H.Tsuchida, T.Yamaoka, K.Yamana, A.Murakami. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **36**, 205 (1997)
399. R.Iwase, K.Mahara, K.Yamana, A.Yamaoka, A.Murakami. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **42**, 115 (1999)
400. B.T.Young, S.K.Silverman. *Biochemistry*, **41**, 12271 (2002)
401. E.Palecek, M.Fojta. *Anal. Chem.*, **73**, 74A (2001)
402. A.E.Beilstein, M.T.Tierney, M.W.Grinstaff. *Comments Inorg. Chem.*, **22**, 105 (2000)
403. Т.С.Зацепин, С.Ю.Андреев, Т.Гианик, Т.С.Орецкая. *Успехи химии*, **72**, 602 (2003)
404. Пат. 6063573 США; *Chem. Abstr.*, **131**, 140458 (2000)
405. Пат. 6071699 США; *Chem. Abstr.*, **123**, 334352 (2000)
406. E.K.Wilson. *Chem. Eng. News*, **76**, 47 (1998)
407. R.M.Umek, S.W.Lin, J.Vielmetter, R.H.Terbrueggen, B.Irvine, C.J.Yu, J.F.Kayyem, H.Yowanto, G.F.Blackburn, D.H.Farkas, Y.P.Chen. *J. Mol. Diagn.*, **3**, 74 (2001)
408. K.Yamana, T.Mitsui, J.Yoshioka, T.Isuno, H.Nakano. *Bioconjugate Chem.*, **7**, 715 (1996)
409. H.M.Desmukh, S.P.Joglekar, A.D.Broom. *Bioconjugate Chem.*, **6**, 578 (1995)
410. K.Yamana, S.Kumamoto, H.Nakano, Y.Matsuo, Y.Sigue. *Chem. Lett.*, 1132 (2001)
411. K.Yamana, S.Kumamoto, T.Hasegawa, H.Nakano, Y.Sigue. *Chem. Lett.*, 506 (2002)
412. V.Kertesz, N.A.Whittemore, G.B.Inamati, M.Manoharan, P.D.Cook, D.C.Baker, J.Q.Chambers. *Electroanalysis (N.Y.)*, **12**, 889 (2000)
413. S.T.Sigurdsson. *Methods*, **18**, 71 (1999)
414. G.Glick. *Biopolymers*, **48**, 83 (1998)
415. S.T.Sigurdsson. *Methods Enzymol.*, **318**, 165 (2000)
416. D.J.Earnshaw, B.Masquida, S.Muller, S.T.Sigurdsson, F.Eckstein, E.Westhof, M.J.Gait. *J. Mol. Biol.*, **274**, 197 (1997)
417. T.K.Stage-Zimmermann, O.C.Uhlenbeck. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 863 (2001)
418. K.F.Blount, O.C.Uhlenbeck. *Biochemistry*, **41**, 6834 (2002)
419. E.J.Maglott, J.T.Goodwin, G.D.Glick. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 7461 (1999)
420. Г.А.Коршунова, Н.В.Сумбатян, А.Н.Топин, М.Т.Мчедлидзе. *Молекуляр. биология*, **34**, 966 (2000)
421. K.L.Buchmueller, B.T.Hill, M.S.Platz, K.M.Weeks. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 10850 (2003)
422. K.L.Buchmueller, K.M.Weeks. *Biochemistry*, **42**, 13869 (2003)
423. S.I.Chamberlin, E.J.Merino, K.M.Weeks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 14688 (2002)

424. T.E.Edwards, T.M.Okonogi, S.T.Sigurdsson. *Chem. Biol.*, **9**, 699 (2002)
425. T.E.Edwards, S.T.Sigurdsson. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **303**, 721 (2003)
426. T.E.Edwards, S.T.Sigurdsson. *Biochemistry*, **41**, 14843 (2002)
427. O.Schiemann, A.Weber, T.E.Edwards, T.F.Prisner, S.T.Sigurdsson. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 3434 (2003)
428. F.Burlina, A.Favre, J.-L.Fourrey. *Bioorg. Med. Chem.*, **5**, 1999 (1997)
429. D.J.Earnshaw, M.J.Gait. *Biopolymers*, **48**, 39 (1998)
430. M.J.Fedor. *J. Mol. Biol.*, **297**, 269 (2000)
431. W.A.Pieken, D.B.Olsen, F.Benseler, H.Aurup, F.Eckstein. *Science*, **253**, 314 (1991)
432. O.Heidenreich, F.Benseler, A.Fahrenholz, F.Eckstein. *J. Biol. Chem.*, **269**, 2131 (1994)
433. L.Beigelman, J.A.McSwiggen, K.G.Draper, C.Gonzalez, K.Jensen, A.M.Karpeisky, A.S.Modak, J.Matulich-Adamic, A.B.DiRenzo, P.Haerberli, D.Sweedler, D.Tracz, S.Grimm, F.E.Wincott, V.G.Thackray, N.Usman. *J. Biol. Chem.*, **270**, 25702 (1995)
434. T.C.Jarvis, F.E.Wincott, L.J.Alby, J.A.McSwiggen, L.Beigelman, J.Gustofson, A.DiRenzo, K.Levy, M.Arthur, J.Matulich-Adamic, A.Karpeisky, C.Gonzalez, T.M.Woolf, N.Usman, D.T.Stinchcomb. *J. Biol. Chem.*, **271**, 29107 (1996)
435. D.J.Earnshaw, M.L.Hamm, J.A.Piccirilli, A.Karpeisky, L.Beigelman, B.S.Ross, M.Manoharan, M.J.Gait. *Biochemistry*, **40**, 7350 (2001)
436. A.Beaudry, J.DeFoe, S.Zinnen, A.Burgin, L.Beigelman. *Chem. Biol.*, **7**, 323 (2000)
437. S.P.Zinnen, K.Domenico, M.Wilson, B.A.Dickinson, A.Beaudry, V.Mokler, A.T.Daniher, A.Burgin, L.Beigelman. *RNA*, **8**, 214 (2002)
438. G.Paoletta, B.S.Sproat, A.I.Lamond. *EMBO J.*, **11**, 1913 (1992)
439. M.Cieslak, J.Niewiarowska, M.Nawrot, M.Koziolekiewicz, W.J.Stec, C.S.Cierniewski. *J. Biol. Chem.*, **277**, 6779 (2002)
440. K.F.Blount, N.L.Grover, V.Mokler, L.Beigelman, O.C.Uhlenbeck. *Chem. Biol.*, **9**, 1009 (2002)
441. C.Hendrix, M.Mahieu, J.Anne, S.van Calenbergh, A.van Aerschot, J.Content, P.Herdewijn. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **210**, 67 (1995)
442. M.L.Hamm, J.P.Schwans, J.A.Piccirilli. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 4223 (2000)
443. M.L.Hamm, D.Nikolic, R.B.van Breemen, J.A.Piccirilli. *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12069 (2000)
444. K.Raines, P.A.Gottlieb. *RNA*, **4**, 340 (1998)
445. J.P.Schwans, C.N.Cortez, J.M.Olvera, J.A.Piccirilli. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 10012 (2003)
446. R.Stromberg, S.Hahne, A.S.Sjogren, B.M.Sjoberg. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183**, 842 (1992)
447. A.S.Sjogren, E.Pettersson, B.M.Sjoberg, R.Stromberg. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 648 (1997)
448. A.S.Sjogren, R.Stromberg, B.M.Sjoberg. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3543 (1997)
449. S.Shan, D.Herschlag. *Biochemistry*, **38**, 10958 (1999)
450. S.Shan, G.J.Narlikar, D.Herschlag. *Biochemistry*, **38**, 10976 (1999)
451. D.V.Morrissey, P.A.Lee, D.A.Johnson, S.L.Overly, J.A.McSwiggen, L.Beigelman, V.R.Mokler, L.Maloney, C.Vargeese, K.Bowman, J.T.O'Brien, C.S.Shaffer, A.Conrad, P.Schmid, J.D.Morrey, D.G.Macejak, P.A.Pavco, L.M.Blatt. *J. Viral Hepat.*, **9**, 411 (2002)

NUCLEOSIDES AND OLIGONUCLEOTIDES WITH 2'-REACTIVE GROUPS: SYNTHESIS AND APPLICATIONS

T.S.Zatsepin, E.A.Romanova, T.S.Oretskaya

Department of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University

A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M.V.Lomonosov Moscow State University

Leninskie Gory, 119992 Moscow, Russian Federation, Fax +7(095)939-3181

The known methods for the synthesis of 2'-functionalised nucleosides and conjugates thereof are systematised. The applications of 2'-modified nucleosides and oligonucleotides are discussed.

Bibliography — 451 references.

Received 19th December 2003